

**Sandra Jantscher, BSc.**

# **Cytotoxizität oxidierter Phospholipide in kultivierten Hautkrebszellen**

## **MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Science

**Masterstudium Biochemie und molekulare Biomedizin**

[gemeinsames Studium im Rahmen von NAWI Graz]

**Technische Universität Graz**

Betreuer:

Ao.Univ.-Prof. Dr.phil. Albin Hermetter

Institut für Biochemie

März, 2013

## **Danksagung**

Einleitend möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Albin Hermetter für seine Unterstützung bedanken. Er erlaubte mir Teil eines großartigen wissenschaftlichen Projektes zu sein, begleitete mich aufmerksam durch die gesamte Arbeit und unterstützte mich bei der Darstellung der Ergebnisse.

Des Weiteren möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. Claudia Ramprecht für die Ratschläge und die Hilfe bei den praktischen Arbeiten meinen besten Dank aussprechen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner gesamten Arbeitsgruppe die mich hilfsbereit durch die Arbeit begleitet hat. Das hervorragende Arbeitsklima hat dazu beigetragen, dass mir die Arbeit sehr große Freude gemacht hat.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, meiner Schwester, meinem Freund und meiner gesamten Familie für den starken Rückhalt bedanken. Ihr habt mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet und erst durch eure Unterstützung wurde es mir möglich dieses Studium abzuschließen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. Die menschliche Haut</b> .....	3
1.1.1. Aufbau .....	3
1.1.2. Tumoren der Haut .....	5
<b>1.2. Oxidierte Phospholipide</b> .....	7
1.2.1. Oxidation von Phospholipiden .....	7
1.2.2. Chemische Eigenschaften und biologische Wirkungen von POVPC und PGPC .....	8
1.2.3. Ether-Lipide .....	9
<b>1.3. Apoptose – Nekrose</b> .....	10
1.3.1. Induktion von Apoptose .....	11
<b>1.4. Der Sphingomyelin - Ceramid Rheostat</b> .....	12
1.4.1. Entstehung von Ceramid .....	13
1.4.2. Ceramid und Apoptose .....	15
<b>2. Zielsetzung</b> .....	16
<b>3. Methodik</b> .....	17
<b>3.1. Zellkultur</b> .....	17
3.1.1. Materialien .....	17
3.1.2. Durchführung .....	18
<b>3.2. MTT Viabilitäts-Assay</b> .....	19
3.2.1. Materialien .....	19
3.2.2. Durchführung .....	20
<b>3.3. FACS-Messungen</b> .....	21
3.3.1. Materialien .....	22
3.3.2. Durchführung .....	23
3.3.3. Beispielhafte Auswertung einer FACS-Messung .....	25
<b>3.4. Aufnahme und Lokalisierung von Lipiden</b> .....	26

3.4.1. Materialien .....	27
3.4.2. Durchführung .....	28
<b>3.5. Scratch Assay</b> .....	30
3.5.1. Materialien .....	30
3.5.2. Durchführung .....	30
<b>3.6. Sphingolipidanalyse</b> .....	32
3.6.1. Materialien .....	32
3.6.2. Durchführung .....	33
<b>3.7. Assay zur Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase</b> ....	35
3.7.1. Materialien .....	36
3.7.2. Durchführung .....	37
<b>4. Resultate</b> .....	39
<b>4.1. Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT Assay</b> .....	39
<b>4.2. Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels FACS</b> .....	42
<b>4.3. Zelluläre Aufnahme und Lokalisierung von BY-PGPE und BY-POVPE</b> 51	
4.3.1. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und ER-Tracker™ Red .....	51
4.3.2. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und Mito Tracker CMXRos	55
4.3.3. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und Cellmask™ plasma membrane stain .....	59
<b>4.4. Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Migrationsgeschwindigkeit von SCC13 Zellen und HaCaT Zellen</b> .....	62
<b>4.5. Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Ceramid-Bildung</b> .....	68
4.5.1. Ceramid-Freisetzung durch Erhöhung der aSMase Aktivität .....	68
4.5.2. Veränderungen des Ceramid- und Sphingomyelingehalts nach Inkubation mit oxidierten Phospholipiden .....	70
<b>5. Diskussion</b> .....	72
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	85

# Abkürzungsverzeichnis

aSMase	Saure Sphingomyelinase
BODIPY™ (BY)	Boron-dipyrrromethen (4,4-difluor-4bor-3a,4a-diaza-s-indacen)
BSA	Bovines Serum Albumin
BY-PGPE	1-Palmitoyl-2-glutaroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-N-(BODIPY-propionyl)-ethanolamin
BY-POVPE	1-Palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-N-(BODIPY-propionyl)-ethanolamin
Cer	Ceramid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Edelfosin	1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycero-3-phosphocholin
E-PGPC	1-O-hexadecyl-2-glutaroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
E-POVPE	1-O-hexadecyl-2-(5-oxovaleroyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FCS	Fetal calf serum
HaCaT	Human Adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid
NBD-SM	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl)-dodecanoyl-sphingomyelin
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PAF	Platelet Activating Factor
PAPC	1-Palmitoyl-2-arachidonoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGPC	1-Palmitoyl-2-glutaroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PI	Propidiumiodid

PKC $\delta$	Protein Kinase C Delta
POVPC	1-Palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
PS	Phosphatidylserin
qTOF	Quadrupol-Time of flight Massenspektrometer
SCC13	Squamous Cell Carcinoma Cells 13
SDS	Sodiumdodecyl Sulfat
SM	Sphingomyelin
STS	Staurosporin
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose-Faktor $\alpha$
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain protein
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatographie

# 1. Einleitung

Durch oxidativen Stress können aus mehrfach ungesättigten Phospholipiden oxidierte Phospholipide gebildet werden. Dabei handelt es sich um biologisch hoch aktive Moleküle die mit einer Reihe von pathologischen Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden. Einigen dieser Verbindungen wird eine hohe Toxizität nachgesagt. So wurde zum Beispiel in Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose die Cytotoxizität von 1-Palmitoyl-2-(5-oxoaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POVPC) und 1-Palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (PGPC) auf arterielle glatte Muskelzellen nachgewiesen (Fruhworth *et al.*, 2006; Fruhwirth *et al.*, 2007). Die beiden Lipide entstehen durch oxidative Modifikation von 1-Palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (PAPC). Sie unterscheiden sich durch ihre Substituenten in der *sn*-2 Position, wobei POVPC an dieser Position eine Aldehyd-O und PGPC eine Carboxyacyl Gruppe trägt. POVPC kann daher im Unterschied zu PGPC kovalent mit Aminogruppen von Proteinen und Lipiden interagieren (Deigner und Hermetter, 2008; Fruhwirth *et al.*, 2007).

Obwohl toxische oxidierte Phospholipide in der Vergangenheit hauptsächlich mit negativen Eigenschaften verbunden wurden, kann aus diesen Eigenschaften auch ein positiver Nutzen gezogen werden. So wurde gezeigt, dass die oxidierten Phospholipide POVPC und PGPC auch auf Tumorzellen cytotoxische Wirkungen haben. In diesem Zusammenhang wurde ein apoptotischer Effekt auf humane Melanomzellen nach Inkubation mit diesen Lipiden beschrieben (Claudia Ramprecht, Dissertation, TU Graz, 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Cytotoxizität dieser (und weiterer strukturähnlicher) Phospholipide auf kultivierte weiße Hautkrebszellen (SCC13 Zelllinie) im Vergleich zu Zellen einer spontan immortalisierten Keratinozytenzelllinie (HaCaT Zelllinie) erforscht werden.

Zu diesem Zweck wurden am Beginn dieser Arbeit Viabilitätsassays durchgeführt. In weiterer Folge wurde mit Hilfe von FACS-Messungen die Unterscheidung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod vorgenommen. Die Resultate zeigten, dass die Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden zu einer deutlichen Erhöhung des Anteils apoptotischer SCC13 Zellen führte. Da sämtliche

Ergebnisse einen deutlichen Hinweis auf eine cytotoxische Wirkung der oxidierten Phospholipide gaben, wurden in weiterer Folge Studien über die Lokalisation der Lipide in den Zellen durchgeführt. Dazu wurden mit BODIPY™-markierte oxidierte Phospholipide eingesetzt. Weiters wurden die Auswirkungen der oxidierten Phospholipide auf die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen untersucht, um etwaige Auswirkungen auf die Metastasierungstendenz zu zeigen. Schließlich wurden Effekte der oxidierten Phospholipide auf die Ceramidbildung studiert. Ceramid ist ein apoptotischer Messenger. Frühere Studien haben bereits eine Rolle dieses Lipids bei der oxidierten Phospholipid-vermittelten Apoptose in anderen Zelllinien gezeigt (Loidl *et al.*, 2003; Mathias *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang wurden Sphingolipidanalysen durchgeführt, und die Rolle der sauren Sphingomyelinase bei der Ceramidbildung untersucht.



## 1.1. Die menschliche Haut

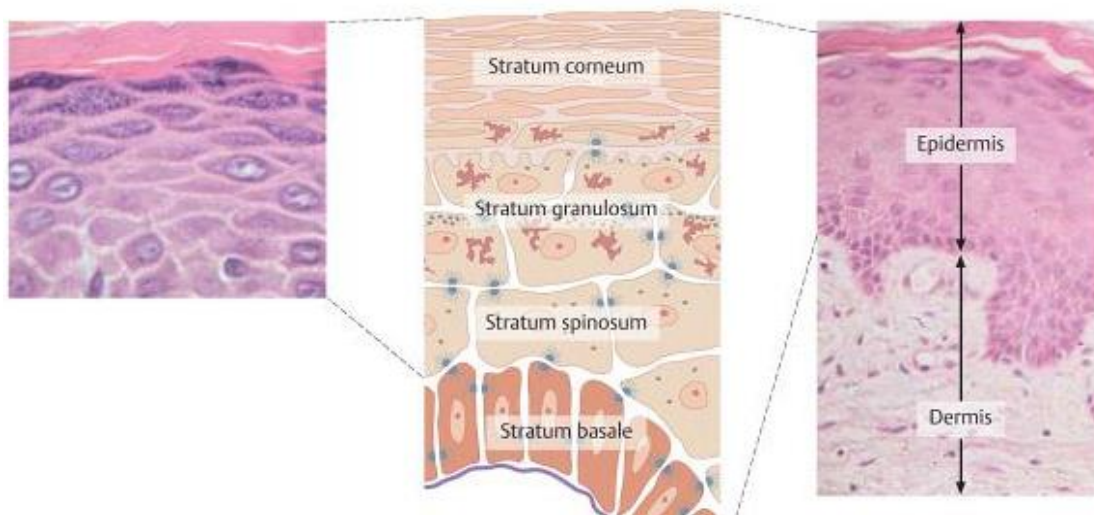
Die Haut ist mit bis zu 2 m<sup>2</sup> Fläche das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie ist unersetzbar für die Regelung von vielen lebensnotwendigen Funktionen und nimmt an vielen Stoffwechselprozessen teil.

So schützt sie den Organismus vor Kälte, Hitze, exogenen Noxen und mechanischer Schädigung. Sie ist für die Regelung des Wasserhaushaltes, die Immunabwehr, die Thermoregulation, Sinneswahrnehmungen und viele andere Funktionen mit- verantwortlich (Sterry, 2011).

### 1.1.1. Aufbau

Allgemein kann zwischen Leistenhaut und Felderhaut unterschieden werden. Die Leistenhaut befindet sich nur an den Hand- und Fußinnenflächen. An der Haut befinden sich häufig Hautanhangsgebilde wie Haare, Nägel und Drüsen.

Histologisch wird die Haut (Cutis) in Epidermis (Oberhaut) und Dermis (Lederhaut) unterteilt. Die Epidermis bildet die Abgrenzung des Körpers gegenüber der Umwelt. Die Dermis befindet sich direkt darunter und geht in die Unterhaut (Subcutis) über, welche die Haut mit dem darunter liegendem Gewebe verbindet (Ulfig, 2011).



**Abbildung 1: Aufbau der Haut.**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung sowie histologische Schnitte der Haut. Während in der Bildmitte und dem linken Bildausschnitt die Epidermis abgebildet ist, ist im rechten Bildausschnitt die gesamte Cutis zu sehen. Diese Abbildung wurde aus Kurzlehrbuch Dermatologie von W. Sterry übernommen.

## Epidermis

Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel. Sie lässt sich in mehrere Schichten unterteilen. Die direkte Abgrenzung zwischen Körper und Umwelt bildet eine Schicht aus abgestorbenen, flachen Zellen die an der Oberfläche verhornt sind, weshalb diese Schicht in Folge als Hornschicht (Stratum corneum) bezeichnet wird. Bei den Schleimhäuten befindet sich an dieser Stelle ein unverhorntes Epithel.

Direkt darunter befindet sich im Fall der Leistenhaut das äußerst dünne Stratum lucidum.

Das darunter liegende Stratum granulosum bildet aufgrund lipidhaltiger Lamellenkörper eine wichtige Barriere für Wasser und ist daher maßgeblich am Wasserhaushalt des Körpers beteiligt.

Das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) ist eine relativ breite Schicht, die aus mehreren Lagen von polygonalen Zellen, welche zur Oberfläche hin abflachen, gebildet wird.

Direkt auf der Basallamina befindet sich das Stratum basale, welches aus einer Reihe hochprismatischer Zellen gebildet wird. Das Stratum basale ist die einzige Schicht der Haut, die mitoseaktiv ist.

Die am häufigsten vorkommenden Zelltypen der Epidermis sind Keratinozyten. Dabei handelt es sich um Epithelzellen, die in Laufe ihrer Entwicklung verhornen.

Die zweithäufigste Zellgruppe bilden die Melanozyten. Sie liegen im Stratum basale und bilden das Enzym Tyrosinase, welches für die Melaninbildung benötigt wird. Dieses in Granula verpacktes Pigment wird an die Keratinozyten abgegeben, wo es gespeichert wird und so für die Pigmentierung der Haut sorgt.

Neben diesen beiden Zellgruppen kommen auch sogenannte Langerhans-Zellen, die Antigen-präsentierende Zellen die Teil der Immunabwehr sind, sowie Merkel-Zellen welche als Mechanorezeptoren fungieren, vor (Rohen, 1994; Ulfing, 2011; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

## Dermis

Unter der Epidermis befindet sich die Dermis. Diese besteht hauptsächlich aus Bindehaut. Daneben beinhaltet sie sowohl Gefäße als auch Nervenbahnen, weshalb sie für die Versorgung der Haut mit Sauerstoff und Nährstoffen verantwortlich ist. Die Dermis ist für die typischen Eigenschaften der Haut wie

Elastizität und Festigkeit verantwortlich (Sterry, 2011; Ulfing, 2011; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

### Subcutis

Die Subcutis verbindet die Haut mit dem darunter liegendem Gewebe. Diese Schicht besteht aus vielen Fettzellen sowie Bindegewebe. Sie sorgt daher für die Wärmeisolierung sowie den mechanischen Schutz. Da sie die Mehrheit des Körperfetts beinhaltet, dient sie auch als Wärmespeicher. (Sterry, 2011; Ulfing, 2011; Rohen und Lütjen-Drecoll, 2000).

## **1.1.2. Tumoren der Haut**

Da die Haut aufgrund ihrer schützenden Funktion für den Organismus im Laufe der Zeit vielen Umwelteinflüssen ausgesetzt ist, sind hier bösartige Veränderungen besonders häufig. Entsprechend hoch ist auch die Prävalenz von Tumoren in diesem Gewebe (Statistik Austria, 2011).

### Tumorgenese

Verschiedene Umwelteinflüsse, wie zum Beispiel UV Licht oder Viren, können zu Veränderungen der genetischen Information von Hautzellen führen. Während UV-B Strahlung im Stande ist, DNA direkt zu schädigen, können UV-A Strahlen über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies genetische Veränderungen verursachen (Ganten und Ruckpaul, 2004). Sind von diesen Veränderungen Tumorsuppressorgene oder Onkogene betroffen, kann dies zu einem unkontrollierten Wachstum der Zellen führen (Szeimies *et al.*, 2010).

Während bei Tumorsuppressorgenen beide Allele mutiert sein müssen damit es zur Entstehung eines Tumors kommen kann, reicht bei Onkogenen die Mutation eines Allels aus. Zu Beginn der Tumorgenese steht immer der Verlust der Zellzykluskontrolle, gefolgt von einer Fehlregulation des programmierten Zelltodes. Das wiederum kann zum uneingeschränkten Wachstum von Zellen führen (Szeimies *et al.*, 2010).

Ein bei kutanen Tumoren häufig verändertes Tumorsuppressorgen ist p53. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der für die Reparatur von DNA, oder

sollte dies nicht mehr möglich sein, für die Einleitung des programmierten Zelltodes verantwortlich ist (Brash *et al.*, 1991).

Neben erworbenen Mutationen können zu einem geringen Teil auch Keimbahnmutationen, das heißt vererbte Veränderungen des Erbgutes, zu einer Risikoerhöhung bezüglich Hautkrebs führen (Szeimies *et al.*, 2010).

### Arten von Hautkrebs

Primär kann zwischen dem sogenannten weißen Hautkrebs und schwarzen Hautkrebs unterschieden werden. Beim schwarzen Hautkrebs handelt es sich um das Melanom, einem bösartigem Tumor der aus Melanozyten und ihren Vorläuferzellen hervorgeht und häufig Metastasen bildet.

Dem weißen Hautkrebs liegen Keratinozyten zu Grunde. Dabei unterscheidet man zwischen dem aus dem Stratum basale hervorgehenden Basaliom, und dem aus dem Stratum spinosum entstandenen spinozellulärem Karzinom (auch Plattenepithelkarzinom genannt). Dem Plattenepithelkarzinom geht häufig eine als aktinische Keratose bezeichnete Präkanzerose voraus. Diese entsteht vermehrt an sonnenexponierten Stellen hellhäutiger Personen. Der Übergang von der Präkanzerose zum Karzinom erfolgt schleichend unscharf.

Obwohl es sich beim Plattenepithelkarzinom um einen destruktiv wachsenden, bösartigen Tumor handelt, sind Todesfälle aufgrund seiner späten Metastasierung eher selten.

Neben den oben genannten Tumoren gibt es noch eine Reihe von weniger häufigen Hautkrebsarten wie das Merckelzellkarzinom oder Tumore der Hautanhangsgebilde (Altmeyer und Reich, 2006). Die Therapie von Hautkrebs ist abhängig vom Stadium der Erkrankung sowie von der Art des Tumors und seiner Lokalisation. Während oberflächliche, nicht metastasierende Tumoren der Haut mit geringer Infiltrationstiefe durch Kryotherapie, Exzision oder Elektrodisektion häufig lokal entfernt werden können, wird bei weiter fortgeschrittenen Tumoren auch die Therapie mit Zytostatika und Bestrahlung eingesetzt (Orfanos und Garbe, 2002).

## 1.2. Oxidierte Phospholipide

Oxidierte Phospholipide sind Bestandteil von Biomembranen und oxidiertem LDL. Sie werden mit einer Reihe von patho-physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht (Fadeel und Xue, 2009; Levitan *et al.*, 2010). Chemische Struktur, Konzentration und Ort der Entstehung bestimmen ihre Wirkung. Oxidierte Phospholipide sind in den letzten Jahren vermehrt in den Blickpunkt von Forschung und Medizin gerückt.

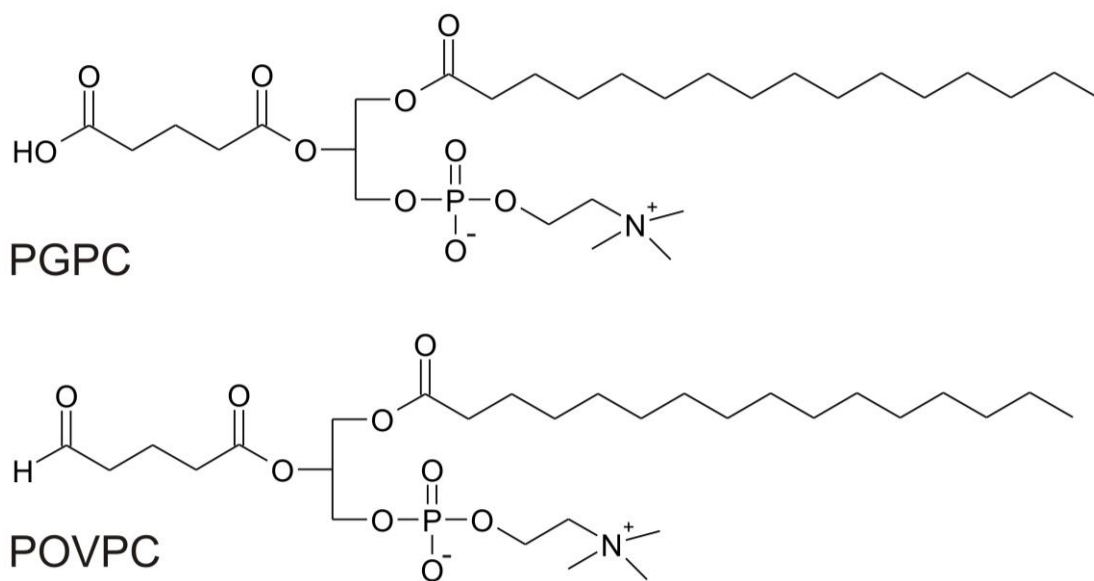
Unter Phospholipide versteht man amphiphile Lipide. Ihr Grundgerüst ist Glycerin, das zwei Fettsäuren mit einer polaren Kopfgruppe verknüpft. Letztere enthält einen Phosphosäurerest, der mit einem weiteren Alkohol (Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol u.a.) verestert ist (Löffler, 2004). Das am häufigsten in Säugerzellen vorkommende Phospholipid ist Phosphatidylcholin, weshalb auch oxidierte Phospholipide mit diesem Grundgerüst vergleichsweise häufig zu finden sind (Fruhirth *et al.*, 2007).

### 1.2.1. Oxidation von Phospholipiden

Durch oxidativen Stress können in Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden, welche unter anderem zur Oxidation von Lipiden führen können. Neben nicht-enzymatischen Reaktionen können auch Lipid oxidierende Enzyme wie z.B. die Lipoxygenase oder die Myeloperoxidase zur Initiierung von Oxidationsreaktionen und somit zur Entstehung von oxidierten Phospholipiden führen (Tsimikas und Miller, 2011).

Die an die *sn*-2 Position gebundenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Phospholipiden können besonders leicht oxidiert werden. In Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge und ihrem Sättigungsgrad kann eine Vielzahl von Oxidationsprodukten entstehen, die wiederum unterschiedliche chemische Reaktionen eingehen können. Während an der *sn*-1 Position Alkyl und Acyl Ketten gebunden sind, sind an der *sn*-2 Position fast ausschließlich Acyl Ketten zu finden. Die an dieser Position häufig vorkommenden (mehrfach) ungesättigten Fettsäuren sind besonders anfällig für oxidative Modifikation (Subbanagounder *et al.*, 2000), da diese aufgrund ihrer bisallylischen Kohlenstoff-Wasserstoff Bindungen eine

niedrige Dissoziationsenergie haben und es daher leicht zur Abspaltung eines Wasserstoffatoms kommen kann (Fruhirth *et al.*, 2007). So entstehen zum Beispiel durch Oxidation von PAPC neben PEIPC auch POVPC und PGPC. Die beiden letzteren Lipide unterscheiden sich durch ihre *sn*-2 Ketten voneinander. Beide Lipide entstehen durch die Fragmentierung der vierfach ungesättigten Arachidonsäure 20:4 von PAPC. POVPC enthält eine Aldehyd Gruppe und PGPC eine Carboxylgruppe in der Position *sn*-2 (siehe Abbildung 2) (Deigner und Hermetter, 2008; Subbanagounder *et al.*, 2000).



**Abbildung 2: Chemische Strukturen von PGPC und POVPC.**

Beide Lipide tragen an der *sn*-1 Position eine gesättigte 16:0 Fettsäure und an der *sn*-3 Position die polare Phosphorylcholinkopfgruppe. Während PGPC an der *sn*-2 Position eine Carboxylgruppe trägt, weist POVPC an dieser Position eine Aldehyd Gruppe auf.

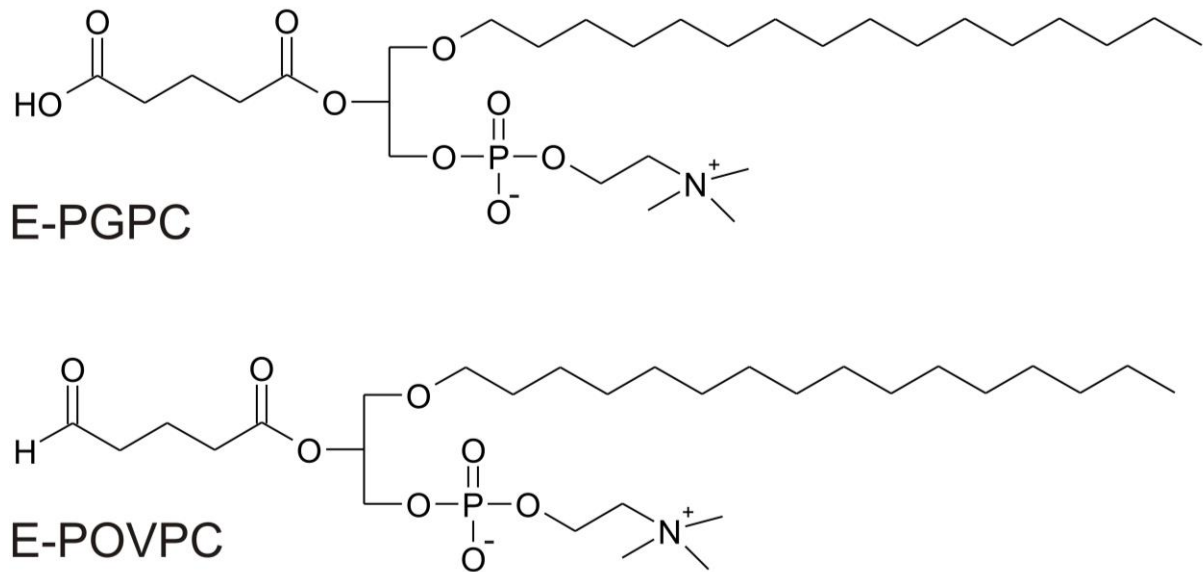
### 1.2.2. Chemische Eigenschaften und biologische Wirkungen von POVPC und PGPC

Bei POVPC handelt es sich um ein Phospholipid, das aufgrund seiner Aldehyd Gruppe an der *sn*-2 Position mit Amino-Verbindungen Schiff'sche Basen bilden kann. Es ist daher in der Lage, kovalente Bindungen mit Proteinen und Lipiden einzugehen. Im Gegensatz dazu besitzt PGPC an dieser Position eine negativ geladene Carboxylgruppe, weshalb es nur nichtkovalent mit anderen Molekülen interagieren kann (Deigner und Hermetter, 2008; Fruhwirth *et al.*, 2007). Beide Lipide sind Bestandteile von oxidierten LDL und wirken auf Zellen toxisch (Levitan

*et al.*, 2010). Es wurde gezeigt, dass beide Lipide cytotoxische Effekte auf arterielle glatte Muskelzellen haben und zu einer Inhibierung der Zellproliferation führen können. Dabei konnten vor allem Veränderungen der Zellen beobachtet werden, die auf Apoptose hindeuten. Auffallend war, dass es unter hohen Serumkonzentrationen zwar zu einer Inhibierung der Proliferation kam, nicht jedoch zu einer Induzierung von Apoptose (Fruhirth *et al.*, 2006). Dies könnte mit dem Abbau der oxidierten Phospholipide durch Phospholipasen in Zusammenhang stehen (Subbanagounder *et al.*, 2000), wobei die Degradierungsprodukte für die anhaltende antiproliferative Wirkung verantwortlich sein könnten (Fruhirth *et al.*, 2006). Daneben könnte auch die „Platelet activating factor Acetylhydrolase“ (PAF-AH) eine Rolle spielen. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von „Platelet Activating Factor“ (PAF) sowie den ähnlich aufgebauten kurzkettigen Glycerophospholipiden PGPC und POVPC (Fruhirth *et al.*, 2007). Aufgrund der Ähnlichkeit zu PAF kann POVPC an den PAF-Rezeptor sowie CD36 binden und eine Signalkaskade auslösen. Die induzierten zellulären Effekte werden mit der Entstehung von Atherosklerose in Verbindung gebracht. Daneben kann POVPC auch zu einer Aktivierung von TNF  $\alpha$  führen, welcher mit proinflammatorischen Prozessen in Verbindung steht (Pegorier *et al.*, 2006).

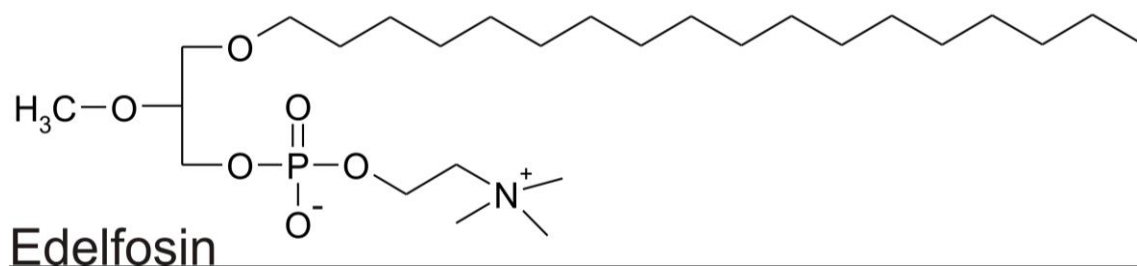
### 1.2.3. Ether-Lipide

Während viele Glycerophospholipide Ester Bindungen an der *sn*-1 und *sn*-2 Position aufweisen, gibt es auch Glycerophospholipide die an der *sn*-1 Position eine Ether-Bindung tragen (siehe Abbildung 3). Diese Alkylacyl-Phospholipide sind Bestandteile aller tierischen Zellmembranen. Synthetisch erzeugte Ether-Lipide, wie Edelfosin (ET-18-OCH<sub>3</sub>, Abbildung 4) wurden bereits zur Behandlung von Tumoren eingesetzt, da diese auf eine Vielzahl von Neoplasien cytotoxische Wirkungen haben (Berdel und Okamoto, 1990; Rüter *et al.*, 1999).



**Abbildung 3: Chemische Struktur der Ether-Lipide E-PGPC und E-POVPC.**

Im Unterschied zu PGPC und POVPC weisen diese Lipide an der *sn*-1 Position einer Ether-Bindung anstatt einer Ester-Bindung auf.



**Abbildung 4: Chemische Struktur des Lysolipids Edelfosin.**

Wie E-PGPC und E-POVPC besitzt dieses Lipid an der *sn*-1 Position eine Ether-Bindung. Es ist somit ähnlich aufgebaut wie PAF, enthält jedoch in Position *sn*-2 eine Methyl- statt einer Acetyl-Gruppe.

### 1.3. Apoptose – Nekrose

Im zellulären Geschehen spielen zwei Formen des Zelltods eine Rolle, Apoptose und Nekrose.

Apoptose unterscheidet sich in wesentlichen Merkmalen von Nekrose. Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod, welcher definierten Signalwegen folgt und unter Erhaltung der Membranintegrität abläuft (Majno und Joris, 1995). Es kommt zur Chromatinkondensation und es werden apoptotische Vesikel gebildet. Diese werden schlussendlich von Makrophagen abgebaut,



weshalb das umliegende Gewebe intakt bleibt (Zimmermann *et al.*, 2001). Im Unterschied dazu versteht man unter Nekrose die unkontrollierte Zerstörung der Zelle. Diese ist für den Organismus fatal, da Stoffe und Enzyme austreten die außerhalb der Zellen Entzündungen hervorrufen und eine toxische Wirkung haben (Mirnikjoo *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2001; Löffler, 2004).

### 1.3.1. Induktion von Apoptose

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen beschrieben die zur Induktion von Apoptose führen können. Zwei wichtige Prozesse laufen über sogenannte „Death Receptors“ an der Zelloberfläche und/oder über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Zimmermann *et al.*, 2001).

#### Apoptoseinduktion durch „Death Receptors“

Die sogenannten „Death Receptors“ TNF R1, Fas, DR3/WS und TRAIL/Apo-2L können zur Aktivierung der apoptotischen Signalkaskade führen. Dazu besitzen alle Death Receptors eine extrazelluläre Binde-Domäne sowie eine intrazelluläre Death-Domäne über die das Signal des Liganden weitergeleitet wird. Dabei wird entweder einer Reihe an Caspasen aktiviert (bis hin zur Effektorcaspase 3) oder es kommt über die Aktivierung von Kinasen zur Expression des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.

Im Fall der Aktivierung von Fas kommt es nach Bindung des Fas Liganden (FasL) zur Bildung eines Signalkomplexes aus FADD (Fas Associated Death Domain) und Rezeptor und in der Folge zur Aktivierung von Caspasen. Es wird angenommen, dass der Signalweg von DR3 ähnlich abläuft. Hingegen kann der TRAIL Signalweg auch ohne FADD fortschreiten (Zimmermann *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu diesen vergleichsweise einfachen Signalkaskaden ist die von TNF R1 komplexer. Hier wird neben FADD auch TRADD, ein weiteres Adapterprotein, benötigt (Wajant *et al.*, 2003, Zimmermann *et al.*, 2001). Nach der Initiierung des Signalwegs kommt es zur Aktivierung von Caspasen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Aspartat-spezifische Cystein-Proteasen, deren Aktivierung zum programmierten Zelltod führt. Am Beginn dieser Kaskade kommt es zur Aktivierung der Initiator-Caspasen 2, 8, 9 und 10. Diese wiederum können zur

Aktivierung der sogenannten Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die für die Mehrheit der apoptotischen Effekte verantwortlich sind, führen. Die Caspasen liegen als inaktive Proenzyme vor und werden erst durch proteolytische Spaltung aktiv (Jänicke *et al.*, 1998; Zimmermann, 2001). Der vollständige Ablauf dieser Signalkaskaden ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt.

#### Mitochondrielle Aktivierung von Apoptose

Neben der Aktivierung der oben beschriebenen Signalkaskaden ist auch eine mitochondriell bedingte Aktivierung des programmierten Zelltodes möglich. Dabei steht die Freisetzung von Cytochrom C im Mittelpunkt. Diese wird sowohl von Pro- als auch von Anti-Apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie reguliert. Während unter physiologischen Bedingungen Anti-Apoptotische Mitglieder wie Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w und Mcl-I die Freisetzung von Cytochrom C verhindern, kann die Translokation der proapoptotischen Proteine Bax, Bid und Bad zu den Mitochondrien die apoptotische Signalkaskade auslösen. Die Translokation von Bid wird durch die Aktivierung von Caspase 8 ausgelöst. Deshalb wird angenommen, dass auch der mitochondrielle Signalweg mit der Rezeptor-aktivierten Apoptose in Verbindung steht. Durch die Translokation der proapoptotischen Proteine kommt es zur Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran, wobei Cytochrom C ins Cytoplasma freigesetzt wird. Letzteres induziert die Bildung des sogenannten „Apoptosomes“, einem Komplex aus Cytochrom C, Apaf1 (Apoptotic Protease activating Factor 1) und Procaspase 9. Diese Caspase ist, nach Zustandekommen des Apoptosomes, in der Lage Procaspase 3 zu spalten was wiederum zu Apoptose und den damit verbundenen morphologischen Veränderungen der Zelle führt (Makpol *et al.*, 2012; Zamazami *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 2001).

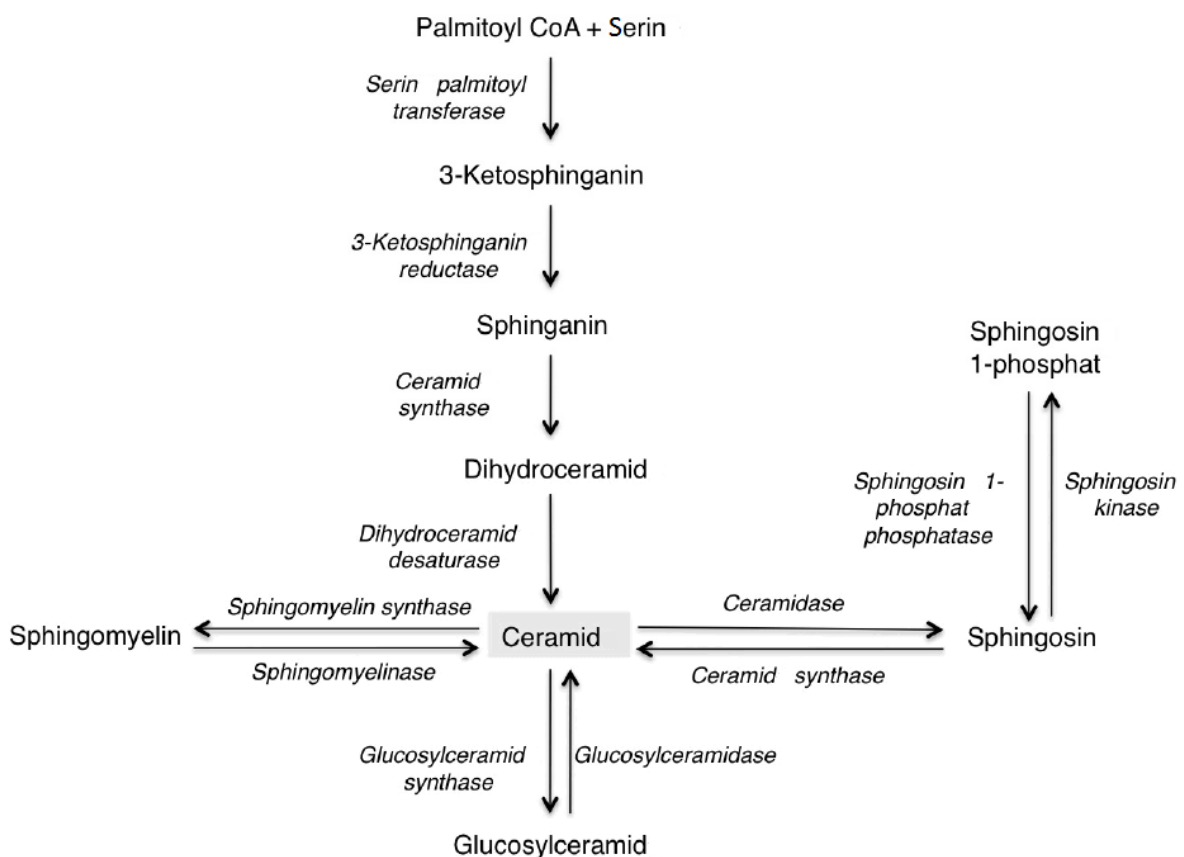
## **1.4. Der Sphingomyelin - Ceramid Rheostat**

Sphingomyelin ist ein wichtiger Baustein menschlicher Zellmembranen. Seine Metaboliten und Präkursoren (z.B. Ceramid) spielen als Signalmoleküle eine wichtige Rolle. Daher ist dieses Lipid von enormer Bedeutung für die Membran-Homöostase und die zelluläre Biochemie (Gault *et al.*, 2012).

### 1.4.1. Entstehung von Ceramid

Der „Second-Messenger“ Ceramid spielt eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Regulation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose.

Für die Entstehung von Ceramid gibt es mehrere Möglichkeiten. Neben der *de novo* Synthese und der Spaltung von Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen kann dabei auch die Umwandlung von Sphingosin zu Ceramid im Rahmen des „Salvage Pathway“ eine Rolle spielen. (Hannun und Luberto, 2000).



**Abbildung 5: Ceramid Metabolismus.**

Diese Abbildung wurde in abgeänderter Form übernommen aus „Mammalian ceramid synthases“ von Levy und Futerman (2010).

#### de novo Ceramid Synthese

Für die *de novo* Ceramid-Synthese sind mehrere Enzyme des ER verantwortlich. Dabei kommt es zu Beginn zur Bildung von 3-Ketosphinganin aus Serin und Palmitoyl CoA. Durch Reduktion kommt es anschließend zur Bildung von Sphinganin, welches durch eine Ceramid Synthase in das Ceramid Vorläufermolekül Dihydroceramid umgewandelt werden kann. Die letzte

Verbindung wird durch eine Desaturase zu Ceramid reduziert. Eine weitere Möglichkeit ist die Umwandlung von Spingosin zu Ceramid, welche ebenfalls durch Ceramid Synthasen katalysiert wird. (Gault *et al.*, 2012).

Ceramidsynthasen sind besonders wichtige Enzyme in der *de novo* Ceramid Synthese. Im menschlichen Organismus sind sechs Ceramid Synthase Isoformen (CerS 1-6) bekannt. Diese werden in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert und bilden Ceramide mit unterschiedlichen Acyl-Kettenlängen. Beispielsweise werden CerS3 und CerS4 besonders stark in der Haut gebildet und mit der Bildung von Ceramid mit N-Acylketten von C18 bis C22 (CerS4) und C24 (CerS3) in Verbindung gebracht. Kürzerkettige Ceramide werden hingegen von CerS1 (Cer-Acylreste C18), CerS5 (Cer- Acylreste C16) und CerS6 (Cer-Acylreste C14 und C16) gebildet (Levy und Futerman, 2010; Pewzner-Jung *et al.*, 2006).

#### Ceramidbildung durch Sphingomyelinasen

Neben der *de novo* Synthese kann Ceramid auch durch Hydrolyse von Sphingomyelin gebildet werden. Die dafür verantwortlichen Enzyme werden als Sphingomyelinasen bezeichnet (Gault *et al.*, 2012).

Diese Enzyme spalten Sphingomyelin durch Hydrolyse an der Kopfgruppe in Phosphocholin und Ceramid. In der Zelle wird der Phosphocholinrest auf ein Diacylglycerol übertragen.

In Abhängigkeit vom pH Optimum wird zwischen alkalischen, neutralen (nSMase) und sauren Sphingomyelinasen (aSMase) unterschieden. Während die alkalische Sphingomyelinase lediglich bei der Verdauung von Sphingomyelin im Dünndarm eine Rolle spielt, regulieren neutrale und saure Sphingomyelinase einen Teil des Sphingolipid Stoffwechsels in den Zellen (Gault *et al.*, 2012).

Bei den neutralen SMasen kann zwischen  $Mg^{2+}$  abhängigen und  $Mg^{2+}$  unabhängigen SMasen unterschieden werden. Während über die  $Mg^{2+}$  unabhängige SMase sehr wenig bekannt ist, wird die  $Mg^{2+}$  abhängige SMase unter anderem mit Apoptose in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu den neutralen SMasen, die ihr pH Optimum bei ca. pH 7 haben, weist die saure Sphingomyelinase aufgrund ihrer Lokalisierung in den Lysosomen ein pH-Optimum im sauren Bereich auf. Daneben existiert auch eine sekretorische SMase (sSMase) die sich lediglich durch das Ziel ihres Precursors am Golgi und

der damit verbundenen Sekretion von der sauren SMase unterscheidet (Goni und Alonso, 2002).

### **1.4.2. Ceramid und Apoptose**

Die Ceramid-Bildung ist mit Apoptose in verschiedenen Zelltypen und unter verschiedenen Stressbedingungen assoziiert.

Es wurde gezeigt, dass oxidierte Phospholipide über die Aktivierung von aSMase und der damit verbundenen Ceramidbildung in arteriellen glatten Muskelzellen, Makrophagen und auch in einigen Melanomzelllinien Apoptose induzieren können (Loidl *et al.*, 2003; Stemmer *et al.*, 2012; Claudia Ramprecht, Dissertation, TU Graz, 2013). Wegen ihrer zentralen Rolle in Zellproliferation und Apoptose werden die Enzyme des Ceramid Rheostats zum Ziel von Behandlungsstrategien von Tumoren. Diese basieren auf Bestrahlung und Chemotherapeutika inklusive synthetischer Lipide. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass Ceramid eine Komponente eines komplexen metabolischen Sphingolipid-Netzwerkes ist und mit zahlreichen anderen bioaktiven Sphingolipiden im „Gleichgewicht“ steht, die unter Umständen auch antiapoptotisch sein können (z.B. Sphingosinphosphat) (Kolesnick, 2002).

## 2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden ob oxidierte Phospholipide Apoptose bevorzugt in Krebszellen auslösen können. Zu diesem Zweck haben wir die cytotoxische Wirkung von PGPC, POVPC und ihren 1-O-Alkyletheranalogen auf kultivierte Zellen von weißem Hautkrebs und immortalisierten Keratinozyten (Kontrolle) untersucht. Wir haben herausgefunden, dass die oxidierten Phospholipide selektiv auf die Krebszellen wirken. Die toxische Wirkung von PGPC ist assoziiert mit der Aktivität von aSMase. POVPC induzierte die Bildung von Ceramid jedoch ohne Aktivierung der aSMase. Möglicherweise sind hier die *de novo* Ceramid Synthese oder das Sphingolipid Recycling involviert. Die vorliegenden Arbeiten können als Basis für weitere Versuche angesehen werden, um das therapeutische Potential der oxidierten Phospholipide, die körpereigene Substanzen sind, zu analysieren.

## 3. Methodik

### 3.1. Zellkultur

#### 3.1.1. Materialien

- DMEM High Glucose 1x Medium ohne Phenolrot, +4,5 g/L D-Glucose, +L-Glutamine, +25 mM HEPES, Natriumpyruvat von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- DMEM mit Phenolrot von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- Fetal Bovine Serum von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- RPMI Medium 1640 1x, -L-Glutamine von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- RPMI Medium 1640 1x, -L-Glutamine, -Phenolrot von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- Tissue Cultur Flask 75 cm<sup>2</sup> von SARSTEDT, Newton, USA
- Penicillin/Streptomycin (100x) von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- 25% wässrige Trypsin-EDTA Lösung 1x von Invitrogen™, Carlsbad, USA
- Countess® Automated Cell Counter von Life Technologies™, Carlsbad, USA
- Trypan Blue Stain 0.4% for use with the Countess® Automated Cell Counter von Life Technologies™, Carlsbad, USA
- Countess® Cell Counting Chamber Slides von Life Technologies™, Carlsbad, USA
- Zentrifuge Hettich Universal 320 von Hettich, Kirchlingern, Deutschland
- L-Glutamine 200 mM von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

### 3.1.2. Durchführung

#### HaCaT Zelllinie

Bei der HaCaT (Human Adult Low Calcium High Temperature Ceratinocytes) Zelllinie handelt es sich um eine spontan immortalisierte Keratinozyten Zelllinie (Boukamp *et al.*, 1988) welche von Univ.-Ass. Univ.-Doz. OA Dr. Helmut Schaidler, Medizinische Universität Graz- Klinische Abteilung für Dermatologie, zur Verfügung gestellt wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>.

Beim Kultivierungsmedium handelte es sich um DMEM mit Phenolrot und 10% FCS sowie 1 U/ml Penicillin/Streptomycin. Beim Medium für Inkubationsexperimente handelte es sich um DMEM ohne Phenolrot mit 0,1% oder 2% FCS sowie 1 U/ml Penicillin/Streptomycin.

Zum Splitten bzw. Aussäen der Zellen wurde mit 3 ml Trypsin (25% wässrige Lösung) für ca. 15 min bei 37°C im CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert und die Reaktion anschließend mit 10 ml DMEM mit Phenolrot abgestoppt. Die anschließende Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Countess<sup>®</sup> Automated Cell Counter. Dafür wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammern pipettiert. Die gewünschte Zellzahl wurde entnommen, abzentrifugiert (2 min bei 240g) und in dem benötigten Volumen an Medium (10% FCS) wieder aufgenommen.

#### SCC13 Zelllinie

Bei der SCC13 Zelllinie handelt es sich um Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (engl.: „**S**quamous **C**ell **C**arcinoma“). Die von einem Tumor im Gesicht abstammende Zelllinie wurde von James George Rheinwald, Ph.D., Harvard Medical School- Brigham and Women`s Hospital, übernommen.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>.

Beim Kultivierungsmedium handelte es sich um RPMI-1640 Medium mit Phenolrot, 10% FCS, 1 U/ml Penicillin/ Streptomycin sowie 4 mM L-Glutamin.

Bei dem für Inkubationsexperimente verwendeten Medium handelte es sich um RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot mit 0,1% oder 2% FCS, 1 U/ml Penicillin/Streptomycin sowie 4 mM L-Glutamin. Das Splitten bzw. Aussäen der



Zellen wurde wie für die HaCaT Zelllinie beschrieben durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde allerdings auf 5 min verkürzt.

## 3.2. MTT Viabilitäts-Assay

Das Tetrazoliumsalz MTT wird durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sowie der Mitochondrien zum wasserunlöslichen Formazan reduziert. Dies wird nach Lyse der Zellen sowie Solubilisierung mittels SDS über die Vermessung der Absorption bei 595 nm bestimmt. Dieser Wert wird als Maß für die Enzymaktivitäten des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien verwendet (Molecular Probes, 2002; Berridge *et al.*, 1996).

### 3.2.1. Materialien

- Vybrant<sup>®</sup> MTT Cell Proliferation Assay Kit (V 13154) von Molecular Probes, Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA
- 2,5 mg/ml MTT gelöst in sterilem PBS von Molecular Probes, Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA
- 10% w/v SDS gelöst in 0,01 M HCl von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) von MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol absolut p.A. von J.T.Baker, Center Valley, USA
- Staurosporin (aus *Streptomyces* sp.) von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Wasserstoffperoxid 30% von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Dulbecco`s PBS 1x without Ca & Mg von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Tissue Culture Plate 96-Well, Flat Bottom with Lid von SARSTEDT, Newton, USA
- Anthos 2010 Mikrotiterplattenleser von Anthos Labtec Instruments, Krefeld, Deutschland
- CHCl<sub>3</sub> von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- MeOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland

- PGPC und POVPC wurden nach der Methode von Moutzi *et al.* (2007) hergestellt oder von Avanti Polar Lipids bezogen.
- POPC wurde nach der Methode von Hermetter *et al.* (1989) hergestellt.
- PLPC wurde von Bachem AG bezogen.
- E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin wurden von E. Zenzmaier und A. Hermetter ausgehend von 1-O-Hexadecylglycerol synthetisiert.

### 3.2.2. Durchführung

Am Vortag des Versuches wurden je 75 000 Zellen/Well in 100  $\mu$ l Medium (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM) mit 10% FCS in einer 96 Well Platte ausgesät.

Am Versuchstag wurden definierte Mengen der Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC, Edelfosin, POPC oder PLPC in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  20:1 (v/v) gelöst. Die benötigten Lipidmengen wurden entnommen und das Lösungsmittel unter  $\text{N}_2$  Zustrom entfernt. Anschließend wurden die Lipide mittels Ethanolinjektion (Batzri und Korn, 1973) in 0,1% FCS Medium (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM) eingebracht (EtOH Konzentration: 1%).

Zu Beginn des Versuches wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und durch 100  $\mu$ l des Mediums (0,1% FCS) welches mit 5, 10, 25, 50, 100 sowie 250  $\mu$ M an Lipiden oder Kontrollproben supplementiert worden war, ersetzt.

Kontrollproben:

- Blank: 1% EtOH oder 1% DMSO in 0,1% FCS Medium
- Nekrose: 5 mM (HaCaT Zelllinie) oder 10 mM (SCC13 Zelllinie)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Medium mit 0,1% FCS
- Apoptose: 10  $\mu$ M STS (gelöst in DMSO) in Medium mit 0,1% FCS
- Negativ Kontrolle: Ohne Zugabe von MTT-Solution, stattdessen Zugabe von Medium (0,1% FCS) mit PBS
- POPC-Lipidkontrolle: Das in der Zellmembran vorkommende Lipid POPC wurde als Negativ-Kontrolle für den Zelltod mitgeführt.
- PLPC wurde als Positiv-Kontrolle für den Zelltod mitgeführt.

Die Zellen wurden mit den Lipiden bzw. Kontrollmedien für 2 h inkubiert.

Danach wurde das Medium abgesaugt und 100 µl Medium (0,1% FCS) sowie 10 µl MTT (2,5 mg/ml) pro Well zugegeben und weitere 4 h inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl SDS (10% w/v gelöst in 0,01 M HCl) ohne vorher das Medium abzusaugen. Es folgte wieder ein Inkubationsschritt von 4 h. Zum Abschluss wurden die Lösungen mit einer Sample-Pipette homogenisiert und am Anthos plate reader (Anthos Labtec Instruments, Krefeld, Deutschland) bei 595 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Winread 2.3. (Version 1.7 von Anthos Labtec Instruments, Krefeld, Deutschland) anhand der unterschiedlichen Extinktionen der Proben.

### 3.3. FACS-Messungen

Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) ist eine Form der Durchflusszytometrie und dient der Differenzierung von Zellen aufgrund der Aufnahme von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen sowie ihrer Größe und Form.

Dazu werden die Zellen einzeln in einen Flüssigkeitsstrom gezogen und von optischen Lasern abgetastet. Durch den sogenannten Forward Scatter (FSC), welcher sich auf einer Ebene mit dem Laser sowie der analysierenden Zelle befindet, wird die Beugung des Lichts aufgrund der Zellgröße ermittelt. Der Side Scatter (SSC) hingegen befindet sich im rechten Winkel zur Zelle und dient der Detektion des seitlichen Streulichts um Aufschluss über die Granularität der Zellen zu bekommen. Gleichzeitig erfolgt die Messung des Fluoreszenzsignals der Zelle. Dazu werden unterschiedliche fluoreszierende Farbstoffe genutzt und die Zellen so weiter differenziert.

Apoptotische Zellen exprimieren mehr Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche, weshalb sie mittels eines fluoreszenzmarkierten Annexin V, einem Phospholipid bindenden Protein, detektiert werden können. Bei nekrotischen Zellen hingegen wird die erhöhte Permeabilität der Zellmembran genutzt. Diese Zellen werden sowohl mit dem Nukleinsäure-bindenden Fluorophor Propidiumiodid als auch mit Annexin V markiert. Im Gegenzug zu nekrotischen und apoptotischen Zellen ist die Zellmembran von lebenden Zellen intakt, weshalb diese Zellen keinen der beiden Fluorophore aufnehmen.

Zusammenfassend kann man mit dieser Methode einerseits die Zellen anhand ihrer Größe und Form unterscheiden sowie die Zellen in nekrotische, apoptotische und lebende Zellen aufschlüsseln (Molecular Probes, 2010; BD Biosciences, 2012).

### 3.3.1. Materialien

- 5 ml FACS Röhren, 75x12 mm von SARSTEDT, Newton, USA
- 24 Well Cell Culture Plate with Lid von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- Dulbecco`s PBS 1x without Ca & Mg von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Aqua bidestillata sterilis von Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
- Ethanol absolut p.A. von J.T.Baker, Center Valley, USA
- CHCl<sub>3</sub> von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Staurosporin (aus *Streptomyces* sp.) von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO) von MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30% von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Alpha-D(+)-Glukose von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Alexa Fluor<sup>®</sup>-488 Annexin-V Dead Cell Apoptosis Kit von Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA
- 10x Annexin-V Binding Buffer von Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA
- Propidiumiodid 1,0 mg/ml von Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA
- CHCl<sub>3</sub> von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- MeOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- PGPC und POVPC wurden nach der Methode von Moutzi *et al.* hergestellt (2007) oder von Avanti Polar Lipids bezogen.
- E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin wurden von E. Zenzmaier und A. Hermetter ausgehend von 1-O-Hexadecylglycerol synthetisiert.

### 3.3.2. Durchführung

Am Vortag des Versuchs erfolgte das Aussäen von 150 000 (HaCaT Zelllinie) bzw. 125 000 (SCC13 Zelllinie) Zellen pro Well (24 Well-Platten) in 400 µl 10% FCS Medium (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM), sodass am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 80% erreicht wurde.

Am Versuchstag wurden die Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  20:1 (v/v) gelöst. Die benötigten Lipidmengen wurden entnommen und das Lösungsmittel unter  $\text{N}_2$  Zustrom entfernt. Anschließend wurden die Lipide mittels Ethanolinjektion (Batzri und Korn, 1973) in 0,1% FCS Medium (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM) eingebracht (EtOH Konzentration: 1%).

Der Medium-Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 400 µl 25 µM oder 50 µM Lipidsuspension für 6h inkubiert.

Folgende Kontrollen wurden in Doppelbestimmungen bei jeder Messung mitgeführt:

- Ethanol-Kontrolle: Inkubation mit 1% EtOH in Medium mit 0,1% FCS diente zur Überprüfung der Viabilität der Zellen mit einer den Lipidlösungen äquivalenten Ethanol Konzentration.
- Autofluoreszenz Kontrolle: Inkubation mit 1% EtOH in Medium mit 0,1% FCS ohne Zugabe von Annexin und PI. Kontrolle zur Überprüfung des Mess-Systems sowie der Zellen auf eine eventuell vorhandene Eigenfluoreszenz.
- Staurosporin-Kontrolle: Inkubation mit 10 µM in DMSO gelöstem STS (HaCaT Zelllinie) bzw. 20 µM STS (SCC13 Zelllinie) in Medium mit 0,1% FCS. Positivkontrolle für Apoptose.
- DMSO Kontrolle: 1% DMSO in 0,1% FCS Medium.
- $\text{H}_2\text{O}_2$  Kontrolle: 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Medium mit 0,1% FCS. Positivkontrolle für Nekrose.

Unmittelbar vor Ablauf der Inkubationszeit wurden Durchlichtaufnahmen (100x Vergrößerung) der Zellen in den Wells gemacht um morphologische Veränderungen festhalten zu können. Dazu wurde das Mikroskop Axiovert 35

(Zeiss, Jena, Deutschland) sowie die Kamera Axio Cam HRC (Zeiss, Jena, Deutschland) genutzt.

Nach Ablauf der 6h wurde der Zell-Überstand in FACS Röhren gesammelt und die Zellen mit 200 µl Trypsin gelöst. Die Reaktion wurde mit 600 µl 10% FCS Medium abgestoppt und die Zellsuspension in dasselbe FACS Röhren überführt. Die restlichen im Well verbliebenden Zellen wurden mit 600 µl 10% FCS Medium abgewaschen und ebenfalls in das FACS Röhren überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 2 min bei 240g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 4°C kaltem PBS mit 2% Glucose gewaschen, ohne es zu zerstören. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 2 min bei 240g. Der Überstand an PBS wurde abgesaugt und das Pellet in der Restflüssigkeit suspendiert. Anschließend wurde die Suspension in 100 µl Annexin Binding Buffer (1x Verdünnung in bidest. H<sub>2</sub>O) resuspendiert und 5 µl Annexin V sowie 5,5 µl PI (100 µg/ml Working Solution in Annexin Binding Buffer) zugegeben. Das Gemisch wurde für 15 min lichtgeschützt und auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der 15 min erfolgte die Zugabe von 400 µl PBS mit 2% Glucose sowie die Vermessung der markierten Zellen am BD FACSCalibur Durchflusszytometer (BD Biosciences, San Jose, USA) durch die Software CellQuest Pro (BD Biosciences, San Jose, USA). Die Geräteeinstellungen wurden von der Methode nach Gabriel Pürstinger (Masterstudent am Institut für Biochemie, TU Graz) übernommen und laut den Tabellen 1 Tabelle 2 Tabelle 12 abgeändert.

**Tabelle 1: Geräteeinstellungen des FACSCalibur Durchflusszytometers zum Analysieren der HaCaT Zelllinie.**

Kanal	Detektor	Voltage (mV)	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	7,70	linear
P2	SSC	340	1,0	linear
P3	FL1	450	-	logarithmisch
P4	FL2	410	-	logarithmisch
<b>Kompensation:</b> FL1 -0,0% FL2				
FL2 -37,2% FL1				

**Tabelle 2: Geräteeinstellungen des FACSCalibur Durchflusszytometers zum Analysieren der SCC13 Zelllinie.**

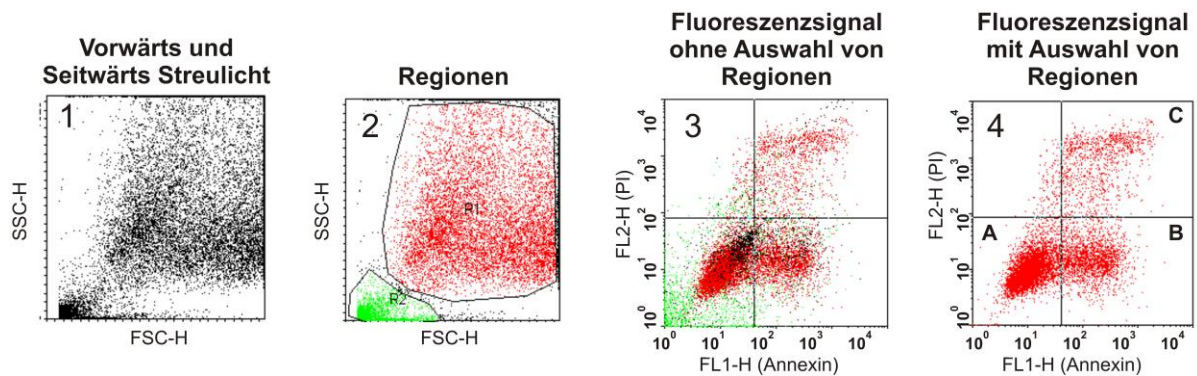
Kanal	Detektor	Voltage (mV)	AmpGain	Mode
P1	FSC	E-1	7,70	linear
P2	SSC	350	1,1	linear
P3	FL1	450	-	logarithmisch
P4	FL2	410	-	logarithmisch
<b>Kompensation:</b> FL1 -0,2% FL2				
FL2 -26,8% FL1				

### 3.3.3. Beispielhafte Auswertung einer FACS-Messung

Zu Beginn wurde anhand der Größe und Granularität der Zellen ein Gate (Region) am Gerät gezogen. Dieses schloss die Mehrheit an Zelltrümmern und überdurchschnittlich großen und/oder granulierten Zellen von der Messung aus. Bei jeder einzelnen Messung wurden 10 000 Zellen, die sich in der am Gerät ausgewählten Region befunden haben, analysiert.

Die statistische Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Software WinMDI 2.9 (Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA).

Zunächst wurde erneut zwischen Zelltrümmern und ganzen Zellen unterschieden. Die intakten Zellen wurden anschließend ihrem Fluoreszenzsignal zugeordnet. Die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen sowie nekrotischen Zellen erfolgte aufgrund der bei jeder Messserie mitgeführten Ethanol, Staurosporin sowie Wasserstoffperoxid-Kontrollen (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Beispielhafte Auswertung einer FACS-Messung.**

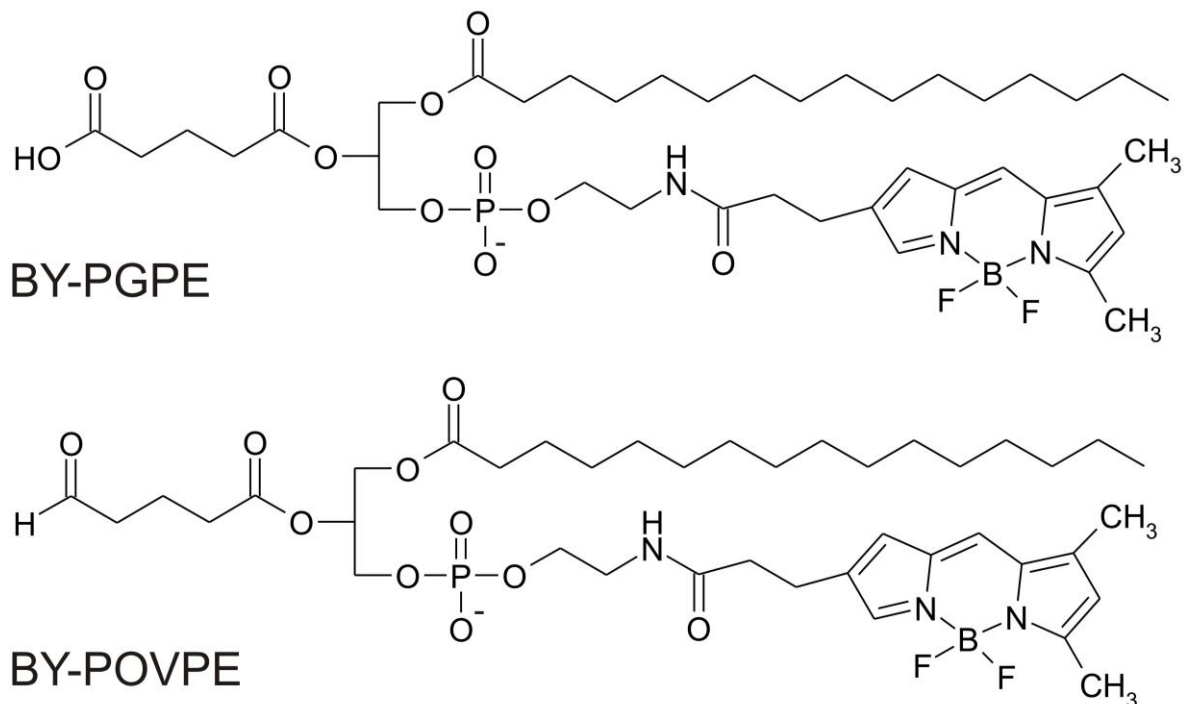
FACS-Messungen ermöglichen die Unterscheidung von apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen aufgrund der von ihnen aufgenommenen Farbstoffe Alexa Fluor 488<sup>®</sup> Annexin V (Marker für Apoptose) sowie PI (Marker für Nekrose). Lebende Zellen nehmen im Gegensatz zu nekrotischen und apoptotischen Zellen keinen der beiden Farbstoffe auf. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software Win MDI (Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA). Zu Beginn der Auswertung (1) sieht man dabei die Auftrennung der Zellen anhand ihrer Größe sowie Granularität durch das Seitwärts- und Vorwärts-Streulicht. Anschließend (2) wird zwischen Zelltrümmern (R2) und intakten Zellen (R1) unterschieden. Letztere werden im nächsten Schritt (3) ihrem Fluoreszenzsignal zugeordnet. Für die FACS-Messung werden nur intakte Zellen analysiert (4). In Quadrant A befinden sich die lebenden Zellen, die weder mit Annexin V noch mit Propidiumiodid markiert wurden. In Quadrant B befinden sich die Zellen, die nur Annexin V gebunden haben (apoptotische Zellen) und in Quadrant C befinden sich alle Zellen die sowohl Propidiumiodid als auch Annexin V aufgenommen haben und daher nekrotisch sind.

### 3.4. Aufnahme und Lokalisierung von Lipiden

Durch die Verwendung von Organell-spezifischen Fluoreszenzmarkern sowie oxidierten Lipiden welche mit BODIPY<sup>™</sup> markiert werden, kann die Lokalisierung dieser Lipide in lebenden Zellen verfolgt werden. Dazu wurden die Zellen mit den markierten oxidierten Phospholipiden BY-PGPE sowie BY-POVPE (siehe Abbildung 7) und Organell-spezifischen Fluorophoren für Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum oder die Plasmamembran inkubiert und anschließend mit geeigneten Filtern mikroskopiert.

Die Fluoreszenzbilder für die oxidierten Phospholipide und die Organellmarker wurden darauf mittels Corel Photo Paint X3 (Corel GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) übereinandergelegt.





**Abbildung 7: Chemische Struktur von BY-PGPE und BY-POVPE.**

Die BY-markierten Lipide wurden wie in Mouttzi *et al.* (2007) beschrieben hergestellt. Die Bodipy™-Markierung befindet sich direkt an der polaren Kopfgruppe der *sn*-3 Position.

### 3.4.1. Materialien

- Imaging Chambers CG 8 Wells, Cover Glass Bottom von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Lab-Tek® Chamber Slide™ 8 Well Glass Slide von NUNC®, Steinheim, Schweiz
- Dimethylsulfoxid (DMSO) von MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol absolut p.A. von J.T.Baker, Center Valley, USA
- BY- POVPE sowie BY-PGPE wurden nach Mouttzi *et al.* (2007) synthetisiert
- CHCl<sub>3</sub> und MeOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Dulbecco`s PBS 1x without Ca & Mg von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Cell Mask™ Deep Red plasma membrane stain von Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, USA
- ER-Tracker™ Red von Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, USA

- Mito Tracker Red CMXRos von Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, USA

### 3.4.2. Durchführung

#### Vorbereitung

Am Vortag der Versuche erfolgte das Aussäen von 15 000 Zellen/Chamber in 300 µl Medium mit 10% FCS (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM) in Chamber Slides. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht. Lab-Tek® Chamber Slide™ 8 Well Glass Slides wurden für die Mikroskopie bei 320x Vergrößerung verwendet, Imaging Chambers CG 8 Wells für die Mikroskopie bei 1000x Vergrößerung.

#### Herstellung der Lipidsuspensionen

5 nmol BY-POVPE oder BY-PGPE wurden in 10 µl Ethanol gelöst und die Lösung wurde in 990 µl Medium (0,1% FCS) eingebracht (Endkonzentration: 5 µM).

#### Durchführung

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 1x mit 300 µl Medium (0,1% FCS) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit 300 µl einer wässrigen Suspension von Mito Tracker Red CMXRos oder ER-Tracker™Red (siehe Tabelle 3).

Nach Absaugen der Suspension und zweimaligem Waschen mit 300 µl Medium folgte die Inkubation mit 300 µl einer 5 µM BY-POVPE bzw. BY-PGPE Suspension für 5 min bzw. 30 min. Bei der Inkubation mit Cell Mask™ Deep Red plasma membrane stain erfolgte die Lipidinkubation vor Inkubation mit dem Tracker. Abschließend wurde das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen nochmals mit 300 µl Medium (0,1% FCS) gewaschen und für die Mikroskopie mit 300 µl Medium (0,1% FCS) bedeckt.

**Tabelle 3: Inkubationsbedingungen der Organell-spezifischen Marker.**

	Inkubationszeit	Konzentration im Ink.-Medium	Stock Solution in DMSO
<b>Cell Mask™ Deep Red plasma membrane stain</b>	10 min	5 µg/ml	5 mg/ml
<b>Mito Tracker Red CMXRos</b>	15 min	0,3 µM	1 mM
<b>ER-Tracker™ Red</b>	20 min	1 µM	100 µM

Aufnahme und Bildbearbeitung

Für die Mikroskopie der Zellen wurde das Mikroskop Axiovert 35 (Zeiss, Jena, Deutschland) genutzt. Mit Hilfe der Axio Cam HRC (Zeiss, Jena, Deutschland) wurden jeweils eine Durchlichtaufnahme, sowie Aufnahmen durch einen für die BODIPY™-Lipide geeigneten (Filterset 09) und einen für den jeweiligen Tracker geeigneten Filter (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5) gemacht.

**Tabelle 4: Übersicht der Filter für die Fluoreszenzmikroskopie**

Filterset	Anregung (nm)	Strahlenteiler (nm)	Emission (nm)
<b>Filterset 26</b>	BP 575-625	FT 645	BP 666-718
<b>Filterset 14</b>	BP 510-560	FT 580	LP 590
<b>Filterset 09</b>	BP 450-490	FT 510	LP 520

**Tabelle 5: Filtereinstellungen am Mikroskop zur Aufnahme der Organell-spezifischen Marker.**

	Filterset	Extinktions Maximum	Emissions Maximum
<b>Cell Mask™ Deep Red plasma membrane stain</b>	26	649 nm	666 nm
<b>Mito Tracker Red CMXRos</b>	14	579 nm	599 nm
<b>ER-Tracker™ Red</b>	26	587 nm	615 nm
<b>BODIPY™</b>	09	505 nm	510 nm

Die Position der Chamberslides wurde zwischen den drei Aufnahmen nicht verändert um jeweils identische Zellen aufnehmen zu können.

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software Corel Photo Paint X3 (Corel GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Dabei wurden die Aufnahmen hinsichtlich Helligkeit, Kontrast und Intensität optimiert um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen. Anschließend wurden die beiden Fluoreszenzaufnahmen übereinander gelegt, um eine eventuelle Colokalisation erkennen zu können.

## 3.5. Scratch Assay

Bei diesem Migrations Assay wird durch die Entfernung eines vor dem Aussäen eingebrachten Inserts eine künstliche Wunde erzeugt. Die Breite der Wunde wird zu bestimmten Zeitpunkten vermessen und in Relation zur Breite unmittelbar nach Entfernung des Inserts angegeben (Liang *et al.*, 2007). Aus der Veränderung dieser Breite kann man auf die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen rückschließen.

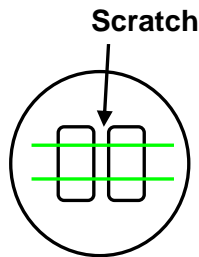
### 3.5.1. Materialien

- Culture-Inserts for Live Cell Analysis von Ibidi<sub>R</sub>, München, Deutschland
- 24 Well Cell Culture Plate with Lid von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- PGPC und POVPC wurden nach der Methode von Moutzi *et al.* (2007) hergestellt oder von Avanti Polar Lipids bezogen.
- E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin wurden von E. Zenzmaier und A. Hermetter ausgehend von 1-O-Hexadecylglycerol synthetisiert.
- Ethanol absolut p.A. von J.T.Baker, Center Valley, USA
- CHCl<sub>3</sub> und MeOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.5.2. Durchführung

Vor dem Aussäen der Zellen erfolgte das Einsetzen der Inserts in eine 24 Well Platte durch eine sterile Pinzette

Unterseitig wurden Linien gezogen um die Position der ersten Bildaufnahme wieder zu finden d.h. der Scratch befindet sich vertikal zur gezogenen Linie (siehe Abbildung 8)



**Abbildung 8: Darstellung Scratch Assay.**

Unterseitig gezogene Linien dienen der Markierung der ersten Bildaufnahme. Vertikal zu den gezogenen Linien (grüne Markierung) befindet sich die künstliche Wunde.

Danach erfolgte das Aussäen von 25 000 (SCC13) bzw. 30 000 (HaCaT) Zellen pro Kammer, d.h. 2x25 000 bzw. 2x30 000 Zellen pro Well in 2 x 70 µl Medium mit 10% FCS (SCC13 Zelllinie: RPMI-1640, HaCaT Zelllinie: DMEM).

Am Versuchstag wurden die Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:1 (v/v) gelöst und 5 nmol oder 10 nmol der Lipide, gelöst in 10 µl Ethanol, in 990 µl Medium mit 2% FCS eingebracht.

Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt und das Insert mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt. Anschließend wurden die Wells mit 400 µl Medium (2% FCS) gewaschen und die Zellen mit 5 µM oder 10 µM Lipidsuspension in 400 µl Medium (2% FCS) bei 37°C im CO<sub>2</sub> Brutschrank inkubiert.

Die Mikroskopie erfolgte unmittelbar nach Start der Inkubation sowie nach 1.5 h, 3 h, 4.5 h, 6 h, 9 h und 24 h (SCC13 Zelllinie) bzw. nach 3 h, 6 h, 9 h und 24 h (HaCaT Zelllinie). Mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 35 (Zeiss, Jena, Deutschland) sowie der Kamera Axio Cam HRC (Zeiss, Jena, Deutschland) wurde jeweils eine Aufnahme des Scratches oberhalb und unterhalb einer gezogenen Linie gemacht, um die Position der ersten Bildaufnahme nicht zu verändern.

Die Vermessung der Scratch Breite erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ 1.45 s (National Institute of Health, Bethesda, USA).

Dazu wurden jeweils 20 Werte von der Aufnahme oberhalb sowie unterhalb der gezogenen Linie gemittelt und die relative Scratch-Breite in Prozent zum Null-Stunden Wert ermittelt.

## 3.6. Sphingolipidanalyse

Die Zellen wurden mit den oxidierten Phospholipiden inkubiert und wie oben beschrieben geerntet. Danach wurde eine Lipidextraktion durchgeführt. Anschließend folgte die milde alkalische Hydrolyse der Ester-Lipide sowie die Analyse der Sphingolipidspecies mittels UPLC-MS.

### 3.6.1. Materialien

- BIO-RAD Farbstoffreagenz für die Proteinquantifizierung von BIO-RAD Laboratories, Hercules, USA
- Tissue Culture Dish 100x20mm von SARSTEDT, Newton, USA
- PGPC und POVPC wurden nach der Methode von Moutzi *et al.* (2007) hergestellt oder von Avanti Polar Lipids bezogen.
- Cell Scraper 25cm von SARSTEDT, Newton, USA
- Cellstar<sup>®</sup> Tubes 15ml von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- Dulbecco`s PBS 1x without Ca & Mg von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Reaction Tubes 1,5 ml attached cap von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- Albumin Fraction V  $\geq 98\%$  von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Pyrex Röhrchen von SciLabware, Staffordshire, Großbritannien
- $\text{CHCl}_3$  und MeOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- $\text{MgCl}_2$  von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tris und HCl beides von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- NaOH von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- EDTA von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- $\text{CH}_3\text{COOH}$  von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Phosphorsäure von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ammonium Acetat von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ameisensäure von Roth, Karlsruhe, Deutschland

- Leucine Enkephaline [MH<sup>+</sup>] (m/z 556.2771) von SIGMA ALDRICH<sup>®</sup>, St.Louis, USA
- Isopropanol von Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 3.6.2. Durchführung

Am Vortag der Analyse wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml RPMI-1640 Medium mit 10% FCS in 10 cm Petri Schalen ausgesät um am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 80% zu erreichen.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Injektion von 200 nmol PGPC oder POVPC gelöst in 40  $\mu$ l EtOH in 4 ml RPMI-1640 Medium mit 0,1% FCS (ohne Phenolrot) (Batzri und Korn, 1973).

Die Zellen wurden 2x mit 6 ml RPMI-1640 Medium (0,1% FCS, ohne Phenolrot) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 4 ml RPMI-1640 Medium (0,1% FCS, ohne Phenolrot) mit 1% EtOH und 50  $\mu$ M PGPC oder POVPC für 6 h inkubiert.

Als Kontrollmedium diente RPMI-1640 Medium mit 0,1% FCS (ohne Phenolrot) und 1% EtOH.

Nach Ablauf der 6h wurden die Zellen im Inkubationsmedium gescrapt sowie in ein 15 ml Röhrchen auf Eis transferiert.

Die Petri Schale wurde 1x mit 3 ml eiskaltem PBS gespült, die Zellreste wurden nochmals gescrapt und mit den zuvor gescrapten Zellen vereinigt.

Um die Zellen zu waschen, wurde bei 339 g bei 4°C für 7 min zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R von Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml PBS (eiskalt) resuspendiert.

0,5 ml der Zellsuspension wurden für eine Proteinbestimmung nach Bradford verwendet.

Die restlichen 4,5 ml wurden in ein Pyrex-Röhrchen überführt und bei 339 g und 4°C für 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Das Zellpellet wurde in 3 ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1, v/v) resuspendiert, gevortext sowie 1 h bei 4°C und 1500 rpm geschüttelt.

Währenddessen wurde ein Bradford-Protein Assay durchgeführt.

Nach Ablauf der 1 stündigen Inkubation wurden 700 µl  $MgCl_2$  Lösung (0,036%) zugegeben. Anschließend wurden die Proben wieder bei 4°C für 15 min geschüttelt und bei 676 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Die  $CHCl_3$  Phase wurde in ein neues Pyrex-Röhrchen überführt. Das Lösungsmittel wurde entfernt. Die Lipid-Proben wurden über Nacht bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde eine milde alkalische Hydrolyse durchgeführt.

#### Bradford Protein Assay

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford durch Messung der Absorption bei 595 nm (Bradford, 1975).

Dazu wurden 0,5 ml der Zellsuspension bei 676 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 0,5 ml Tris/HCl (50 mM; pH=7,4) resuspendiert.

Das Aufschließen der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (10 Impulse) auf Eis (Labsonic U von B.Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland).

Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaction Tube überführt sowie erneut bei 20817 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die eigentliche Proteinbestimmung erfolgte nach Erstellung einer Kalibrationsgeraden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BSA (0-20 µl einer 0,1442 mg/ml Lösung BSA in  $H_2O$ ) in 200 µl BIO-RAD Farbstoffreagenz. Die Vermessung der Absorption erfolgte am Anthos 2010 Mikrotiterplattenleser mit Hilfe der Software Winread 2.3 Software (Version 1.7) von Anthos Labtec Instruments, Krefeld, Deutschland.

#### Milde alkalische Hydrolyse

Zu den Lipidproben wurden 400 µl  $CHCl_3/MeOH/H_2O$  (16:16:5, v/v/v) gegeben. Dann wurde kurz gevortext. Danach wurden 400 µl NaOH-Lösung (0,2 M in MeOH) zugegeben und die Proben für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl EDTA-Lösung in  $H_2O$  (0,5 M) sowie von 150 µl 1 M  $CH_3COOH$  in  $H_2O$  und ein kurzes Vortexen der Proben.

Nach Zugabe von 1 ml  $CHCl_3$  zur Extraktion wurden die Proben abermals gevortext und 5 min am Überkopfschüttler durchgemischt.

Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 1878 g bei Raumtemperatur gefolgt vom Überführen der  $CHCl_3$  Phase in ein Pyrex-Röhrchen.



Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der Lipid-Rückstand wurde in 1 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1, v/v) aufgenommen, in ein verschraubbares Glasröhrchen überführt, wieder vom Lösungsmittel befreit und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### Sphingolipidanalyse

Die Sphingolipidanalyse wurde mittels UPLC-MS von Ass.Prof. Dr. Gerald N. Rechberger, Institut für molekulare Biowissenschaften, Karl-Franzens Universität Graz, durchgeführt.

Die Lipid-Proben wurden zuerst in 1 ml  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1, v/v) aufgenommen und anschließend im Verhältnis 1:5 (v/v) mit Isopropanol verdünnt. Für die Analyse wurde das AQUITY-UPLC System mit einer BEH-C18 Säule (2,1x150mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) von Waters (Eschborn, Deutschland) verwendet (Säulentemperatur:  $50^\circ\text{C}$ ). Für die Lipid-Trennung wurde ein binärer Lösungsmittel-Gradient verwendet. Laufmittel A:  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (1:1, v/v), Laufmittel B: 2-Propanol. Beide Laufmittel enthielten 8  $\mu\text{M}$  Phosphorsäure, 10 mM Ammonium Acetat und 0,1 Vol % Ameisensäure. Für die Analyse wurde ein SYNAPT™ G1 qTOF HD Massenspektrometer von Waters (Eschborn, Deutschland) mit einer ESI Quelle genutzt. Als Kontrolle wurde Leucine Enkephaline  $[\text{MH}^+]$  (m/z 556.2771) im Lock-Spray eingesetzt. Die Datenaquisition erfolgte mit Hilfe der Software Mass Lynx 4.1 von Waters (Eschborn, Deutschland). Für die Auswertung wurde die Software „Lipid Data Analyser“ (Hartler *et al.*, 2011) herangezogen.

Die Auswertung erfolgte durch Normieren der absoluten Menge an Lipid (Sphingomyelin und Ceramid Gesamtmenge) auf die Proteinmenge der jeweiligen Probe.

## **3.7. Assay zur Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase**

Das Prinzip des Fluoreszenzassays zur Detektion der Aktivität der sauren Sphingomyelinase beruht auf der Aktivitäts-abhängigen Spaltung von NBD-Sphingomyelin zu NBD-Ceramid. Bei dieser Methode werden die Zellen geerntet, lysiert und das Lysat zusammen mit NBD-Sphingomyelin als Substrat inkubiert.

Anschließend wird ein Lipidextrakt des Reaktionsgemisches mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Fluoreszenz-Intensität des NBD- Sphingomyelin sowie NBD-Ceramid Spots vermessen. Aus der Bildung des fluoreszierenden Ceramids kann ein Rückschluss auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase gewonnen werden (Loidl *et al.*, 2002).

### 3.7.1. Materialien

- BIO-RAD Farbstoffreagenz für die Proteinquantifizierung von Biorad Laboratories, Hercules, USA
- Tissue Culture Dish 60x15 mm von SARSTEDT, Newton, USA
- PGPC und POVPC wurden nach der Methode von Moutzi *et al.* (2007) hergestellt oder von Avanti Polar Lipids bezogen.
- NBD-Dodecanoyl-Sphingomyelin wurde von E. Zenzmaier und A. Hermetter am Institut für Biochemie, TU Graz hergestellt.
- Cell Scraper 25cm von SARSTEDT, Newton, USA
- Cellstar<sup>®</sup> Tubes 15 ml cap von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- Dulbecco`s PBS 1x without Ca & Mg von PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Reaction Tubes 1,5 ml attached cap von Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
- Albumin Fraction V ≥98% von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- CHCl<sub>3</sub> und MeOH beides von Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Saurer Lysepuffer, pH 5,0
  - 250 mM Natriumacetat von Roth, Karlsruhe, Deutschland
  - 0,2 % Triton von Roth, Karlsruhe, Deutschland
  - pH mit Essigsäure eingestellt
- Saurer Reaktionspuffer, pH 5,0
  - 250 mM Natriumacetat von Roth, Karlsruhe, Deutschland
  - 1 mM EDTA von Roth, Karlsruhe, Deutschland
  - pH mit Essigsäure eingestellt
- Tetrahydrofuran von Fluka, St.Louis, USA
- TLC Silica gel 60 von MERCK, Darmstadt, Deutschland

### 3.7.2. Durchführung

Am Vortag des Versuches wurden  $1,25 \times 10^6$  Zellen in 5 ml RPMI-1640 Medium mit 10% FCS in einer 6 cm Petri Schale ausgesät um am Versuchstag eine Konfluenz von ca. 80% zu haben.

Unmittelbar vor dem Versuch erfolgte die Injektion von 60  $\mu$ l einer ethanolischen Lösung mit 300 nmol PGPC oder POVPC in 6 ml RPMI-1640 Medium mit 0,1% FCS (ohne Phenolrot).

Die Zellen wurden einmal mit 3 ml RPMI-1640 Medium (0,1% FCS, ohne Phenolrot) gewaschen und mit 2 ml RPMI-1640 Medium (0,1% FCS, ohne Phenolrot) mit 1% EtOH sowie 50  $\mu$ M PGPC oder POVPC für 0, 15, 30 sowie 60 min bei 37°C inkubiert.

Als Kontrollmedium diente 1% EtOH in RPMI-1610 Medium (0,1% FCS, ohne Phenolrot).

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen im Inkubationsmedium gescrapt und in ein 15 ml Röhrchen auf Eis transferiert. Die Petri Schale wurde einmal mit 3 ml eiskaltem PBS gespült, die Zellen wurden wiederholt gescrapt und dann die Suspension mit den zuvor gescrapteten Zellen vereinigt. Fortan wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Es folgte die Zentrifugation der Zellsuspensionen für 10 min bei 264 g und 4°C (Zentrifuge 5810 R von Eppendorf, Hamburg, Deutschland).

Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 40  $\mu$ l saurem Lysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Röhrchen überführt. Die Lyse der Proben erfolgte 1 h auf Eis, wobei alle 15 min gevortext wurde. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Lysate 10 min bei 208 g und 4°C abzentrifugiert (Zentrifuge 5417 R von Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaction Tube überführt. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (Beschreibung siehe Durchführung „Sphingolipidanalyse“).

Als Stock-Lösung wurde eine Lösung von NBD-Sphingomyelin in THF hergestellt (1 nmol/ $\mu$ l). Pro Probe wurden 2 nmol/2 $\mu$ l entnommen und zu 200  $\mu$ l saurem Reaktionspuffer gegeben.

Das Zelllysat wurde mit saurem Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l gebracht, mit 200  $\mu$ l der Substratlösung (siehe oben) vermischt und 30 min bei

37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei erfolgte die Spaltung von NBD-Sphingomyelin zu NBD-Ceramid proportional zur aSMase Aktivität.

Nach Ablauf der 30 min wurden 300 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1, v/v) zugegeben, die Proben kurz gevortext sowie abzentrifugiert. Die Wasserphase wurde entfernt und 15 µl der CHCl<sub>3</sub> Phase auf eine Kieselgelplatte aufgebracht. Die chromatographische Auftrennung erfolgte mittels CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:25:4, v/v/v) als Laufmittel.

Nach Trocknung der Dünnschichtplatten wurden die Fluoreszenzintensitäten der NBD-Sphingomyelin sowie NBD-Ceramid Spots mittels einer CCD-Kamera (Herolab E.A.S.Y RH von Herolab, Wiesloch, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm (Intensität 0,08) unter UV Licht vermessen. Die Auswertung der Spotintensitäten erfolgte mit Hilfe der Software EasyWin32 von Herolab (Wiesloch, Deutschland).

## 4. Resultate

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der oxidierten Phospholipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin auf die Viabilität von weißen Hautkrebszellen im Vergleich zu Keratinozyten erforscht werden. Mögliche zugrunde liegende Pfade sollten analysiert, und so Rückschlüsse auf die Cytotoxizität der oxidierten Phospholipide auf Hautkrebszellen gewonnen werden.

### 4.1. Überprüfung der Zellviabilität mittels MTT Assay

Das Ziel dieses Assays war Auskunft über die Viabilität von HaCaT sowie SCC13 Zellen nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an oxidierten Phospholipiden zu erhalten.

Der MTT Assay basiert auf der Umsetzung von MTT zu Formazan, was durch Enzyme des ER sowie der Mitochondrien geschieht und durch Vermessung der Absorption bei 595 nm nachgewiesen werden kann (Berridge *et al.*, 1996; Molecular Probes, 2002). Infolgedessen kann der Anteil an lebenden Zellen bestimmt werden, und so auf die Cytotoxizität der oxidierten Phospholipide rückgeschlossen werden.

Für diesen Assay wurden sowohl HaCaT als auch SCC13 Zellen für 2h mit 5, 10, 25, 50, 100 sowie 250  $\mu$ M der oxidierten Phospholipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC und Edelfosin inkubiert. Als Positiv-Kontrolle für den Zelltod wurde das Lysolipid PLPC mitgeführt, als Negativ-Kontrolle für den Zelltod diente das physiologisch in Zellmembranen vorkommende Lipid POPC. Die Zellviabilität in Prozent der EtOH Kontrolle wurde ermittelt und in Abbildung 9 dargestellt.

Dabei zeigt Abbildung 9-A die Ergebnisse der HaCaT Zelllinie und Abbildung 9-B die Ergebnisse der SCC13 Zelllinie.

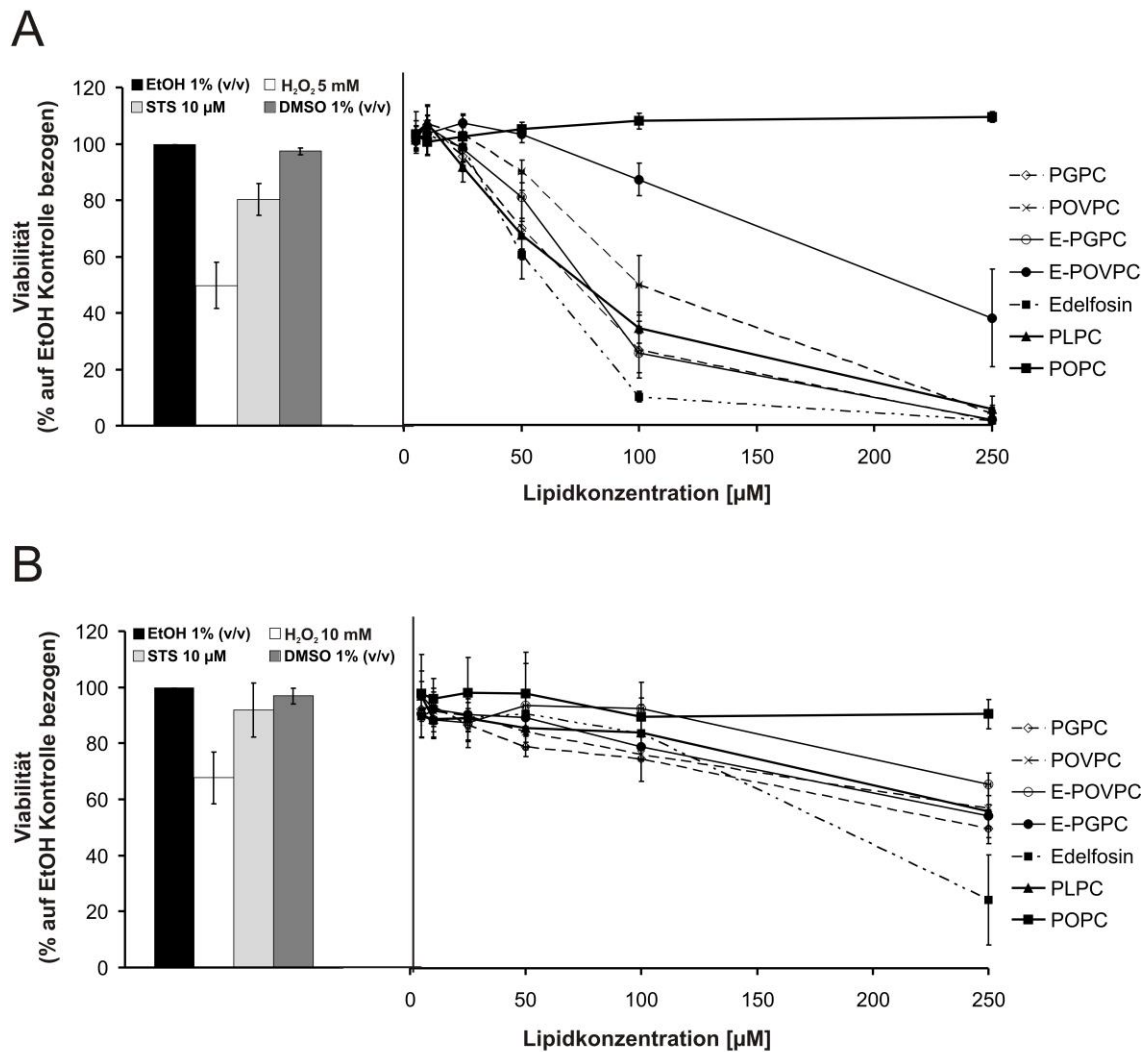
Es zeigte sich, dass POPC auch in höheren Konzentrationen keinen Einfluss auf die Viabilität der beiden Zelllinien hat. Im Gegenzug nimmt die Viabilität beider Zelllinien nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an PLPC ab.

Den stärksten Effekt auf die Viabilität der HaCaT Keratinozyten übt Edelfosin aus. Hier sind nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Lipidkonzentration nahezu keine Zellen mehr vital.

Nach Inkubation mit PGPC, POVPC sowie E-PGPC ist bei Konzentrationen ab 50  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine deutliche Verringerung der Zellviabilität zu erkennen. Der Effekt von E-POVPC auf die HaCaT Keratinozyten scheint etwas schwächer zu sein. Bei Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  nimmt jedoch auch hier der Prozentsatz lebender Zellen erheblich ab.

Die Viabilität der SCC13 Zelllinie nimmt nach 2h Inkubation mit PGPC, POVPC sowie E-PGPC ebenfalls stark ab. Die Viabilitätsabnahme der mit E-POVPC inkubierten Zellen ist wie schon bei der HaCaT Zelllinie auch hier etwas schwächer. Nach Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  Edelfosin zeigt sich, wie auch bei der HaCaT Zelllinie, eine besonders starke Abnahme der Zellviabilität.

Gesamt betrachtet ist die Abnahme der Viabilität der SCC13 Zelllinie nach Inkubation mit den unterschiedlichen oxidierten Phospholipiden zwar ebenfalls signifikant, jedoch schwächer als die der HaCaT Keratinozyten.



**Abbildung 9: Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Viabilität der HaCaT Zelllinie sowie SCC13 Zelllinie.**

Die Abbildung zeigt die Viabilitätsabnahme der HaCaT (A) sowie SCC13 (B) Zelllinie nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen an oxidierten Phospholipiden. Die HaCaT Keratinozyten wurden in DMEM (0,1% FCS (v/v)) bzw. SCC13 Zellen in RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)) für 2h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC und Edelfosin (5 bis 250  $\mu\text{M}$ ) sowie den Kontrollen (1% EtOH (v/v) (Negativ-Kontrolle), 5 bzw. 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nekrose- Kontrolle), 10  $\mu\text{M}$  STS (Apoptose- Kontrolle) und 1% DMSO (v/v)) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4h mit MTT inkubiert und danach 4h mit SDS lysiert. In Abhängigkeit vom Zustand des ER sowie der Mitochondrien erfolgte die Umsetzung von MTT zum wasserunlöslichen Formazan, welches durch die Vermessung der Absorption bei 595 nm nachgewiesen wurde (Berridge *et al.*, 1996; Molecular Probes, 2002). Das physiologisch in Zellmembranen vorkommende Lipid POPC wurde als Negativ-Kontrolle, das Lysolipid PLPC als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Die Viabilität der HaCaT Zellen (A) sinkt abhängig von der Lipidkonzentration deutlich ab. Die Viabilität der SCC13 Zellen (B) nimmt bei höheren Lipidkonzentrationen ebenfalls ab, jedoch schwächer als die der HaCaT Zelllinie. Dargestellt sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.  $n \geq 3$ .

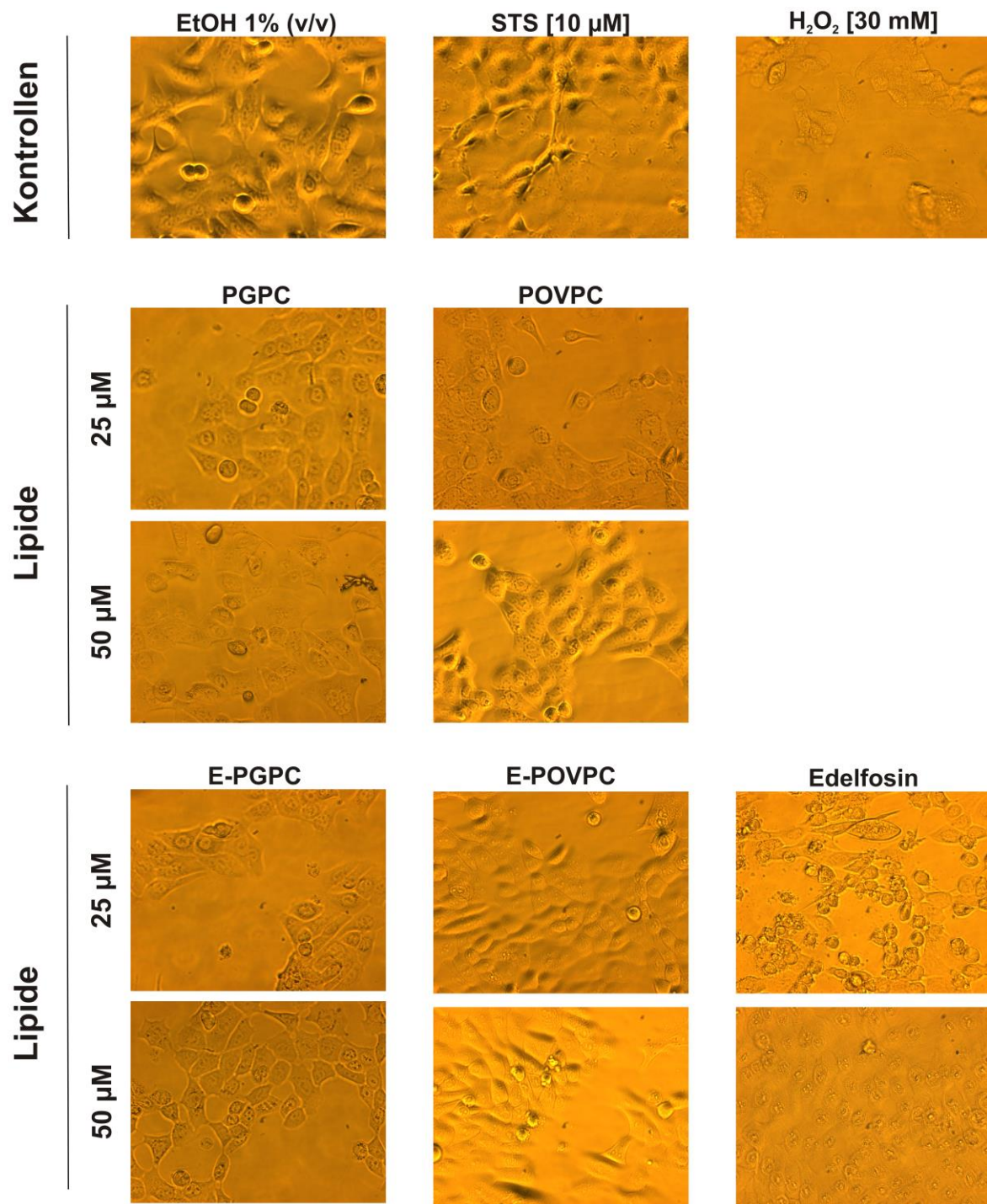
Die Messserie mit der HaCaT Zelllinie wurde von Claudia Ramprecht, Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz durchgeführt.

## 4.2. Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels FACS

Durch den Einsatz von Durchflusszytometrie kann zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Da die Ergebnisse des MTT Assays zeigten, dass mit steigenden Konzentrationen von oxidierten Phospholipiden die Zellviabilität beider Zelllinien deutlich abnimmt, wurden im nächsten Schritt dieser Arbeit FACS-Messungen durchgeführt um zwischen nekrotischem und programmiertem Zelltod (Apoptose) unterscheiden zu können. Dazu wurden sowohl HaCaT als auch SCC13 Zellen 6h mit 25 oder 50  $\mu\text{M}$  der Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC sowie Edelfosin inkubiert. Nach 5,5h wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch beurteilt. Abbildung 10 zeigt dabei die Morphologie der HaCaT Zelllinie, Abbildung 11 die Morphologie der SCC13 Zelllinie.

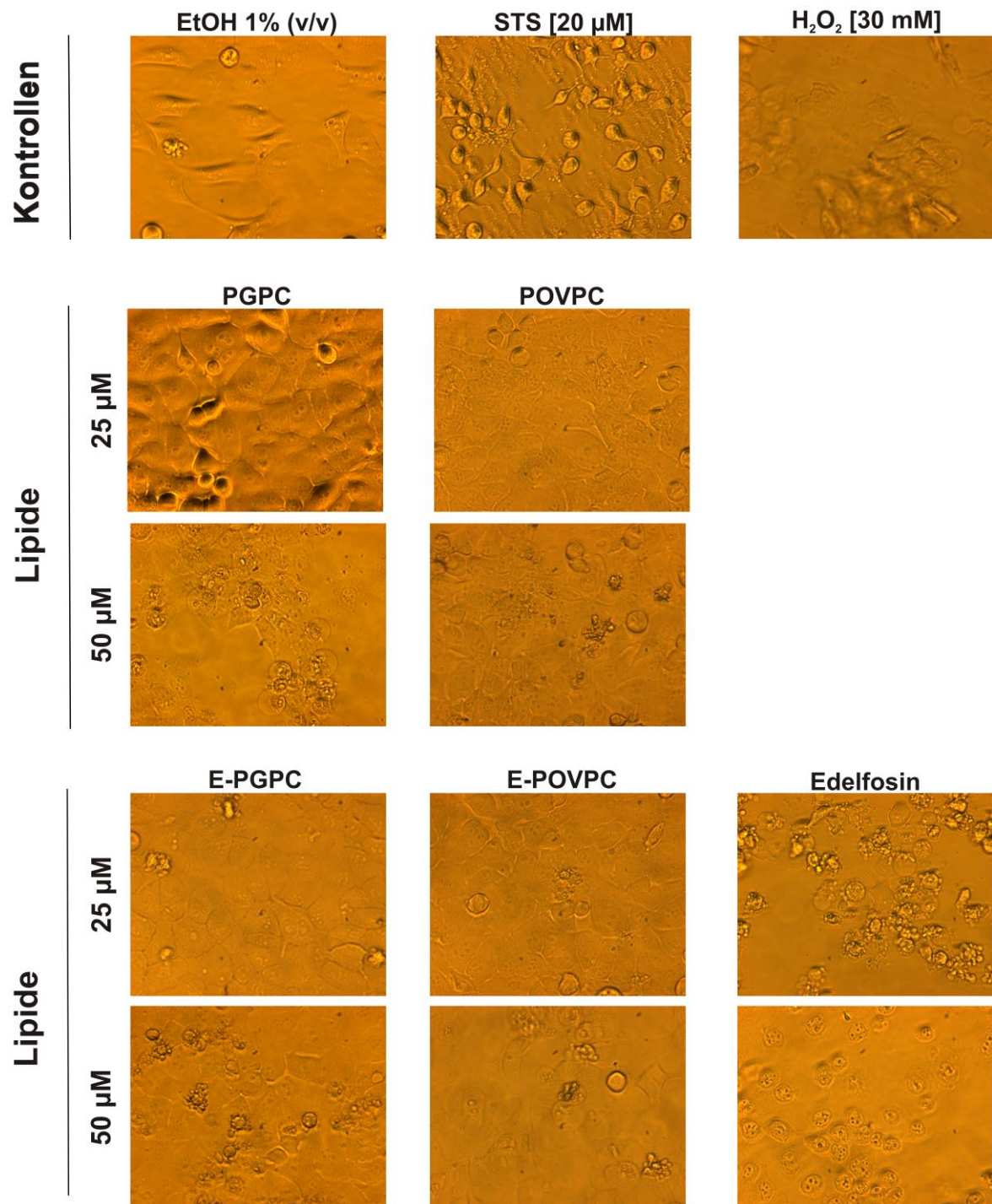
HaCaT Zellen zeigen nach Inkubation mit sowohl 25 als auch 50  $\mu\text{M}$  PGPC und POVPC sowie den beiden Ether-Lipiden keine morphologischen Auffälligkeiten hinsichtlich Granulierung, Zellform (kugeliges Erscheinungsbild) oder Haftung an der Oberfläche des Wells. Nach Inkubation mit Edelfosin erscheinen die Zellen jedoch stärker granuliert und kugelig. Außerdem sind einige vom Well losgelöste Zellen sowie Zelltrümmer erkennbar. Diese Anzeichen deuten auf eine starke Schädigung der Zellen hin. Selbige morphologische Auffälligkeiten konnten nach Inkubation mit Edelfosin auch bei der SCC13 Zelllinie festgestellt werden. Daneben zeigten sich bei den mit 50  $\mu\text{M}$  PGPC, POVPC, E-PGPC sowie E-POVPC inkubierten Hautkrebszellen ebenfalls deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Morphologie. So ist besonders auffällig, dass sich viele Zellen vom Well abgelöst haben und kugelig in Erscheinung treten. Diese Auffälligkeiten geben ebenfalls Hinweis auf eine Schädigung der Zellen. Im Gegenzug zu den mit 50  $\mu\text{M}$  Lipid inkubierten Zellen, zeigen die mit 25  $\mu\text{M}$  inkubierten Zellen keine der oben beschriebenen morphologischen Auffälligkeiten im Vergleich zur EtOH Kontrolle.





**Abbildung 10: Morphologische Veränderungen der HaCaT Keratinozyten durch oxidierte Phospholipide.**

HaCaT Keratinozyten wurden für 5,5h in DMEM (0,1%FCS (v/v)) mit den angezeigten Lipiden und Kontrollen inkubiert. Unmittelbar vor der FACS-Messung wurden Durchlichtaufnahmen der Keratinozyten gemacht um morphologische Unterschiede erkennen zu können. Die Abbildung zeigt, dass nach Inkubation mit den Lipiden PGPC, POVPC, E-PGPC und E-POVPC keine morphologischen Unterschiede hinsichtlich Zellform, Granulierung oder Haftung zu sehen sind. Die mit Edelfosin inkubierten Keratinozyten weisen hingegen eine starke Beeinträchtigung auf. Die Zellen erscheinen dabei kugelig mit starker Granulierung. Zusätzlich sind Ablagerungen von Zelltrümmern erkennbar.

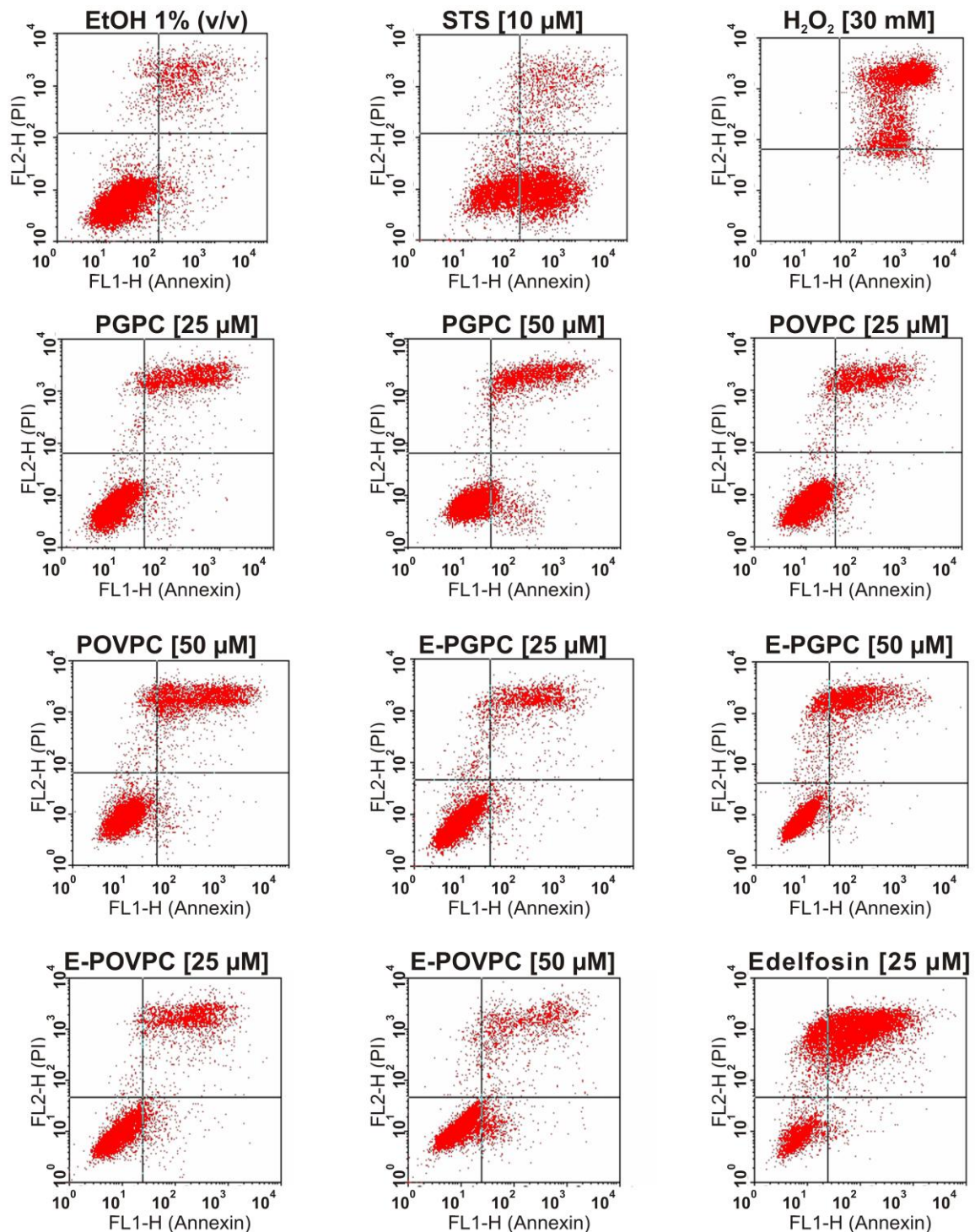


**Abbildung 11: Morphologische Veränderungen der SCC13 Zelllinie durch oxidierte Phospholipide.**

SCC13 Zellen wurden 5,5h in RPMI-1640 Medium (0,1%FCS (v/v)) mit den jeweiligen Lipiden oder Kontrollen inkubiert. Direkt vor der FACS-Messung wurden Durchlichtaufnahmen der Hautkrebszellen gemacht um morphologische Unterschiede festzuhalten. Die Abbildung zeigt, dass nach 50  $\mu$ M Inkubation mit den Lipiden PGPC, POVPC, E-PGPC und E-POVPC bereits morphologische Unterschiede wie eine Granulierung der Zellen und Zelltrümmer vorhanden sind. Nach Inkubation mit Edelfosin kommt es zu einer besonders starken Beeinträchtigung der Hautkrebszellen, die an der starken Granulierung und kugeligen Form der Zellen feststellbar ist. Daneben sind viele Zelltrümmer erkennbar.

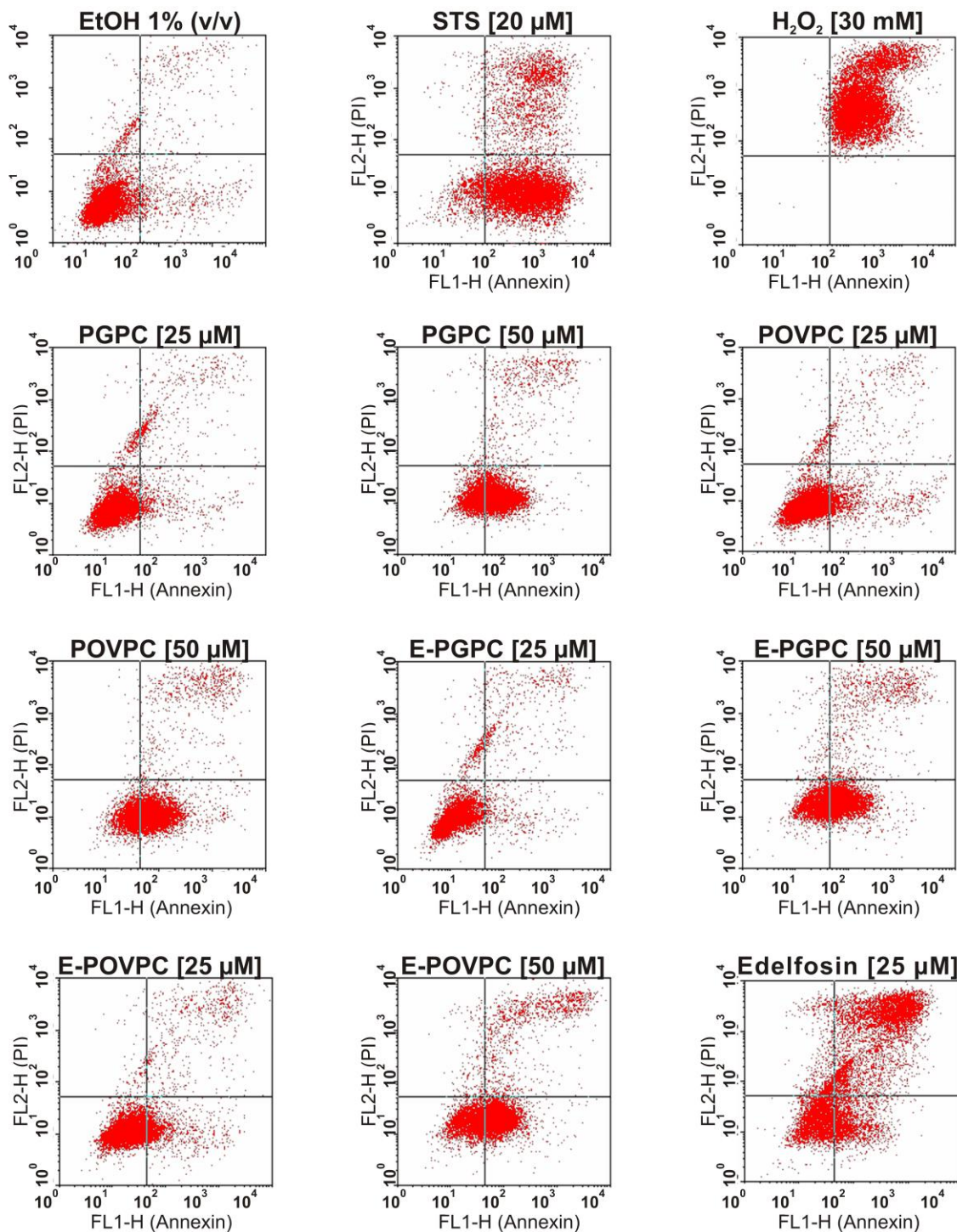
Nach mikroskopischer Betrachtung wurden die Zellen geerntet und mit Alexa Fluor®- 488 Annexin-V und PI markiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Zellen am FACSCalibur Durchflusszytometer.

Anhand der EtOH, STS sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Kontrollen erfolgte die Einteilung der Quadranten und so die Zuordnung in lebende, apoptotische und nekrotische Zellen. Abbildung 12 zeigt charakteristische Beispiele für die Auswertung der FACS-Analyse der HaCaT Zelllinie, Abbildung 13 für die SCC13 Zelllinie. Das Ergebnis der HaCaT als auch SCC13 Zelllinie nach Inkubation mit 50 µM Edelfosin konnte aufgrund der extremen Schädigung der Zellen und der damit einhergehenden geringen Anzahl an messbaren Zellen nicht ausgewertet werden.



**Abbildung 12: FACS-Analyse des Zelltodes von HaCaT Zellen nach Inkubation mit oxidierten Phospholipiden.**

HaCaT Keratinozyten wurden 6h in DMEM (0,1%FCS (v/v)) mit 25 oder 50 µM der Lipide sowie den Kontrollen (1% EtOH (v/v) (Negativ- Kontrolle), 10 µM STS (Apoptose- Kontrolle) und 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nekrose- Kontrolle)) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit Alexa Fluor®-488 Annexin-V (Marker für Apoptose) und PI (Marker für Nekrose) markiert. Lebende Zellen bleiben dabei ohne Markierung. Die Keratinozyten wurden mittels Durchflusszytometrie ihrem Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht sowie ihrem Fluoreszenzsignal zugeordnet. Anhand der drei Kontrollen wurde die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen sowie nekrotischen Zellen vorgenommen. Dargestellt sind repräsentative Beispiele für die jeweiligen Proben. Es zeigt sich vor allem eine Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden.



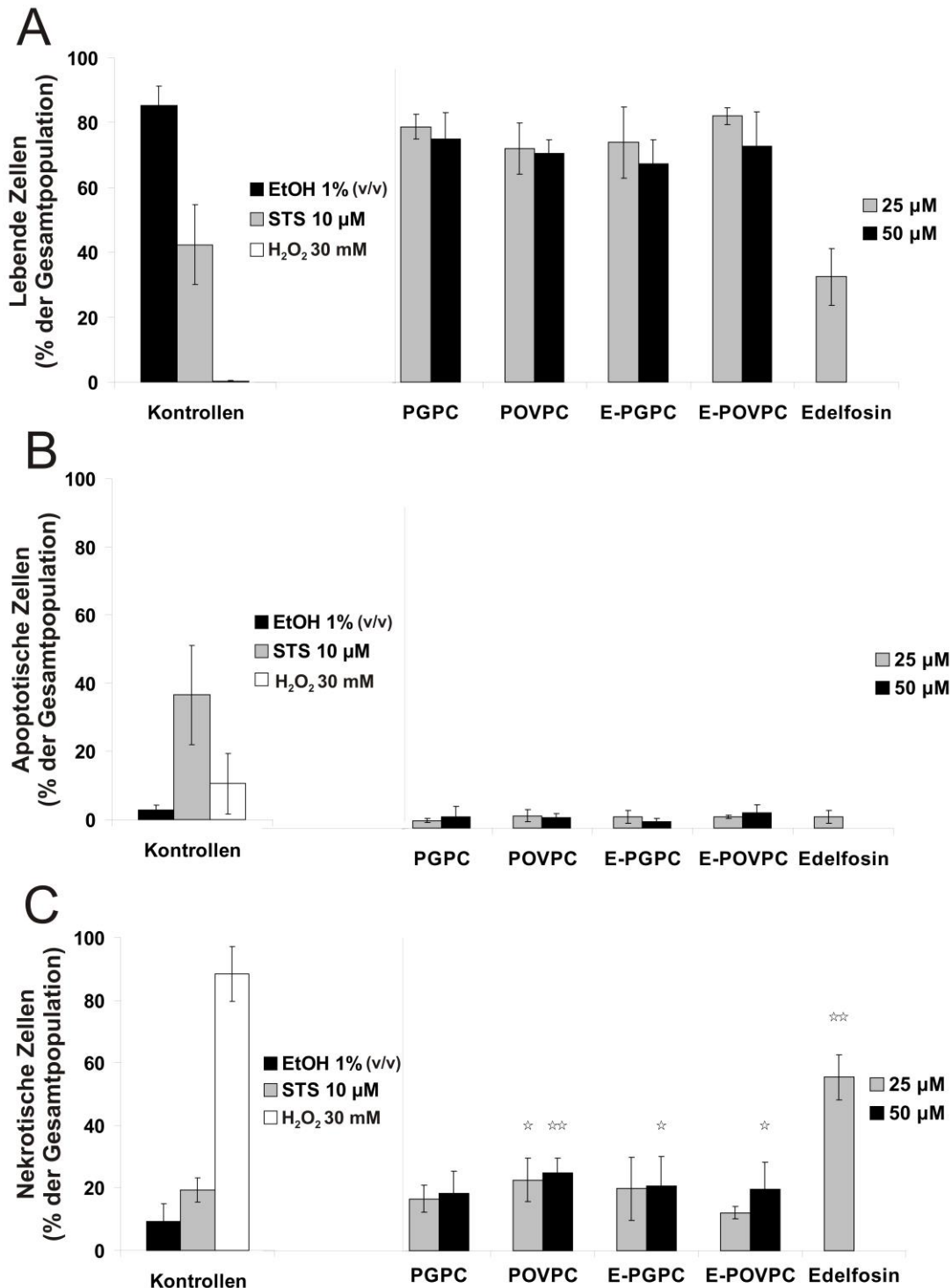
**Abbildung 13: FACS-Analyse des Zelltodes von SCC13 Zellen nach Inkubation mit oxidierten Phospholipiden.**

SCC13 Zellen wurden 6h in RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)) mit 25 oder 50 µM Lipid sowie den Kontrollen (1% EtOH (v/v) (Negativ- Kontrolle), 20 µM STS (Apoptose- Kontrolle) und 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nekrose- Kontrolle)) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und mit Alexa Fluor®-488 Annexin-V (Marker für Apoptose) und PI (Marker für Nekrose) markiert. Lebende Zellen nehmen dabei keinen der beiden Farbstoffe auf. Die Hautkrebszellen wurden mittels Durchflusszytometrie ihrem Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht sowie ihrem Fluoreszenzsignal zugeordnet und durch die Verwendung von Kontrollen (1% EtOH (v/v), 20 µM STS und 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde die Einteilung in lebende, apoptotische sowie nekrotische Zellen getroffen. Die Abbildung zeigt charakteristische Beispiele der jeweiligen Proben. Es zeigt sich eine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen nach Inkubation 50 µM Lipid und eine Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen nach Inkubation mit Edelfosin.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse. In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass sich nach Inkubation der HaCaT Zelllinie mit 25  $\mu\text{M}$  als auch mit 50  $\mu\text{M}$  PGPC, POVPC, E-PGPC oder E-POVPC der HaCaT Zelllinie der Anteil an nekrotischen Zellen leicht erhöht. Nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  Edelfosin erhöht sich dieser Anteil enorm, was auf die besonders starke Cytotoxizität von Edelfosin hindeutet. Die SCC13 Zelllinie (Abbildung 15) zeigt nach Inkubation mit diesem Lipid ebenfalls eine sehr starke Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen. Nach Inkubation der SCC13 Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  PGPC, POVPC sowie den beiden Ether-Lipiden kam es lediglich zu einer minimalen Beeinträchtigung der Zellen.

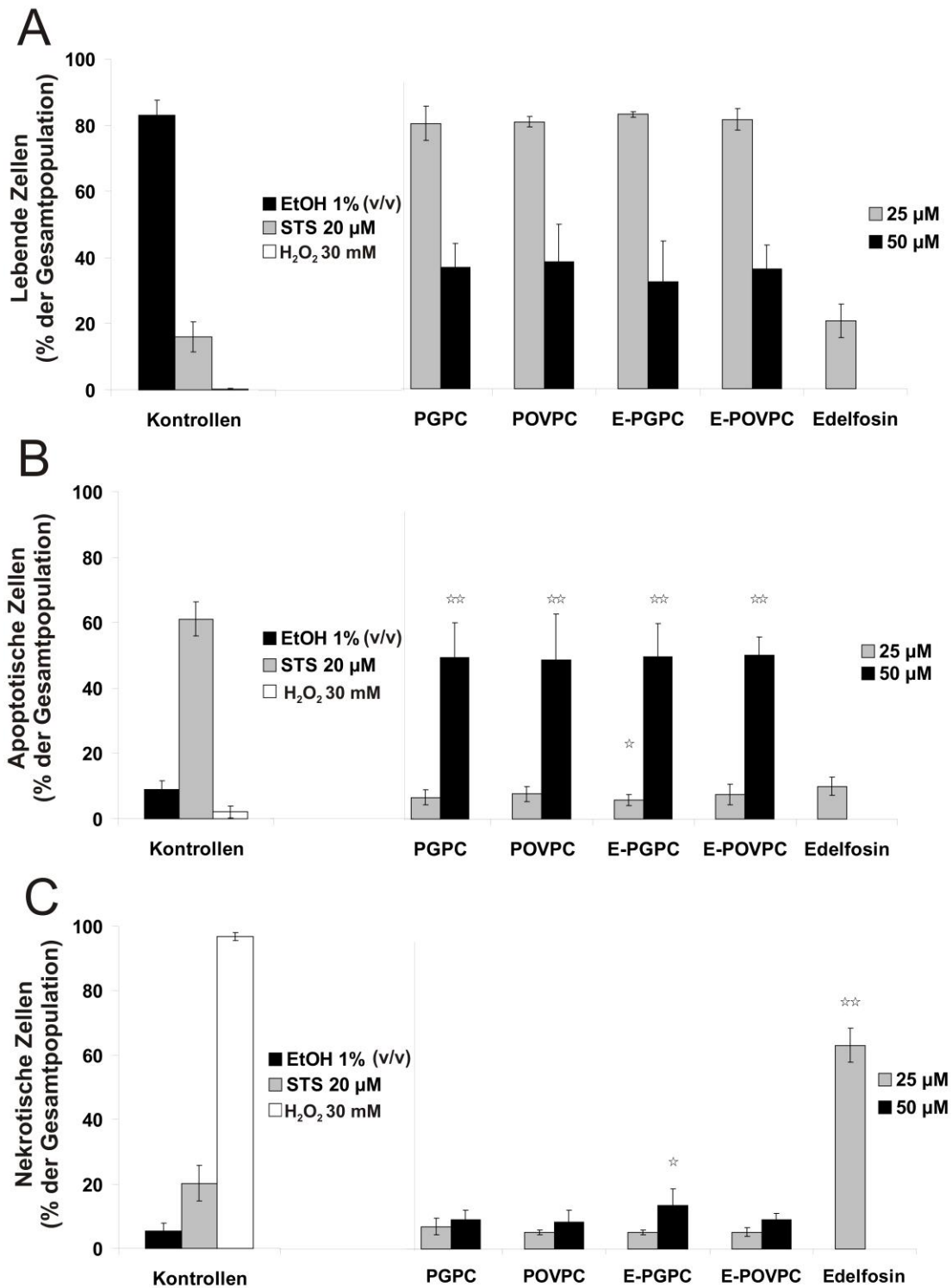
Entsprechend der Morphologie der SCC13 Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  PGPC, POVPC, E-PGPC sowie E-POVPC wies das Ergebnis der FACS-Messungen eine deutliche Verringerung am Anteil lebender Zellen auf. Es zeigte sich, dass diese Verringerung auf die signifikante Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass PGPC und POVPC sowie ihre Ether-Lipide in 50  $\mu\text{M}$  Konzentration bei SCC13 Zellen zu einer Aktivierung des programmierten Zelltodes führen, wohingegen es bei der HaCaT Zelllinie zu einer leichten Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen kommt. Das Lipid Edelfosin wirkt hingegen auf beide Zelllinien stark toxisch.



**Abbildung 14: Toxische Wirkung von oxidierten Phospholipiden auf die HaCaT Zelllinie (FACS-Analyse).**

Dargestellt ist der Anteil lebender (A), apoptotischer (B) sowie nekrotischer (C) HaCaT Keratinozyten bezogen auf die Gesamtpopulation nach 6h Inkubation mit DMEM (0,1%FCS (v/v)) supplementiert mit 25 oder 50 µM der Lipide sowie den Kontrollen (1% EtOH (v/v) (Negativ-Kontrolle), 10 µM STS (Apoptose- Kontrolle) und 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nekrose- Kontrolle)). Die Inkubation mit den Lipiden PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC führt zu einer geringen Abnahme des Anteils lebender Zellen, welche auf den erhöhten Anteil an nekrotischen Zellen zurückzuführen ist. Das Lipid Edelfosin führt zu einer starken Verringerung des Anteils lebender Zellen die mit einer deutlichen Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen einhergeht. \* P ≤ 0,05; \*\* P ≤ 0,005 bezogen auf die EtOH Kontrolle. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus n ≥ 3 Messungen sowie Standardabweichungen.



**Abbildung 15: Toxische Wirkung von oxidierten Phospholipiden auf die SCC13 Zelllinie (FACS-Analyse).**

Dargestellt ist der Anteil lebender (A), apoptotischer (B) sowie nekrotischer (C) SCC13 Zellen der gesamten Zellpopulation nach 6h Inkubation mit 25 bzw. 50  $\mu$ M der Lipide sowie den Kontrollen (1% EtOH (v/v) (Negativ- Kontrolle), 20  $\mu$ M STS (Apoptose- Kontrolle) und 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nekrose-Kontrolle)) in RPMI-1640 Medium (0,1%FCS (v/v)). Die Inkubation mit 50  $\mu$ M der Lipide PGPC, POVPC, E-PGPC, E-POVPC führt zu einer deutlichen Verringerung am Anteil lebender Zellen was auf die signifikante Erhöhung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen zurückzuführen ist. Nach Inkubation mit Edelfosin zeigt sich eine signifikante Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen, was ebenfalls zu einer Abnahme des Anteils lebender Zellen führt. \* P $\leq$  0,05; \*\* P $\leq$  0,005 bezogen auf die EtOH Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus n $\geq$ 3 Messungen.



### **4.3. Zelluläre Aufnahme und Lokalisierung von BY-PGPE und BY-POVPE**

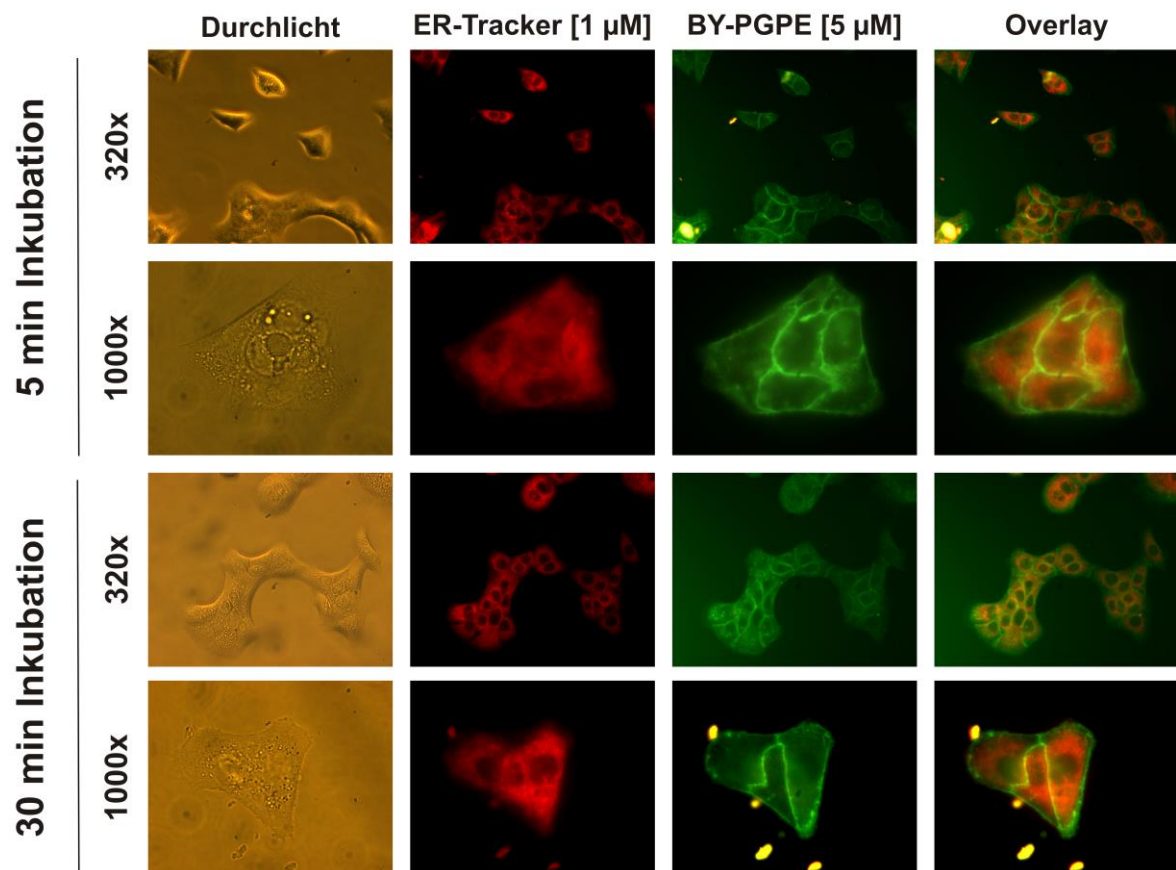
Um die Lokalisierung der Lipide in den Zellen verfolgen zu können wurden BODIPY™ (BY) markierte Lipidanaloga von PGPC (BY-PGPE) und POVPC (BY-POVPE) in Kombination mit Organell-spezifischen Markern eingesetzt. HaCaT sowie SCC13 Zellen wurden mit jeweils einem BODIPY™ markierten Lipid (BY-PGPE, BY-POVPE) inkubiert nachdem ER, Mitochondrien oder Plasmamembran mit spezifischen Markern gefärbt worden waren. Mit Hilfe von unterschiedlichen Filtern wurden die Marker fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Anschließend wurden die Aufnahmen übereinander gelegt um eine eventuelle Colokalisation von BY-Lipid und Organell-spezifischem Marker erkennen zu können.

#### **4.3.1. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und ER-Tracker™ Red**

Sowohl HaCaT als auch SCC13 Zellen wurden 20 min mit 1 µM ER-Tracker™ Red und danach 5 oder 30 min mit 5 µM BY-PGPE oder BY-POVPE inkubiert.

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen dabei die Ergebnisse der HaCaT Zelllinie, Abbildung 18 und Abbildung 19 die Ergebnisse der SCC13 Zelllinie.

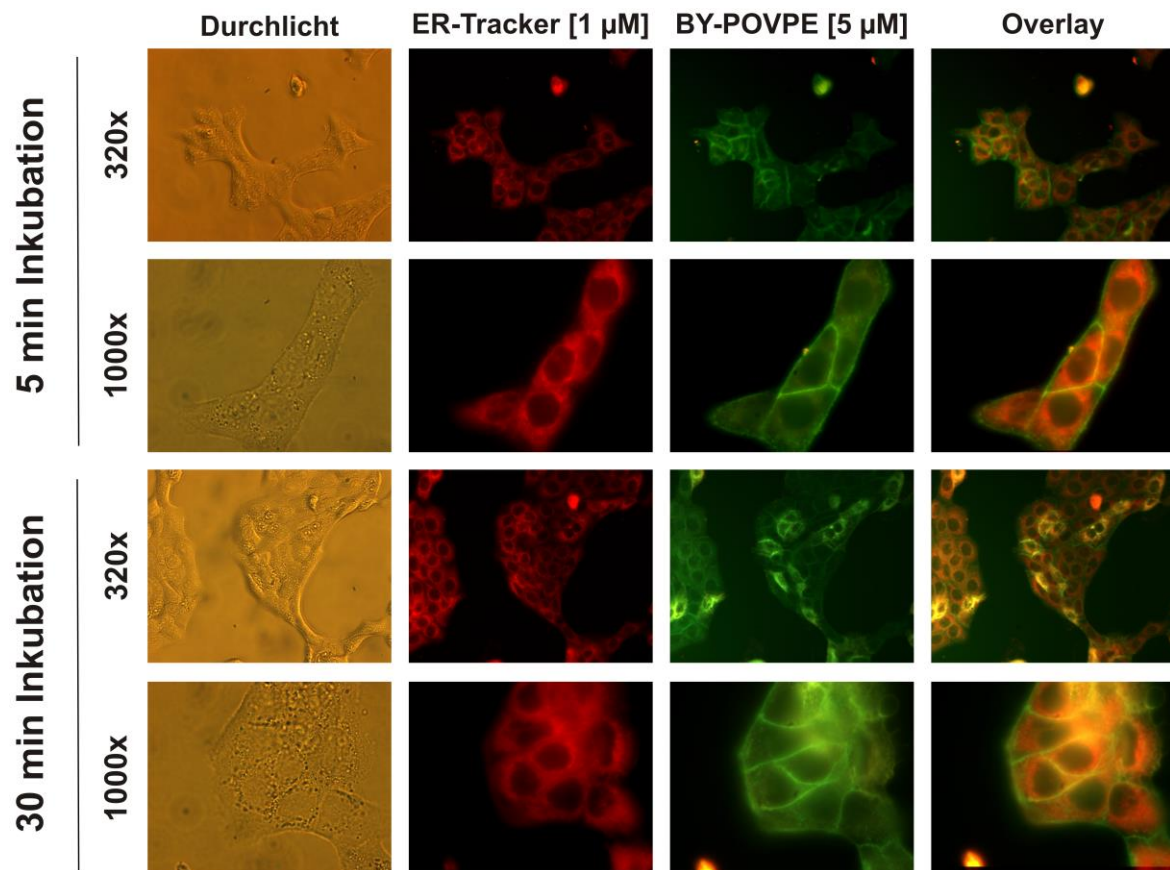
Sowohl nach 5 als auch nach 30 min Inkubation mit BY-PGPE (Abbildung 16) oder BY-POVPE (Abbildung 17) zeigt sich in HaCaT Zellen eine Lokalisierung des Lipids an der Plasmamembran. Das ER wird hingegen in seiner typisch netzartigen Form im Cytoplasma der Zellen dargestellt. Eine Colokalisation von ER-Tracker™ Red mit BY-PGPE oder BY-POVPE kann daher in beiden Fällen ausgeschlossen werden. Ein ähnliches Ergebnis findet man bei der SCC13 Zelllinie nach 5 min Inkubation mit BY-PGPE (Abbildung 18) sowie BY-POVPE (Abbildung 19) nach der ER-Färbung mit ER-Tracker™ Red. In beiden Fällen beobachtet man eine Lokalisierung des Lipids an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach 30 min Inkubation mit den Lipiden in beiden Fällen eine deutliche Lokalisierung der Lipide im Cytoplasma der Zellen. Außerdem kann eine partielle Colokalisation von BY-PGPE und BY-POVPE mit ER-Tracker™ Red beobachtet werden.



**Abbildung 16: Lokalisation von BY-PGPE und ER-Tracker™ Red in HaCaT Zellen.**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl repräsentativer Aufnahmen der HaCaT Zelllinie nach 20 min Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  ER-Tracker™ Red sowie darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  BY-PGPE für 5 und 30 min in DMEM (0,1% FCS (v/v)). Bilder von identischen Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen und durch die Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Zuvor wurden Helligkeit, Kontrast und Intensität angepasst um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Wie sich in der Abbildung erkennen lässt, zeigt sich keine Colokalisation von BY-PGPE mit dem ER-Tracker™ Red.  $n \geq 3$ .

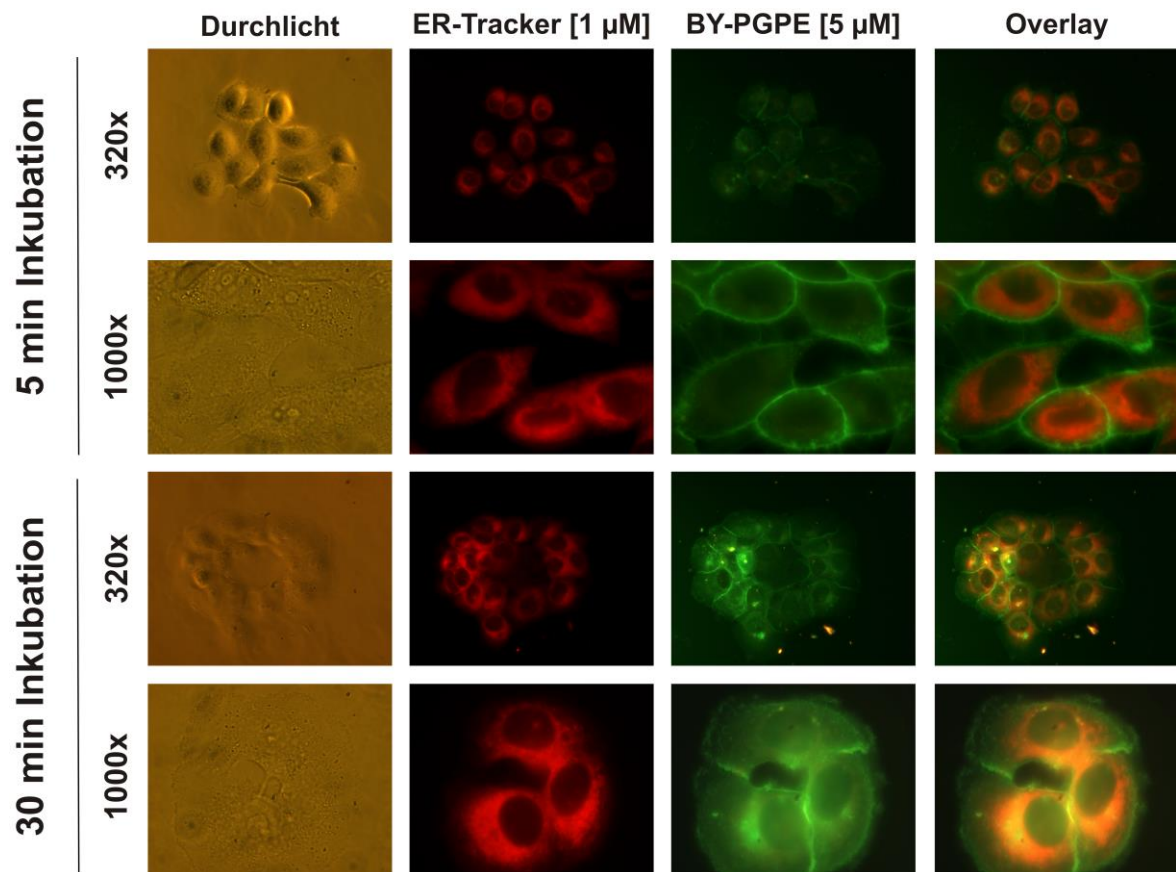
Diese Bildreihen wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz aufgenommen.



**Abbildung 17: Lokalisation von BY-POVPE und ER-Tracker™ Red in HaCaT Zellen.**

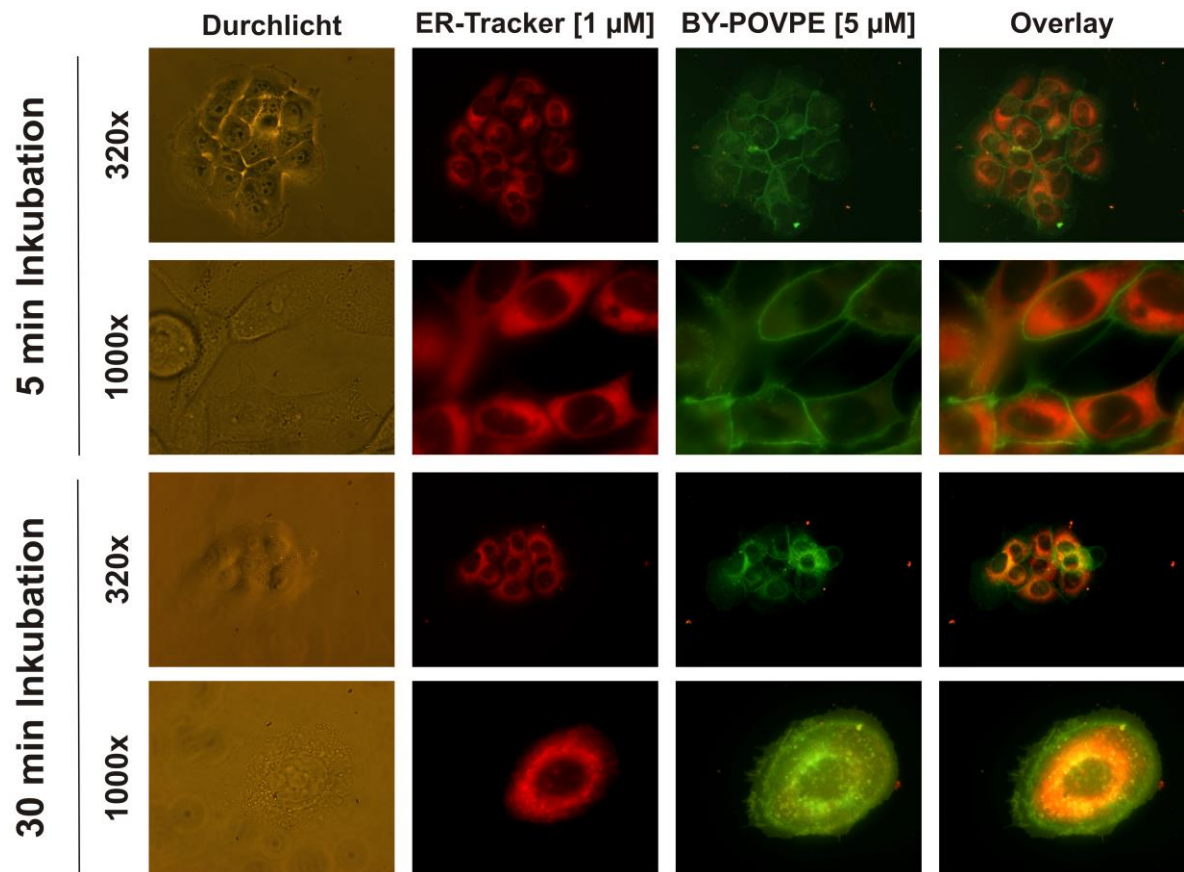
Dargestellt ist eine Auswahl repräsentativer Aufnahmen der HaCaT Zelllinie nach Inkubation mit 1  $\mu$ M ER-Tracker™ Red für 20 min sowie darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu$ M BY-POVPE für 5 und 30 min in DMEM mit 0,1% FCS (v/v). Bilder derselben Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden angepasst um eine bestmögliche Bildqualität zu erreichen. Anschließend wurden die Bilder durch die Software Corel Photo Paint X3 übereinandergelegt. Es zeigt sich keine Colokalisation von BY-POVPE und dem ER-Tracker™ Red.  $n \geq 3$ .

Diese Aufnahmen wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz erstellt.



**Abbildung 18: Partielle Colokalisation von BY-PGPE und ER-Tracker™ Red in SCC13 Zellen.**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl von repräsentativen Aufnahmen der SCC13 Zelllinie nach 20 min Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  ER-Tracker™ Red sowie darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  BY-PGPE für 5 und 30 min in RPMI-1640 Medium mit 0,1% FCS (v/v). Von identischen Zellen wurden Bilder mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen und durch die Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Zuvor wurden Helligkeit, Kontrast und Intensität angepasst um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen. Wie sich anhand der Abbildung erkennen lässt, zeigt sich nach 30 min Inkubation eine partielle Colokalisation von BY-PGPE und ER-Tracker™ Red. Nach 5min. Inkubation zeigt sich zunächst eine Lokalisierung des Lipids an der Plasmamembran.  $n \geq 3$ .



**Abbildung 19: Partielle Colokalisation von BY-POVPE und ER-Tracker™ Red in SCC13 Zellen.**

Die Darstellung zeigt charakteristische Aufnahmen der SCC13 Zelllinie nach 20 min Inkubation mit 1  $\mu$ M ER-Tracker™ Red sowie darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu$ M BY-POVPE für 5 und 30 min in RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)). Bilder derselben Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden angepasst um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Durch die Software Corel Photo Paint X3 wurden die Aufnahmen übereinander gelegt um eine eventuelle Colokalisation erkennen zu können. Nach 30 min Inkubation zeigt sich zunächst eine partielle Colokalisation von BY-POVPE und ER-Tracker™ Red. Nach Inkubation der Zellen für 5 min zeigt sich eine Lokalisierung des Lipids in der Plasmamembran.  $n \geq 3$ .

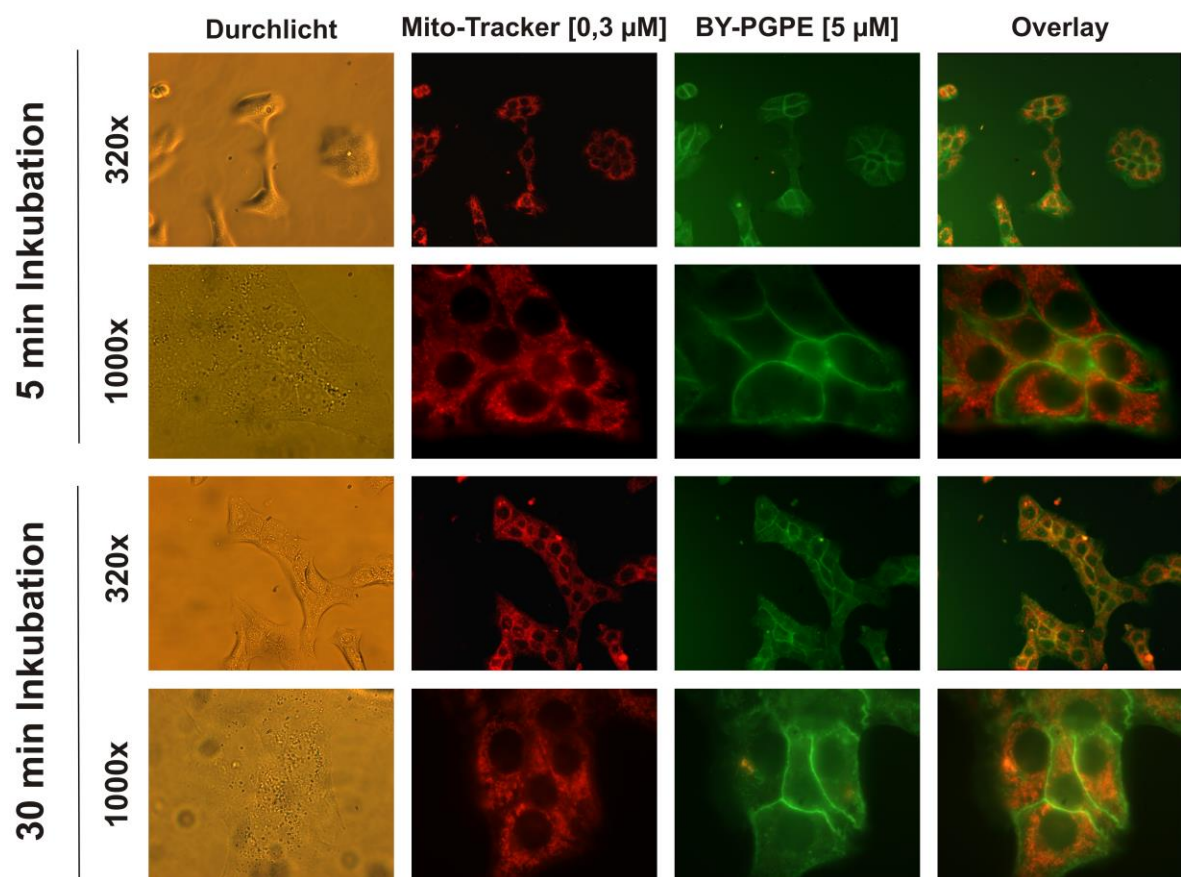
#### 4.3.2. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und Mito Tracker CMXRos

HaCaT und SCC13 Zellen wurden 15 min mit 0,3  $\mu$ M Mito Tracker CMXRos gefärbt und danach für 5 oder 30 min (HaCaT Zelllinie) bzw. 30 min (SCC13 Zelllinie) mit 5  $\mu$ M BY-PGPE oder BY-POVPE inkubiert. Da sich bei der SCC13 Zelllinie nach 5 min Inkubation eine Lokalisierung der Lipide an der Plasmamembran gezeigt hatte, wurde die 5 min Inkubation mit BY-PGPE oder BY-POVPE in Kombination mit diesem Marker nicht durchgeführt. In den Abbildungen Abbildung 20 und Abbildung 21 sind die Ergebnisse für die HaCaT

Zelllinie dargestellt, in den Abbildung 22 und Abbildung 23 die Ergebnisse für die SCC13 Zelllinie.

In HaCaT Zellen lokalisieren BY-PGPE (Abbildung 20) und BY-POVPE (Abbildung 21) sowohl nach 5 als auch nach 30 min Inkubation an der Plasmamembran. Eine Colokalisierung mit Mito Tracker CMXRos kann daher zu diesen Zeitpunkten ausgeschlossen werden.

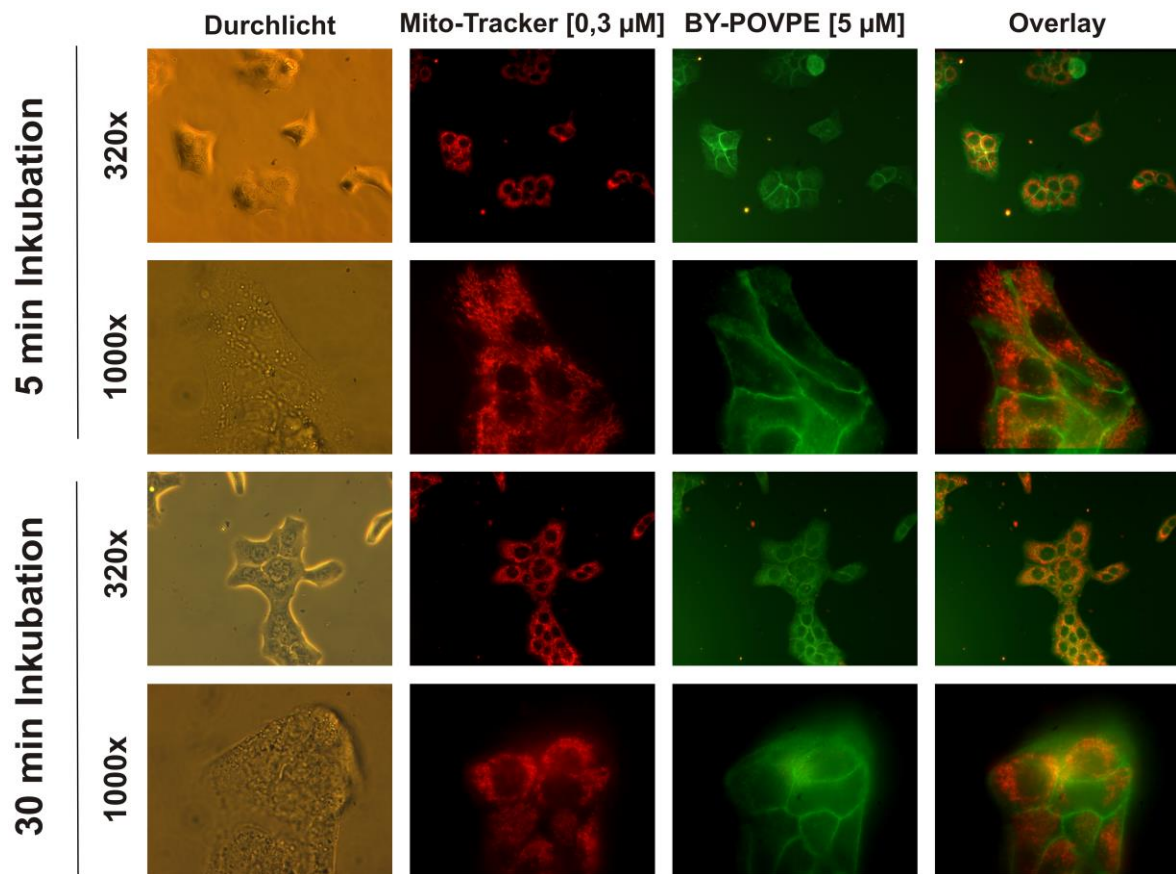
Bei der SCC13 Zelllinie lokalisieren BY-PGPE (Abbildung 22) und BY-POVPE (Abbildung 23) nach 30 min im Cytoplasma. Eine Colokalisation mit Mito Tracker CMXRos wird jedoch nicht beobachtet.



**Abbildung 20: Lokalisation von BY-PGPE und Mito Tracker Red CMXRos in HaCaT Zellen.**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Aufnahmen der HaCaT Zelllinie nach 15 min Inkubation mit 0,3  $\mu\text{M}$  Mito-Tracker Red CMXRos sowie darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  BY-PGPE in DMEM (0,1% FCS (v/v)) für 5 oder 30 min. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen, mit Hilfe der Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Helligkeit, Kontrast und Intensität der Bilder wurden angeglichen um eine optimale Bildqualität zu bekommen. BY-PGPE und Mito Tracker Red CMXRos zeigen keine Colokalisation.  $n \geq 3$ .

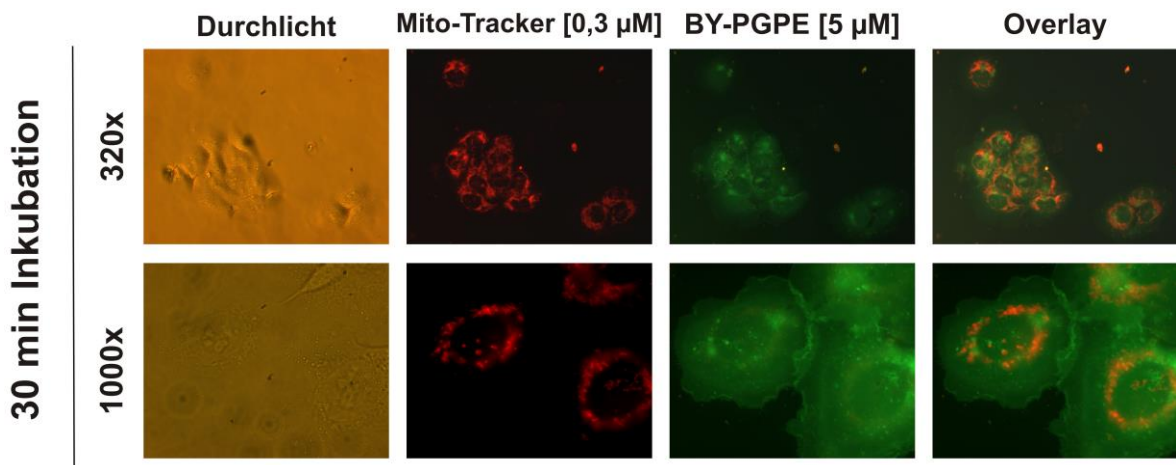
Diese Bildreihen wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz erstellt.



**Abbildung 21: Lokalisation von BY-POVPE und Mito Tracker Red CMXRos in HaCaT Zellen.**

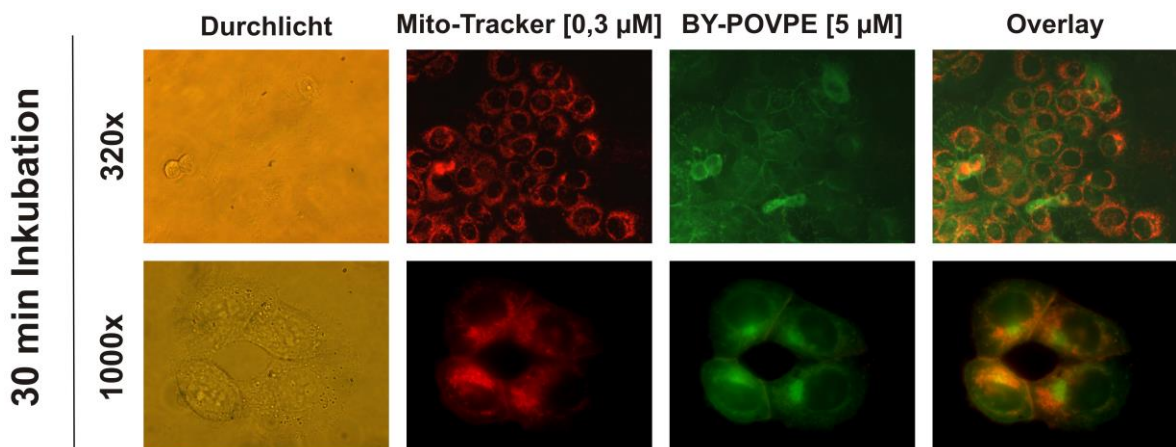
Die Abbildung zeigt eine Auswahl repräsentativer Aufnahmen der HaCaT Zelllinie nach 15 min Inkubation mit 0,3  $\mu$ M Mito-Tracker Red CMXRos und darauffolgende Inkubation mit 5  $\mu$ M BY-POVPE 5 und 30 min in DMEM mit 0,1% FCS (v/v). Bilder derselben Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden angepasst um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Danach wurden die Aufnahmen mit Hilfe der Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. BY-POVPE zeigt keine Colokalisation mit dem Mito-Tracker Red CMXRos.  $n \geq 3$ .

Die Bilder für diese Abbildung wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz gemacht.



**Abbildung 22: Lokalisation von BY-PGPE und Mito Tracker Red CMXRos in SCC13 Zellen.**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl an Aufnahmen von SCC13 Zellen nach 15 min Inkubation mit 0,3 µM Mito-Tracker Red CMXRos sowie darauffolgende 30 min Inkubation mit 5 µM BY-PGPE in RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)). Bilder identischer Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen und durch die Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden angeglichen um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen. BY-PGPE zeigt keine Colokalisation mit dem Mito-Tracker Red CMXRos. n≥3.



**Abbildung 23: Lokalisation von BY-POVPE und Mito Tracker Red CMXRos in SCC13 Zellen.**

Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der SCC13 Zelllinie nach 15 min Inkubation mit 0,3 µM Mito-Tracker sowie darauffolgende 30 min Inkubation mit 5 µM BY-POVPE in RPMI-1640 Medium mit 0,1% FCS (v/v). Bilder derselben Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen und durch die Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden zuvor angepasst um eine optimale Bildqualität zu erreichen. BY-POVPE zeigt keine Colokalisation mit dem Mito-Tracker Red CMXRos. n≥3.



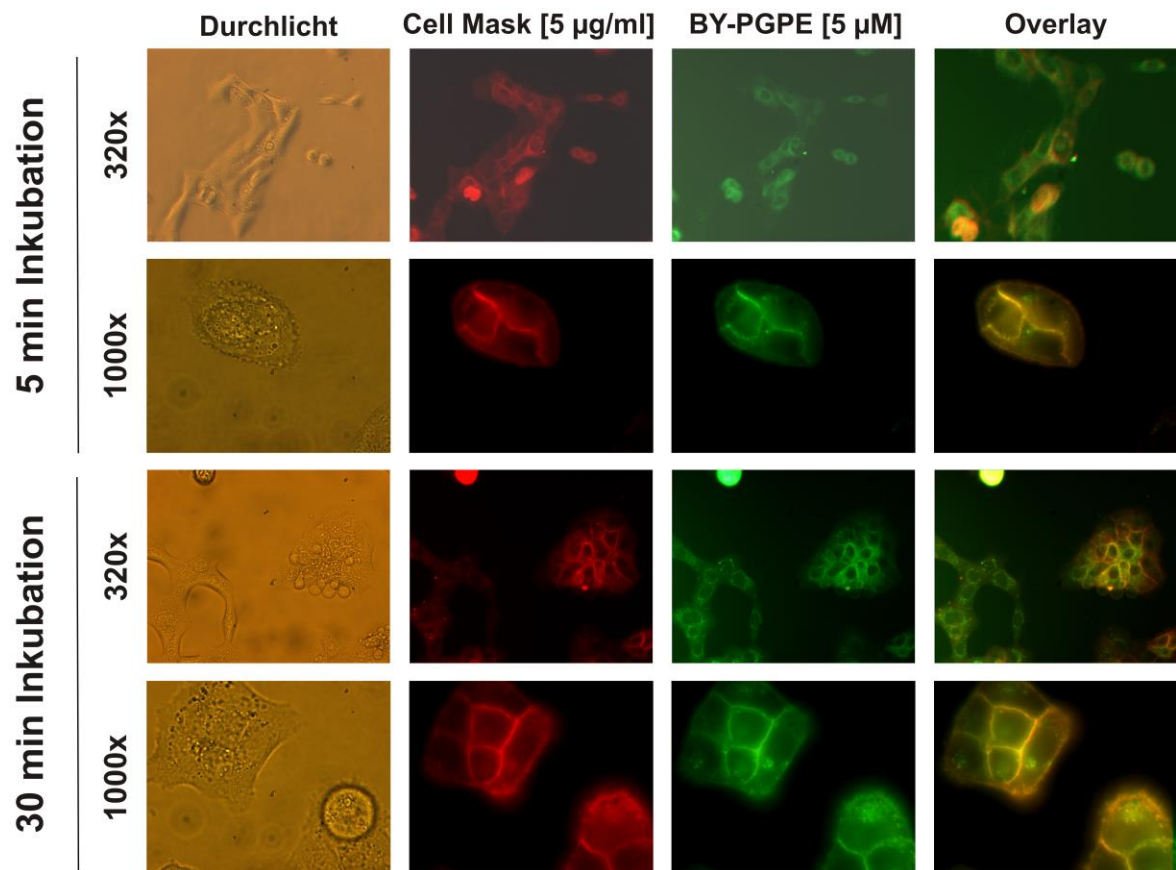
### **4.3.3. Lokalisation von oxidierten Phospholipiden und Cellmask™ plasma membrane stain**

Um die Lokalisierung der fluoreszierenden oxidierten Phospholipide an der Plasmamembran nachweisen zu können wurde Cellmask™ plasma membrane stain als Plasmamembran-spezifischer Marker verwendet.

HaCaT Zellen wurden 5 oder 30 min mit BY-PGPE (Abbildung 24) oder BY-POVPE (Abbildung 25) inkubiert und anschließend 10 min mit Cellmask™ plasma membrane stain gefärbt.

Bei der SCC13 Zelllinie hat dieser Marker, vermutlich aufgrund der veränderten Membran-Eigenschaften von Krebszellen, unspezifisch in allen Zellkompartimenten gebunden. Aus Versuchen mit diesen Zellen konnten daher keine Rückschlüsse auf eine eventuelle Colokalisation der BODIPY™ Lipide mit Cellmask™ plasma membrane stain gewonnen werden.

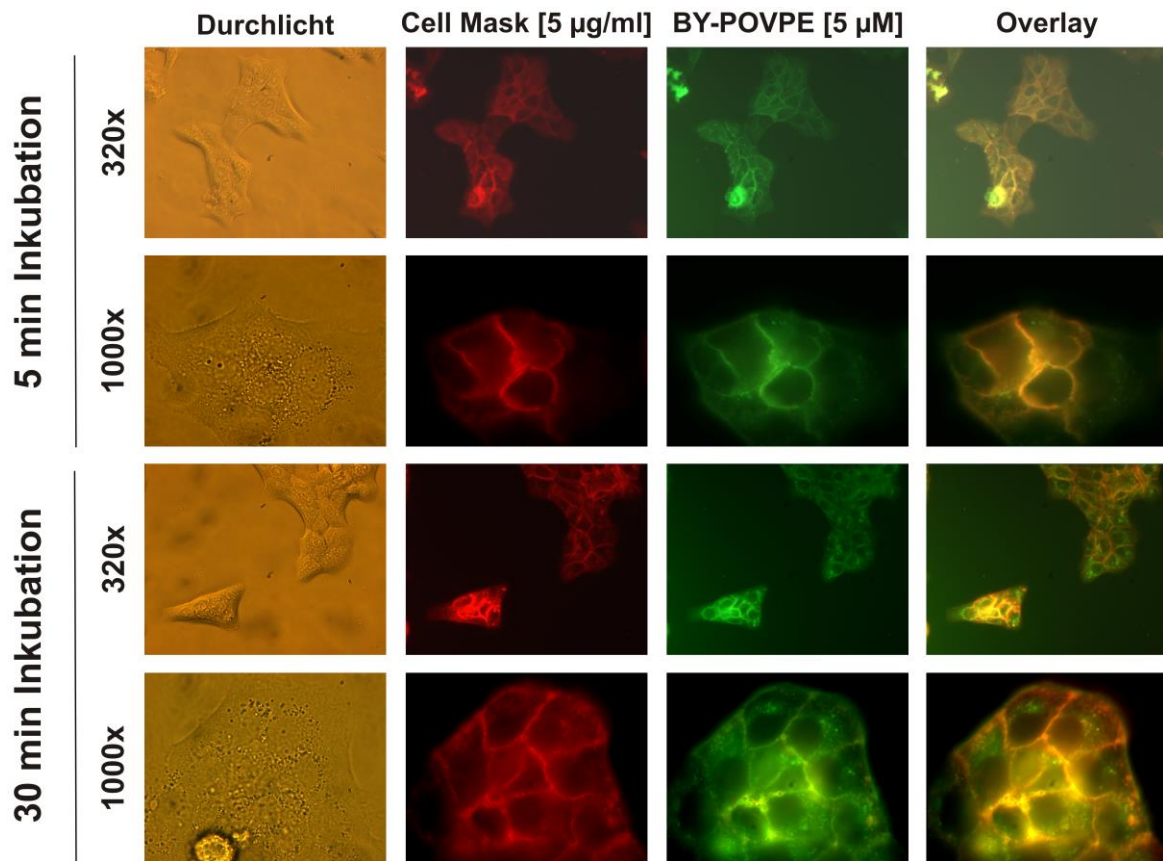
Bei der HaCaT Zelllinie zeigte sich sowohl nach 5 als auch nach 30 min wie erwartet eine eindeutige Colokalisation von BY-PGPE sowie BY-POVPE mit Cellmask™ plasma membrane stain. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Lipide BY-PGPE und BY-POVPE bei dieser Zelllinie innerhalb dieser Zeit nicht ins Zellinnere vordringen. Dieses Resultat liegt daher auf einer Linie mit den Ergebnissen der FACS-Analyse, wo lediglich geringe biologische Wirkungen beobachtet werden konnten.



**Abbildung 24: Colokalisation von BY-PGPE mit Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain in HaCaT Zellen.**

Dargestellt sind repräsentative Beispiele von Aufnahmen der HaCaT Zelllinie nach 5 und 30 min Inkubation mit 5 µM BY-PGPE in DMEM (0,1% FCS (v/v)) sowie anschließender 10 min Inkubation mit 5 µg/ml Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain. Bilder identischer Zellen wurden mit unterschiedlichen Filtern aufgenommen. Mit der Software Corel Photo Paint X3 wurden Helligkeit, Kontrast und Intensität bearbeitet, um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen. Anschließend wurden die Bilder übereinandergelegt um eine eventuelle Colokalisation erkennen zu können. Wie anhand der Abbildung deutlich erkennbar ist, zeigt sich sowohl nach 5 als auch nach 30 min Inkubation eine Colokalisation von BY-PGPE mit Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain. n≥3.

Diese Aufnahmen wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz getätigt.



**Abbildung 25: Colokalisation von BY-POVPE mit Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain in HaCaT Zellen.**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl charakteristischer Aufnahmen von HaCaT Zellen nach 5 und 30 min Inkubation mit 5 µM BY-POVPE in DMEM mit 0,1% FCS (v/v) sowie darauffolgender 10 min Inkubation mit 5 µg/ml Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain. Von identischen Zellen wurden Aufnahmen mit unterschiedlichen Filtern gemacht und mit Hilfe der Software Corel Photo Paint X3 übereinander gelegt. Helligkeit, Kontrast und Intensität wurden angepasst, um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Es zeigt sich sowohl nach 5 als auch nach 30 min Inkubation eine deutliche Colokalisation von BY-POVPE und Cellmask™ Deep Red plasma membrane stain. n≥3.

Diese Aufnahmen wurden von Luise Britz, Masterstudentin am Institut für Biochemie der Technischen Universität Graz gemacht.

## 4.4. Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Migrationsgeschwindigkeit von SCC13 Zellen und HaCaT Zellen

Mit Hilfe des Scratch Assays wurde der Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Migrationsgeschwindigkeit und die Vermehrung der Zellen gemessen.

Zu diesem Zweck wurde eine künstlichen Wunde („Scratch“) in adhärennten HaCaT und SCC13 Zellkulturen erzeugt und diese mit 5 sowie 10  $\mu\text{M}$  Konzentrationen an oxidierten Phospholipiden inkubiert und ihre Migrationsgeschwindigkeiten verglichen.

Dazu wurde die Breite der erzeugten „Wunde“ zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen und in Relation zu ihrer ursprünglichen Breite gesetzt.

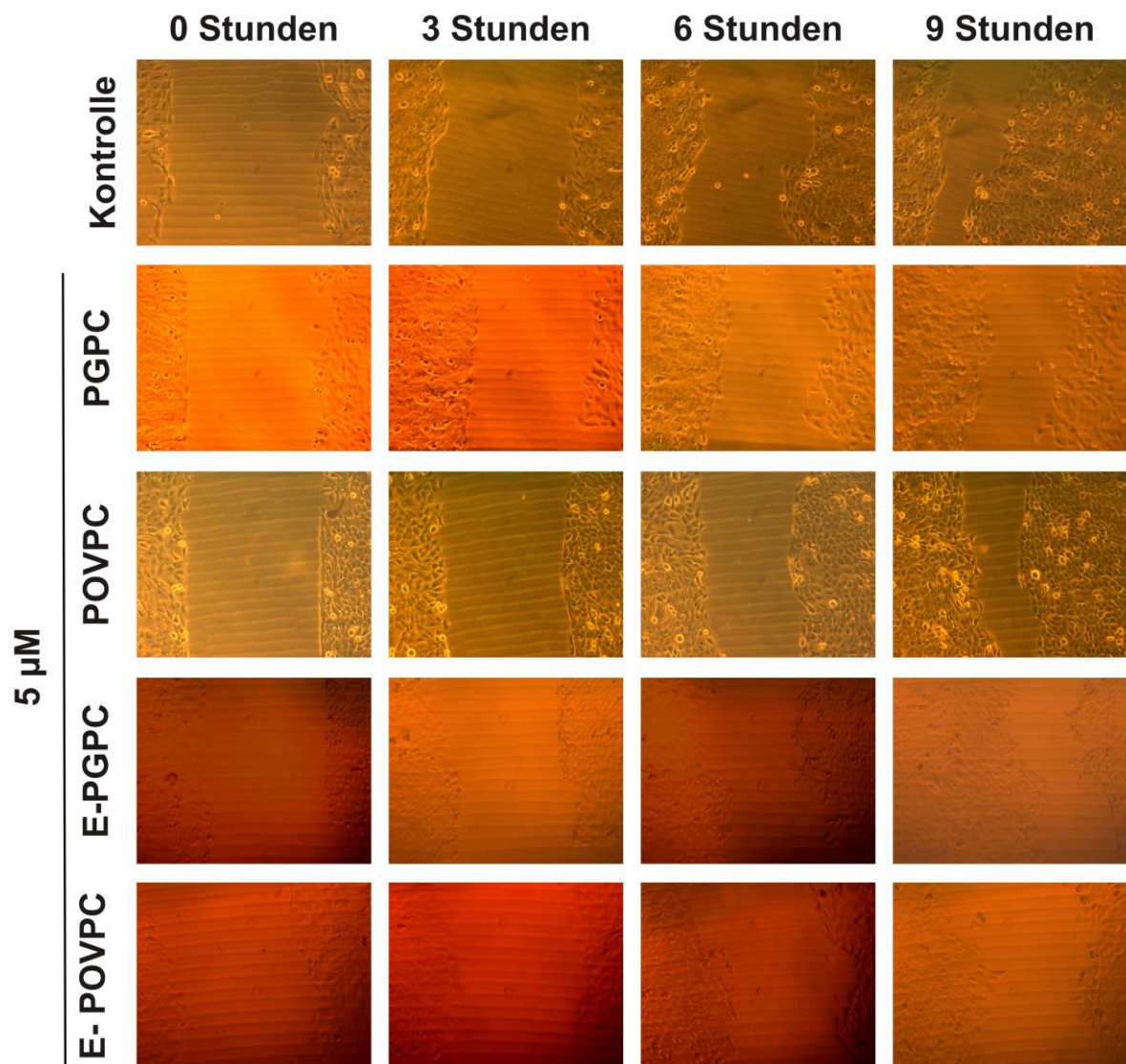
Auffallend dabei war, dass die Migrationsgeschwindigkeit der SCC13 Zellen generell um ein Vielfaches schneller war als jene der HaCaT Zelllinie. Während bei SCC13 Zellen die künstlich erzeugten „Wunden“ nach 9 Stunden völlig zugewachsen waren, benötigten HaCaT Zellen für die Migration in die „Wunde“ deutlich mehr Zeit.

Aufgrund der starken Toxizität von Edelfosin konnten bei diesem Lipid sowohl mit der SCC13 Zelllinie als auch mit der HaCaT Zelllinie keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.

Abbildung 26 zeigt eine Auswahl von Bildreihen der HaCaT Zelllinie nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  PGPC, POVPC, E-PGPC sowie E-POVPC.

Die Abbildung zeigt die fortschreitende Migration der Zellen bis 9h nach Start der Inkubation. Eine vollständige Verschließung der „Wunden“ konnte erst nach 24h beobachtet werden.

Eine vollständige Verschließung der „Wunden“ der SCC13 Zelllinie konnte hingegen bereits nach 9h beobachtet werden.



**Abbildung 26: Einfluss von 5 µM oxidierter Phospholipide auf die Migration von HaCaT Zellen.**

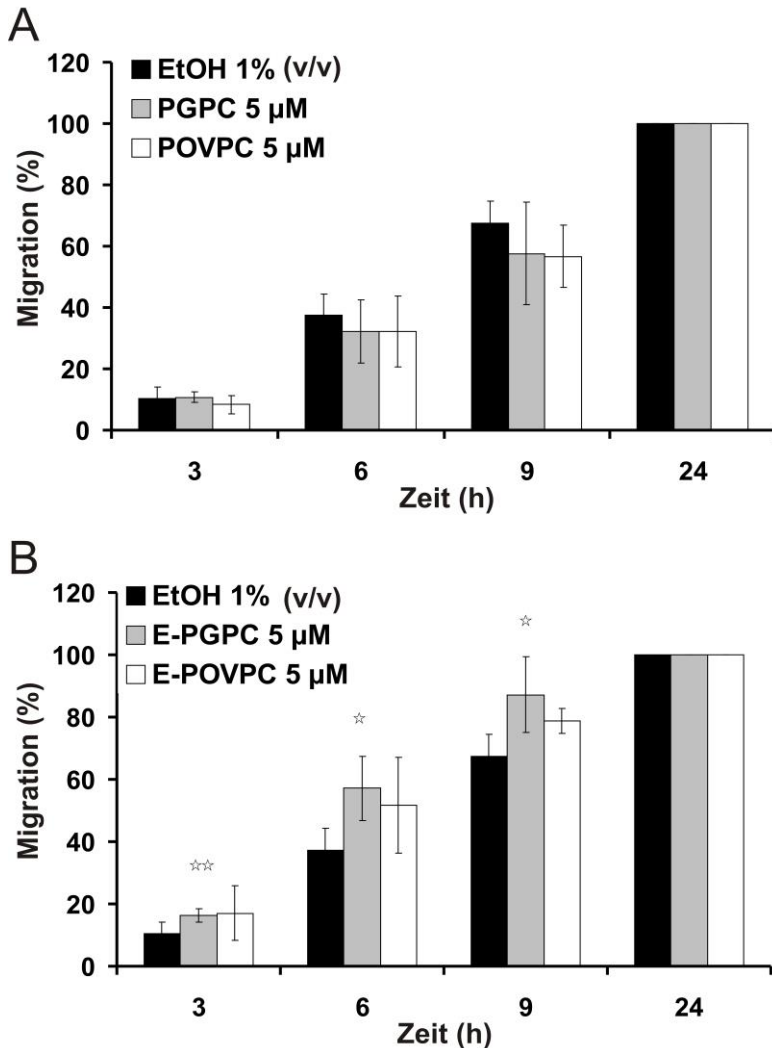
Die Zellen wurden ausgesät und dann ein zuvor eingesetztes Insert entfernt. Dadurch wurde eine künstliche „Wunde“ erzeugt. Die Zellen wurden mehrmals gewaschen und anschließend mit DMEM (2% FCS (v/v)) supplementiert mit 5 µM PGPC, POVPC, E-PGPC oder E-POVPC inkubiert. Als Kontrolle diente DMEM mit 1% EtOH (v/v). Unmittelbar nach Start der Inkubation sowie nach 3, 6, 9 und 24h wurden mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 35 sowie der Kamera Axio Cam HRC von Zeiss jeweils Aufnahmen des Scratches oberhalb und unterhalb einer gezogenen Linie gemacht. Dargestellt sind repräsentative Bildreihen (100x Vergrößerung) aus  $n \geq 3$  Messungen.

Anhand der Aufnahmen wurden mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institute of Health) die Scratch Breiten vermessen und so die Migration in Prozent der ursprünglichen Breite errechnet.

Abbildung 27 zeigt das Ergebnis für die HaCaT Zelllinie nach Inkubation mit 5 µM Lipid. Die Inkubation mit E-PGPC führt zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit. Nach Inkubation mit 10 µM Lipid (Abbildung 28) zeigt

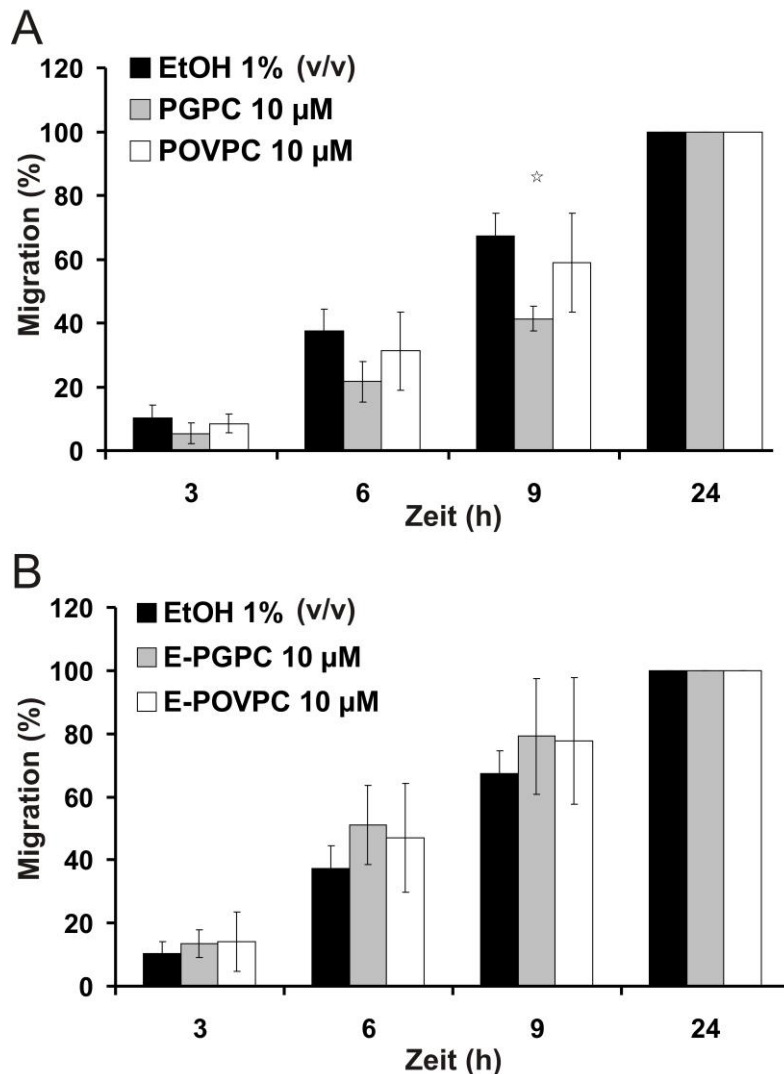
sich hingegen eine leichte Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit bei den mit PGPC inkubierten Zellen.

Die Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die Migrationsgeschwindigkeiten der SCC13 Zelllinie nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  (Abbildung 29) sowie 10  $\mu\text{M}$  (Abbildung 30) Lipid. Die Untersuchungen ergaben, dass es zu keinen signifikanten Änderungen der Migrationsgeschwindigkeiten nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden kommt.



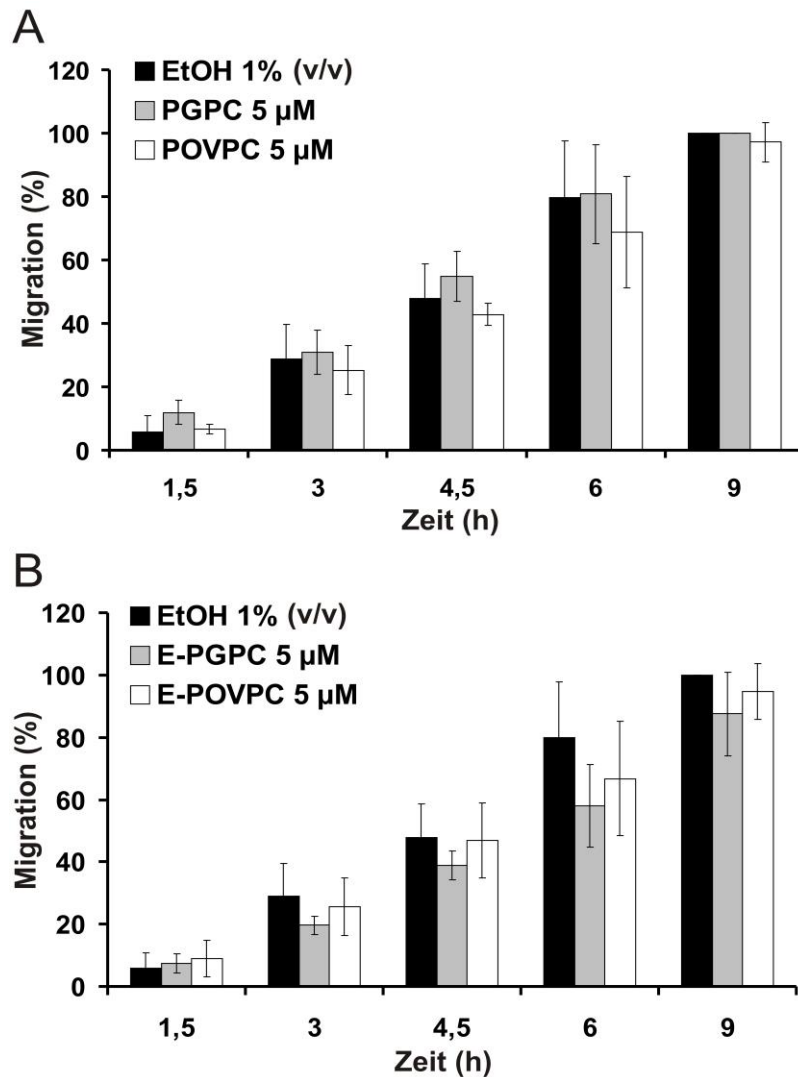
**Abbildung 27: Einfluss von 5  $\mu\text{M}$  oxidierter Phospholipide auf die Migration von HaCaT Zellen.**

Die Zellen wurden ausgesät und dann ein zuvor eingesetztes Insert entfernt. Dadurch kam es zur Entstehung einer künstlichen „Wunde“. Anschließend wurden die Zellen mehrmals gewaschen und mit DMEM (2% FCS (v/v)) supplementiert mit 5  $\mu\text{M}$  PGPC oder POVPC (A) bzw. E-PGPC oder E-POVPC (B) inkubiert. Als Kontrolle diente DMEM mit 1% EtOH (v/v). Unmittelbar nach Start der Inkubation sowie nach 3, 6, 9 und 24h wurden mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 35 sowie der Kamera Axio Cam HRC von Zeiss jeweils Aufnahmen des Scratches gemacht. Die Breite des Scratches wurde durch die Software ImageJ vermessen (Mittelung von 20 Messungen) und in Prozent des Null-Stunden Wertes angegeben. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit nur nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  E-PGPC im Vergleich zur EtOH 1% (v/v) Kontrolle. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,005$  Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n \geq 3$  Messungen.



**Abbildung 28: Einfluss von 10 µM oxidierter Phospholipide auf die Migration von HaCaT Zellen.**

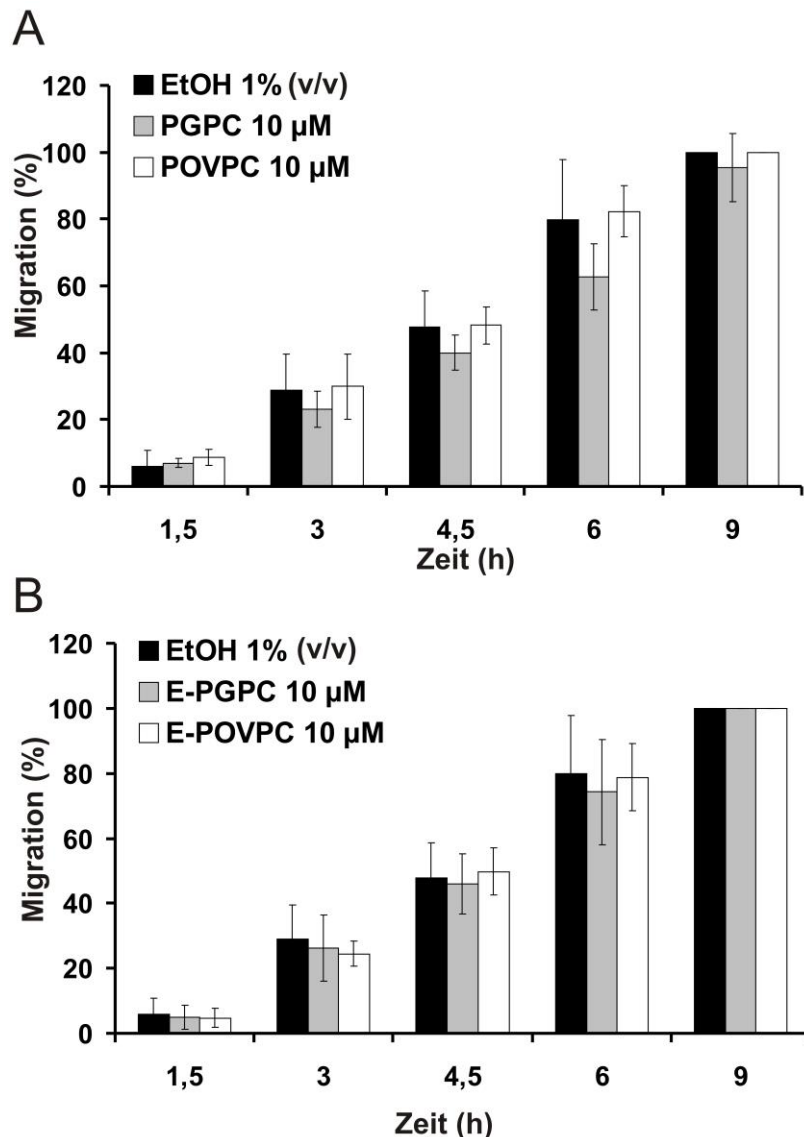
Die Zellen wurden ausgesät und dann ein zuvor eingesetztes Insert entfernt. Dadurch kam es zur Entstehung einer künstlichen „Wunde“. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Keratinozyten in DMEM (2% FCS (v/v)) mit 10 µM PGPC oder POVPC (A) bzw. E-PGPC oder E-POVPC (B) inkubiert. Als Kontrolle diente erneut DMEM mit 1% EtOH (v/v). Direkt nach Start der Inkubation sowie nach 3, 6, 9 und 24h wurden durch Einsatz des Mikroskops Axiovert 35 sowie der Kamera Axio Cam HRC von Zeiss jeweils Aufnahmen des Scratches gemacht. Mit Hilfe der Software ImageJ wurde die Breite des Scratches gemessen (Mittelung von 20 Messungen) und in Prozent des Null-Stunden Wertes angegeben. Es zeigt sich eine Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit nach Inkubation mit 10 µM PGPC, im Vergleich zur EtOH 1% (v/v) Kontrolle. \*  $P \leq 0,05$  Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n \geq 3$  Messungen sowie die dazugehörigen Standardabweichungen.



**Abbildung 29: Einfluss von 5 µM oxidierter Phospholipide auf die Migration von SCC13 Zellen.**

Die Zellen wurden ausgesät und dann ein zuvor eingesetztes Insert entfernt. Dadurch kam es zur Entstehung einer künstlichen „Wunde“. Die Zellen wurden anschließend mehrmals gewaschen und mit RPMI-1640 Medium mit 2% FCS (v/v) supplementiert mit 5 µM PGPC oder POVPC (A) bzw. E-PGPC oder E-POVPC (B) inkubiert. Als Kontrolle wurde RPMI-1640 Medium mit 1% EtOH (v/v) verwendet. Unmittelbar nach Start der Inkubation sowie nach 1.5, 3, 4.5, 6 und 9h wurden durch Einsatz des Mikroskops Axiovert 35 sowie der Kamera Axio Cam HRC von Zeiss Aufnahmen des Scratches oberhalb und unterhalb einer gezogenen Linie gemacht. Die Vermessung der Scratch Breite wurde mit Hilfe der Software ImageJ vorgenommen (Mittelung von 20 Messungen) und in Prozent des Null-Stunden Wertes angegeben. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Migration nach Inkubation mit 5 µM der Lipide im Vergleich zur EtOH 1% (v/v) Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte sowie die dazugehörigen Standardabweichungen aus  $n \geq 3$  Messungen.





**Abbildung 30: Einfluss von 10 µM oxidierter Phospholipide auf die Migration von SCC13 Zellen.**

Die Zellen wurden ausgesät und dann ein zuvor eingesetztes Insert entfernt. Dadurch kam es zur Entstehung einer künstlichen „Wunde“. Danach wurden die Zellen mehrmals gewaschen und anschließend in RPMI-1640 Medium (2% FCS (v/v)) mit 10 µM PGPC oder POVPC (A) bzw. E-PGPC oder E-POVPC (B) inkubiert. Als Kontrolle diente RPMI-1640 Medium mit 1% EtOH (v/v). Unmittelbar nach Start der Inkubation sowie nach 1,5, 3, 4,5, 6 und 9h wurden mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 35 sowie der Kamera Axio Cam HRC von Zeiss jeweils Durchlichtbilder des Scratches oberhalb und unterhalb einer gezogenen Linie gemacht. Mit Hilfe der Software ImageJ wurde die Breite des Scratches vermessen (Mittelung von 20 Messungen) und in Prozent des Null-Stunden Wertes angegeben. Erneut zeigt sich keine signifikante Veränderung der Migration im Vergleich zur EtOH 1% (v/v) Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n \geq 3$  Messungen.

## 4.5. Einfluss von oxidierten Phospholipiden auf die Ceramid-Bildung

Ceramid kann neben der *de novo* Synthese aus Serin und Palmitoyl CoA durch die Ceramid Synthasen auch durch die Hydrolyse von Sphingomyelin gebildet werden. Außerdem ist eine Bildung von Ceramid aus Sphingosin im Rahmen des so genannten „Salvage-Pathway“ möglich (Hannun und Luberto, 2000).

Die Bildung dieses Second-Messengers wird mit einer Reihe von extern ausgelösten Signaltransduktionswegen die sowohl zu Proliferation und Differenzierung als auch zu Apoptose führen können in Verbindung gebracht (Kitatani *et al.*, 2008).

### 4.5.1. Ceramid-Freisetzung durch Erhöhung der aSMase Aktivität

Die für die Hydrolyse von membranständigem Sphingomyelin verantwortlichen Enzyme werden als Sphingomyelinasen bezeichnet. Dabei kann zwischen neutraler, saurer und der sekretorischer Form der Sphingomyelinase unterschieden werden. Die in den Lysosomen und der Plasmamembran lokalisierte saure Sphingomyelinase (aSMase) kann unter anderem bei der Induktion von Apoptose eine wichtige Rolle spielen (Goni und Alonso, 2002).

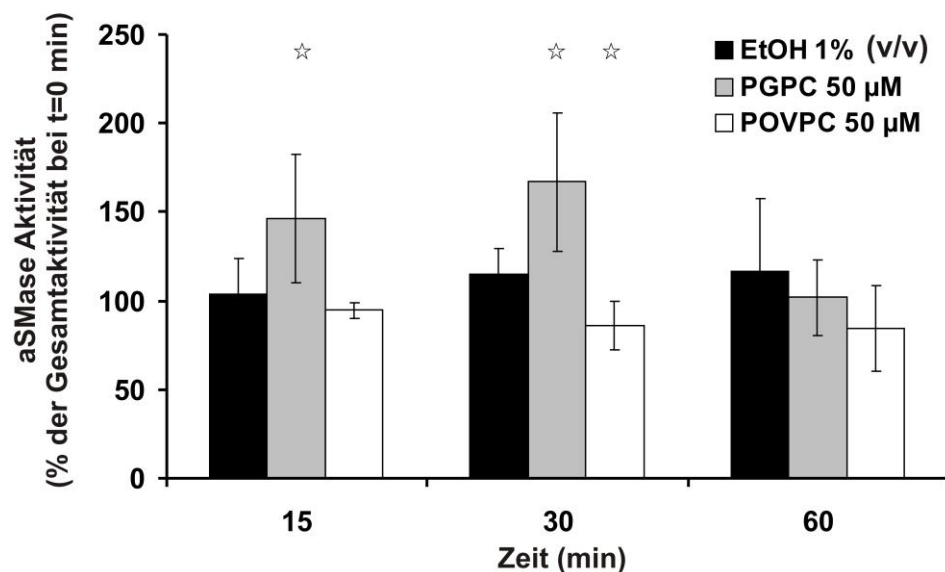
Um eine mögliche Rolle dieses Enzyms in den Phospholipid bedingten Veränderungen des Ceramidgehalts zu überprüfen, wurden die Aktivitäten dieses Enzyms bestimmt.

Da die FACS-Analysen des Zelltods ergeben hatten, dass die HaCaT Zelllinie nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden keine Erhöhung der Apoptose-Rate zeigt, wurde dieses Experiment nur mit der Hautkrebszelllinie SCC13 durchgeführt. Da die Aktivierung dieses Pathways mitunter sehr schnell vor sich gehen kann wurden für dieses Experiment Inkubationszeiten von 15, 30 und 60 min gewählt.

Zu diesem Zweck wurden die Hautkrebszellen mit 50  $\mu$ M PGPC oder POVPC inkubiert, geerntet und die Umsetzung von NBD-Sphingomyelin zu NBD-Ceramid durch Auftrennung der Reaktionsgemische nach 30 min Inkubationszeit mittels

Dünnschichtchromatographie analysiert. Anhand der Intensitäten der fluoreszierenden Spots auf der DC-Platte (NBD-Sphingomyelin und NBD-Ceramid) wurde die relative aSMase Aktivität im Vergleich zur 0 min Ethanol Kontrolle bestimmt (Abbildung 31).

Nach Inkubation der Zellen mit PGPC zeigt sich bereits nach 15 min eine signifikante Erhöhung der aSMase Aktivität die nach 30 min ihren Höhepunkt erreicht. Nach 60 min sinkt die aSMase Aktivität wieder zum Ausgangswert ab. Nach Inkubation mit POVPC zeigt sich hingegen eine leichte Verringerung der aSMase Aktivität nach 15, 30 und 60 min. Damit steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den Resultaten von Moutzi *et al.* (2007) sowie von Stemmer *et al.* (2012), die mit VSMC und Makrophagen durchgeführt wurden. Diese Studien zeigten eine deutliche Erhöhung der aSMase Aktivität nach Inkubation mit POVPC. Erhöhungen der aSMase Aktivität nach Inkubation mit POVPC wurden außerdem in mehreren Melanomzelllinien beobachtet, wobei diese stets mit einer Erhöhung des Ceramidgehalts einherging (Claudia Ramprecht, unveröffentlichte Daten). Die Ergebnisse dieser Zelllinien deuten darauf hin, dass die PGPC-induzierte Erhöhung der aSMase Aktivität eine Rolle bei der Induzierung von Apoptose spielt, da sie zu einer Erhöhung des Ceramidgehalts führen kann. Da eine Erhöhung des Ceramidgehalts häufig mit der Induzierung von Apoptose in Zusammenhang gebracht wird (Hannun und Luberto, 2000), könnte seine Erhöhung auch bei SCC13 Zellen für die Induzierung von Apoptose verantwortlich sein.



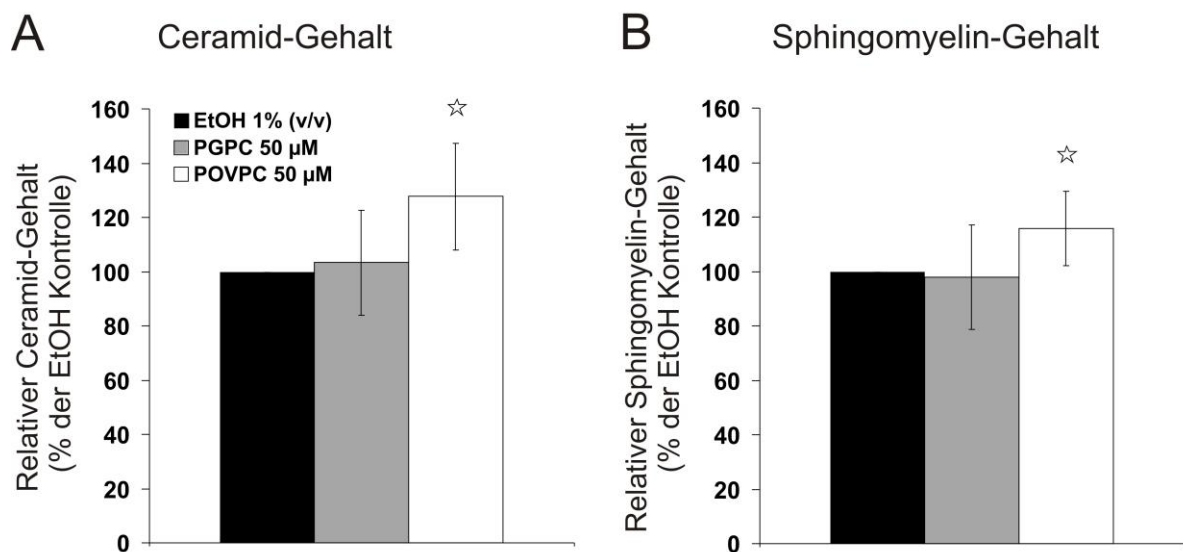
**Abbildung 31: Einfluss von PGPC und POVPC auf die Aktivität der sauren Sphingomyelinase in SCC13 Zellen.**

SCC13 Zellen wurden für 15, 30 sowie 60 min mit RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)) supplementiert mit 50 µM PGPC oder POVPC inkubiert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)) mit 1% EtOH (v/v). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Lysat (20 µg Protein) wurde mit 200 µl NBD-Sphingomyelin in Reaktionspuffer (10 µM) für 30 min inkubiert. Dabei erfolgte die Umsetzung von NBD-Sphingomyelin zu NBD-Ceramid in Abhängigkeit zur Konzentration der sauren Sphingomyelinase. Anschließend wurde die Reaktion abgestoppt, das Reaktionsgemisch mittels DC aufgetrennt und die Intensität der NBD-Sphingomyelin sowie NBD-Ceramid Banden unter UV Anregung bei 365 nm vermessen. Nach 15 sowie 30 min Inkubation mit 50 µM PGPC zeigt sich eine signifikante Erhöhung der aSMase Aktivität, welche erst nach 60 min Inkubation wieder absinkt. Im Gegenzug dazu ist die aSMase Aktivität nach Inkubation mit 50 µM POVPC durchgehend leicht verringert. Dargestellt sind Mittelwerte der relativen aSMase Aktivität in Prozent der jeweiligen Ethanol 0 min Kontrolle sowie die dazugehörigen Standardabweichungen aus  $n \geq 3$  Versuchen. \*  $P \leq 0,05$ .

#### 4.5.2. Veränderungen des Ceramid- und Sphingomyelingehalts nach Inkubation mit oxidierten Phospholipiden

Um Veränderungen des Ceramid- und Sphingomyelingehalts nachweisen zu können, wurde eine Sphingolipidanalyse von SCC13 Zellen nach Inkubation mit 50 µM der Lipide PGPC sowie POVPC durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 6h mit den oxidierten Phospholipiden inkubiert, geerntet und eine Lipidextraktion durchgeführt. Nach einer milden alkalischen Hydrolyse wurden die Proben mittels UPLC-MS analysiert. Die Auswertung erfolgte nach Berücksichtigung der Proteinkonzentrationen der Proben durch Angabe des Prozentsatzes an Ceramid bzw. Sphingomyelin im Vergleich zur EtOH Kontrolle. Abbildung 32-A zeigt die Ergebnisse der Ceramidanalyse bezüglich des Gesamtceramidgehalts, Abbildung 32-B zeigt Änderungen des Gesamtsphingomyelingehalts.

Wie Abbildung 32-A zeigt, kommt es nach Inkubation mit POVPC zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamtceramidgehalts. Anhand der Ergebnisse der Sphingomyelinanalyse ist ersichtlich, dass auch der Gehalt des Gesamtsphingomyelins nach Inkubation mit POVPC eine signifikante Erhöhung aufweist. Dies könnte an einer Aktivierung der *de novo* Synthese von Ceramid oder der Entstehung von Ceramid durch den „Salvage-Pathway“ liegen. Eine Analyse der beteiligten Enzyme wäre daher sinnvoll. Nahezu unverändert bleibt im Gegensatz dazu der Gehalt an Ceramid und Sphingomyelin nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  PGPC. Damit unterscheidet sich dieses Ergebnis von Resultaten mit mehreren Melanomzelllinien bei denen die Erhöhung der aSMase Aktivität auch mit der Erhöhung des Ceramidgehalts einherging (Claudia Ramprecht und Luise Britz, unveröffentlichte Daten). Um eine mögliche frühere Erhöhung des Ceramidgehalts nach Inkubation mit PGPC in SCC13 Zellen nachzuweisen, wäre es daher sinnvoll, kürzere Inkubationszeiten für die Sphingolipidanalysen zu wählen.



**Abbildung 32: Effekt von PGPC und POVPC auf den Ceramid- sowie Sphingomyelingehalt der SCC13 Zelllinie nach 6h Inkubation.**

Die Abbildung zeigt den relativen Gehalt an Gesamtceramid (A) sowie Gesamtsphingomyelin (B) in SCC13 Zellen nach 6h Inkubation in RPMI-1640 Medium (0,1% FCS (v/v)) supplementiert mit 50  $\mu\text{M}$  PGPC oder POVPC im Vergleich zur EtOH Kontrolle (1% (v/v)). Nach der Inkubation wurden die Krebszellen geerntet und eine Lipidextraktion durchgeführt. Anschließend wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt und die Proben mittels UPLC-MS analysiert. Es zeigt sich eine Erhöhung des Gesamtceramids sowie des Gesamtsphingomyelins nach 6h Inkubation mit POVPC bezogen auf die EtOH Kontrolle. Die Darstellung zeigt Mittelwerte der relativen Mengen an Ceramid sowie Sphingomyelin der Proben nach Normierung auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe sowie die dazugehörigen Standardabweichungen. \*  $P \leq 0,05$ .  $n=5$ .

## 5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cytotoxizität von oxidierten Phospholipiden auf eine immortalisierte Keratinozyten Zelllinie (HaCaT Zelllinie) sowie Zellen eines hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinoms (SCC13 Zelllinie) analysiert (Boukamp *et al.*, 1988; Masters und Palsson, 1999). Die HaCaT Zelllinie entstammt zwar der Peripherie eines malignen Melanoms, ist jedoch nicht tumorigen (Boukamp *et al.*, 1988). Aufgrund ihrer guten Proliferationsfähigkeit, sowie ihrer hohen Ähnlichkeit zu normalen Keratinozyten bezüglich ihrer Differenzierungskapazität (Boukamp *et al.*, 1988), diente diese Zelllinie als Referenzzelllinie, welche etwaige Veränderungen der SCC13 Zelllinie nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden herausheben sollte.

Bei den eingesetzten oxidierten Phospholipiden handelt es sich um PGPC und POVPC, die Oxidationsprodukte von PAPC sind, sowie ihre strukturverwandten Ether-Lipide E-PGPC und E-POVPC und das Diether-Lipid Edelfosin. Die Lipide PGPC und POVPC wurden unter anderem bereits mit der Induzierung von Apoptose in vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen und der damit verbundenen Rolle bei der Atherogenese in Verbindung gebracht (Loidl *et al.*, 2003; Stemmer *et al.*, 2012). Außerdem zeigten diese Lipide eine hohe Cytotoxizität auf Zellen von malignen Melanomen. Ihren strukturverwandten Ether-Lipiden wurde in Mausmelanomzellen eine ähnlich hohe Cytotoxizität nachgewiesen (Claudia Ramprecht und Luise Britz, unveröffentlichte Daten). Bei Edelfosin handelt es sich um ein Diether-Lipid, das bereits bei der Therapie von Tumoren zum Einsatz kommt, und eine relativ hohe metabolische Stabilität aufweist (Berdel und Okamoto, 1990; Nieto-Miguel *et al.*, 2007). Obwohl der Unterschied zwischen PGPC und POVPC gering erscheint, zeigen sie unterschiedliche chemische Eigenschaften. Während PGPC aufgrund seiner Carboxyl Gruppe an der *sn*-2 Position nur physikalisch mit anderen Molekülen interagieren kann, ist POVPC aufgrund seiner Aldehyd Funktion an dieser Position, auch in der Lage kovalente chemische Bindungen mit Aminogruppen von Proteinen und Lipoproteinen einzugehen (Deigner und Hermetter, 2008; Fruhwirth *et al.*, 2007; Stemmer *et al.*, 2012). Die Reaktivität dieser Moleküle ist unter

anderem von ihrer Verteilung im betroffenen System abhängig. Die Reaktionen der oxidierten Phospholipide mit Membranproteinen oder Lipiden sind von der Lokalisation der Aldehydgruppe sowie sterischen Eigenschaften und der Mobilität der Lipide abhängig. Im Gegensatz zu POVPC kann PGPC, wie oben beschrieben, keine kovalenten Bindungen mit Membranproteinen/Lipiden eingehen, es wirkt nur physikalisch. PGPC verändert die laterale Diffusion, jedoch die lokale Mobilität von Membranlipiden nicht (Stemmer und Hermetter, 2012).

Viabilitätsassays zeigten die Abnahme der Viabilität beider Zelllinien (insbesondere der HaCaT Zelllinie) unter Einfluss von steigenden Konzentrationen der oxidierten Phospholipide. Während die Viabilitätsassays (MTT Assays) von der Aktivität der Mitochondrien und des ER auf die Zellviabilität rückschließen, basieren Zelltod Analysen mittels FACS auf unterschiedliche Membraneigenschaften der Zellen. Im Gegensatz zu den Analysen des Zelltodes ermöglichen MTT Assays daher keine Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose.

Ein etabliertes Merkmal von apoptotischen Zellen ist die Anhäufung des negativ geladenen Phospholipids PS an der Außenseite ihrer Plasmamembran (Mirnikjoo *et al.*, 2009). Diese Eigenschaft dient der Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen und wird auch bei der Unterscheidung von apoptotischen sowie nekrotischen und lebenden Zellen mittels FACS genutzt (Yamaji-Hasegawa und Tsujimoto, 2006; Molecular Probes, 2010; BD Biosciences, 2012). Die vermehrte Expression von PS an der Membranaußenseite ist jedoch nicht nur eine Kennzeichnung für apoptotische Zellen, sondern tritt auch bei Krebszellen vermehrt in Erscheinung (Riedl *et al.*, 2011).

Die in den FACS-Messungen erzielten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass es nach 6 stündiger Inkubation der SCC13 Zelllinie mit 50  $\mu$ M der oxidierten Phospholipiden PGPC, POVPC sowie E-PGPC und E-POVPC zu einem signifikanten Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen auf ca. 50% kommt. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei der HaCaT Zelllinie signifikante, wenn auch im Vergleich zur Erhöhung des Anteils apoptotischer SCC13 Zellen, schwächere Erhöhungen des Anteils nekrotischer Zellen. Während sich bei arteriellen glatten Muskelzellen (Loidl *et al.*, 2003) und Zellen von malignen Melanomen (Claudia Ramprecht, unveröffentlichte Daten) eine stärkere toxische Wirkung von POVPC

im Vergleich zu PGPC zeigte, zeigten die Ergebnisse dieser Messserie bei der SCC13 Zelllinie einen nahezu gleich starken Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Loidl *et al.* (2003) mit glatten Muskelzellen, zeigte PGPC in RAW 264.7 Makrophagen und BMM („Bone Marrow derived Macrophages“) eine stärkere Wirkung als POVPC (Stemmer *et al.*, 2012). Auch bei Versuchen mit der murinen B16 Zelllinie wurde eine geringfügig stärkere Wirkung von PGPC und E-PGPC gezeigt.

Der gleich starke Anstieg der Apoptoserate von SCC13 Zellen nach Inkubation mit PGPC und E-PGPC bzw. POVPC und E-POVPC deutet darauf hin, dass die Ether-Gruppe an der *sn*-1 Position bei der Wirkung der oxidierten Phospholipide lediglich eine geringe Rolle spielt. Damit liegen diese Ergebnisse auf einer Linie mit den Schlussfolgerungen von Subbanagounder *et al.* wonach die *sn*-2 Position für die spezifische Wirkung von oxidierten Phospholipiden verantwortlich ist, während die *sn*-1 Position nur eine vergleichsweise geringere Funktion hat (Subbanagounder *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Stemmer *et al.* (2012) die mit RAW 264.7 Makrophagen erzielt wurden. Die Ether-Lipide zeigen in diesem Fall eine geringfügig höhere Apoptoserate als PGPC und POVPC. Ähnlich den Ergebnissen des MTT Assays, zeigte Edelfosin auch bei den FACS-Messungen eine stark cytotoxische Wirkung. Im Unterschied zu den anderen oxidierten Phospholipiden war hier jedoch bei beiden Zelllinien bereits nach 25  $\mu$ M Lipidkonzentration eine signifikante Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen zu erkennen. Nach 6h Inkubation mit 50  $\mu$ M dieses Lipids war es aufgrund der starken Beeinträchtigung der Zellen nicht möglich repräsentative Messungen durchzuführen. Diese stark cytotoxische Wirkung ist möglicherweise seiner bereits im vorigen Abschnitt beschriebenen metabolischen Stabilität zuzuschreiben. Wie bereits von Zeiss im Jahr 2003 beschrieben wurde, weisen auch diese Resultate zusammengefasst darauf hin, dass Apoptose ein Zelltyp- und Stimulus-abhängiger Prozess ist.

Einen möglichen Ansatzpunkt für die Interaktion der Lipide mit den Zellen könnte das oben erwähnte negativ geladene Phospholipid PS darstellen (Riedl *et al.*, 2011). PS wird physiologisch zusammen mit anderen geladenen Phospholipiden wie beispielsweise PE an der Innenseite der Zellmembran exprimiert, während neutrale Phospholipide wie PC und Sphingomyelin an der Außenseite exprimiert



werden. Die bei apoptotischen- und Krebszellen erhöhte Expression von PS könnte auf die reduzierte Aktivität einer ATP abhängigen Phospholipid-Translocase (Flippasen oder Floppasen) oder der Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Scramblase zurückzuführen sein (Gordesky und Marinetti, 1973; Daleke, 2003). Während es bei PGPC und E-PGPC aufgrund ihrer ebenfalls negativ geladenen Carboxylgruppe an der *sn*-2 Position weniger wahrscheinlich scheint, dass sie über eine Interaktion mit PS in die Zellen gelangen, besitzen POVPC und E-POVPC an der *sn*-2 Position eine Aldehyd Gruppe mit der sie kovalente Bindungen mit  $\text{NH}_2$  Gruppen eingehen könnten (Deigner und Hermetter, 2008; Fruhwirth *et al.*, 2007). So wurde die Bildung von BY-POVPE Addukten mit PS (und PE) bereits in mehreren Melanomzelllinien mittels 2-D Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Die als Kontrolle dienende Melanozyten Zelllinie zeigte im Gegensatz zu den Krebszellen keine Adduktbildung an diesen Stellen (Claudia Ramprecht, unveröffentlichte Daten).

Ebenfalls möglich scheint die Aufnahme der oxidierten Phospholipide durch Rezeptoren wie dem Scavenger Rezeptor CD36 (McIntyre, 2012). Dieser Rezeptor spielt vor allem bei Atherosklerose und der Erkennung von Zellen durch Makrophagen eine beträchtliche Rolle (Boullier *et al.*, 2001; Berliner *et al.*, 2009). Außerdem ist er bei der Membranhomöostase von Bedeutung, da er für den Austausch von Fettsäuren sorgt (Feingold, 2007).

Daneben ist auch eine Interaktion mit Toll-like Rezeptoren oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren möglich (Fruhwirth *et al.*, 2007).

Rhode *et al.* (2008) haben gezeigt, dass oxidierte Phospholipide auch über Endocytose durch Caveolae und „Clathrin-coated Pits“ aufgenommen werden können. In diesem Zusammenhang wurde eine erhöhter Einbau der Lipide bei Überexpression von SR-BI, einem in den Caveolae lokalisierten Scavenger Rezeptor der Rezeptor Familie CD36 gezeigt. Dies liegt jedoch nicht an der direkten Interaktion der Lipide mit dem Rezeptor, sondern an der erhöhten Fluidität der Membran, welche den Einbau der oxidierten Phospholipide erleichtern könnte.

Die Aufnahme der oxidierten Phospholipide ist außerdem von der Krümmung der Membran abhängig. Oxidierte Phospholipide sind besonders häufig in Regionen mit einer starken Krümmung vorhanden, induzieren diese aber auch (Rhode *et al.*,

2008). So wurde gezeigt, dass Aldehydo-Phospholipide eine positive Krümmung von Membranen verursachen können, welche mit strukturellen und funktionellen Veränderungen, wie beispielsweise der Bildung von Membranvesikeln einhergehen kann (Stemmer und Hermetter, 2012).

Eine andere Möglichkeit für oxidierte Phospholipide in Zellen zu gelangen, stellt das humane Homolog zu Lem3p aus *Saccharomyces cerevisiae*, TMEM30a, dar. Dieses hauptsächlich in Membranen vorhandene Transportsystem ist in der Lage Cholinphospholipide rasch in die Zellen zu internalisieren, wie am Beispiel von Edelfosin und PAF gezeigt wurde (Chen *et al.*, 2011).

Die Ähnlichkeit zu PAF führt dazu, dass oxidierte Phospholipide auch über Transportsysteme für PAF-Analoga eingebaut werden können (Fruhvirth *et al.*, 2007).

Um die Verteilung, Aufnahme und Einbau von PGPC und POVPC in den Zellen nachzuweisen, wurden BODIPY<sup>TM</sup> markierte Analoga der oxidierten Phospholipide genutzt. Diese zeigen ein stärkeres Fluoreszenzsignal als zum Beispiel Pyren markierte Analoga und ihr Verhalten bezüglich zellulärer Verteilung scheint gleich zu sein wie das ihrer unmarkierten Gegenstücke, wie am Beispiel der Aktivierung von aSMase und der damit verbundenen Induktion von Apoptose in arteriellen glatten Muskelzellen gezeigt wurde (Moumtzi *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden eventuelle Colokalisationen mit den Zellorganell-spezifischen Markern Cell Mask<sup>TM</sup> Deep Red plasma membrane stain, Mito Tracker Red CMXRos und ER-Tracker<sup>TM</sup> Red nach 5 sowie 30 min Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden abgeklärt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass nur lebende Zellen ohne morphologische Veränderungen wie zum Beispiel „apoptotic blebbing“ herangezogen werden, da im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde, dass stark beeinträchtigte Zellen häufig übermäßig kräftig gefärbt in Erscheinung treten. Diese durch die starke Beeinträchtigung der Zellen entstandene Markierung mit beiden Markern könnte fälschlicherweise als Colokalisation gedeutet werden.

Die HaCaT Zelllinie zeigte sowohl nach 5 als auch nach 30 min eine eindeutige Lokalisierung beider Lipide an der Zellmembran und daher eine Colokalisation mit Cell Mask<sup>TM</sup> Deep Red plasma membrane stain. Diese Ergebnisse hinterlegen die

Resultate der FACS-Messungen, bei denen die HaCaT Zelllinie auch in höheren Konzentrationen eine vergleichsweise geringe Reaktion auf die Lipide zeigte. Bei der SCC13 Zelllinie zeigte sich nach 5 min Inkubationszeit ebenfalls eine Lokalisierung der Lipide an der Zellmembran. Diese konnte durch Cell Mask™ Deep Red plasma membrane stain jedoch nicht bestätigt werden, da sich dieser Marker, wie auch schon bei anderen Tumorzelllinien, innerhalb weniger Minuten diffus über das Innere der Zellen verteilte (unveröffentlichte Daten). Dies könnte durch die veränderten Eigenschaften der Plasmamembranen von Tumorzellen zu Stande kommen (Riedl *et al.*, 2011). Nach 30 min Inkubationszeit zeigte sich eine Verteilung beider Lipide im Zellinneren. Dies wurde durch die partielle Colokalisation beider Lipide mit ER-Tracker™ Red bestätigt. Eine Colokalisation von Mito Tracker Red CMXRos mit den Lipiden scheint anhand der Ergebnisse zu diesen Zeitpunkten als eher unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der SCC13 Zelllinie zeigen damit Ähnlichkeit zu denen der B16 Melanomzelllinie, bei denen sich nach 30 min Inkubation ebenfalls eine Colokalisation von ER-Tracker und BY-POVPE zeigte. BY-PGPE zeigte bei der B16 Zelllinie im Unterschied jedoch bereits nach 5 min eine Colokalisation mit dem ER-Tracker (Luise Britz, unveröffentlichte Daten). Die Lokalisierung der Lipide am ER könnte auf eine Induzierung von Apoptose durch ER-Stress hindeuten (Xu *et al.*, 2005). ER Stress spielt unter anderem auch bei der Wirkung von Edelfosin eine Rolle. Dabei kann es zur Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER, zur Aktivierung von Bax und Bak sowie Caspase 4 und 8 und weiteren proapoptotischen Proteinen kommen (Nieto-Miguel *et al.*, 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe deuten auch darauf hin, dass die vom ER ausgelösten Signale Einfluss auf die Mitochondrien haben. So ist es denkbar, dass es in Folge der  $Ca^{2+}$  Freisetzung aus dem ER zu einer Sensitivierung der Mitochondrien für Stress Signale kommt (Nieto-Miguel *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse liegen damit auf einer Linie mit denen von Pinton *et al.* welche bereits 2001 einen Zusammenhang zwischen der  $Ca^{2+}$  Freisetzung und der Ceramid induzierten Apoptose in HeLa Zellen sahen. Dabei wurde die Wirkung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 durch die der Ceramiderhöhung vorhergehenden Freisetzung des  $Ca^{2+}$  aus dem ER und der daraus folgenden Schwächung der Ceramid bedingten  $Ca^{2+}$  Freisetzung beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde ein sog. „Two hits“ Model als mögliche Erklärung beschrieben. Dieses besagt, dass der ER bedingte Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$  Konzentration die

Mitochondrien sensitiviert und so die Wirkung von potentiellen apoptotischen Stimuli, wie zum Beispiel Caspasen, zulässt (Pinton *et al.*, 2001). Außerdem findet die *de novo* Synthese von Ceramid im ER statt (Gault *et al.*, 2012). Dieser Prozess könnte damit ebenfalls ein Ziel der oxidierten Phospholipide darstellen. Eine mögliche direkte Weitergabe von Ceramid des ER an die Mitochondrien durch Vesikel oder Mitochondrien assoziierte Membranen und der damit verbundenen Permeabilisierung der Mitochondrien und Cytochrom C Freisetzung wurde ebenso bereits beschrieben (Stiban *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse der B16 und SCC13 Zelllinie weichen deutlich von denen mit VSMC ab. In letzterer Zelllinie wurde nachgewiesen, dass BY-POVPE in den Membranen lokalisiert bleibt, während BY-PGPE rasch in die Zellen aufgenommen wird. Dabei wurde eine Colokalisation von BY-PGPE mit einem für Lysosomen spezifischem Tracker festgestellt. Die naheliegende Interaktion mit der ebenfalls in den Lysosomen lokalisierten aSMase wurde im weiteren Versuchsverlauf bestätigt. Interessanterweise zeigte in dieser Zelllinie aber auch POVPC eine signifikante Erhöhung der aSMase Aktivität (Moumtzi *et al.*, 2007). Möglicherweise spielt hier die teilweise an Zellmembranen lokalisierte sekretorische Form der sauren SMase eine Rolle. Die im Vergleich zu BY-PGPE längere Lokalisierung von BY-POVPE an den Zellmembranen wird durch die von Stemmer und Hermetter beschriebene Lokalisierung der Aldehyd Gruppe an der *sn-2* Position von POVPC direkt an der Wasser-Lipid Interphase von Membranen und der damit möglichen Interaktion mit Membranproteinen/Lipiden erklärt (Stemmer und Hermetter, 2012). Da eine Colokalisation der BODIPY™ Lipide mit den Lysosomen in SCC13 Zellen nicht ausgeschlossen werden konnte, stellt die saure SMase auch in dieser Zelllinie ein mögliches Ziel der oxidierten Phospholipide dar. Weitere denkbare Ansatzpunkte ergeben sich aus den von Stemmer *et al.* (2012) veröffentlichten Zielproteinen und Lipiden von BY-POVPE in Makrophagen.

Veränderungen im Sphingomyelin-Ceramidstoffwechsel werden unter anderem mit der Aktivierung von Apoptose in Verbindung gebracht (Seumois *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2005). Diese Veränderungen unterliegen einerseits der *de novo* Synthese durch verschiedene Ceramid Synthasen und andererseits der Spaltung von Sphingomyelin durch SMasen (Hannun und Luberto, 2000). Außerdem ist

eine Involvierung der Spaltung von Sphingosin-1-Phosphat, und der damit verbundenen Verschiebung des Sphingosin-1-Phosphat – Ceramid Gleichgewichts zu Gunsten von Ceramid, bereits mit der Ceramid bedingten Induzierung von Apoptose in Verbindung gebracht worden (Reiss *et al.*, 2003). Da nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden PGPC und POVPC eine deutliche Erhöhung des Anteils apoptotischer SCC13 Zellen beobachtet worden war, und auch die partielle Colokalisation von BY-PGPE und BY-POVPE mit dem ER-Tracker auf eine Involvierung der Enzyme des Sphingomyelin-Ceramid Kreislaufes hindeutete, erschien die Analyse des Ceramid-Rheostates als sinnvoll. Dazu wurden Sphingolipidanalysen nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden durchgeführt. Dabei wurde eine Erhöhung des Ceramid- (sowie auch des Sphingomyelin-) Gehalts nach 6h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  POVPC festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen nach Inkubation mit PGPC keine Veränderungen. Eine deutliche Erhöhung des Ceramidgehalts nach Inkubation mit POVPC zeigten auch mehrere Melanomzelllinien, wobei diese Erhöhung mit einem Anstieg der aSMase Aktivität einherging (Claudia Ramprecht, unveröffentlichte Daten).

Auch die Erhöhung des Ceramidgehalts von B16 Maus-Melanomzellen nach 25  $\mu\text{M}$  Inkubation mit PGPC oder POVPC ging in beiden Fällen mit der Erhöhung der aSMase Aktivität einher (Luise Britz, unveröffentlichte Daten). Eine Erhöhung der aSMase Aktivität wurde außerdem bereits in Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose in arteriellen glatten Muskelzellen beobachtet. In der weiteren Signalkaskade wurden hier unter anderem bereits eine Aktivierung von p38 MAPK und JNK sowie Caspase 3 beschrieben (Loidl *et al.*, 2003; Ravid *et al.*, 2003).

Um dies in SCC13 Zellen ebenfalls abklären zu können, wurden mit dieser Zelllinie ebenfalls aSMase Assays durchgeführt. Die Aktivierung dieses Enzyms kann mitunter sehr schnell erfolgen.

Bemerkenswerterweise kam es nach Inkubation mit PGPC bereits nach 15 min zu einer signifikanten Erhöhung der aSMase Aktivität, die nach 30 min wieder abnahm und nach 60 min nahe ihrem Ausgangswert war. Dem zufolge musste es innerhalb von 15 min zu einer Aufnahme des Lipids in die Zellmembran und zu einer Aktivierung eines Signaltransduktionsweges kommen. Für die Aktivierung von aSMase kommen generell transkriptionelle oder posttranslationale Veränderungen in Frage. Aufgrund des kurzen Zeitfensters scheint eine Erhöhung

des Expressionslevels von aSMase jedoch eher unwahrscheinlich. Bereits im Jahr 2007 wurde von Zeidan und Hannun in diesem Zusammenhang die PKC  $\delta$  abhängige Aktivierung von aSMase beschrieben. Dabei kommt es durch Phosphorylierung eines Serins zur Translokation der aSMase von den Lysosomen hin zur Plasmamembran. Außerdem wurde eine aSMase Aktivierung in Verknüpfung mit den bei der von TNF $\alpha$  ausgelösten Signalkaskade eine Rolle spielenden Proteinen TRADD und FADD beschrieben (Schwandner *et al.*, 1998).

Die Diskrepanz zwischen der nicht vorhandenen Erhöhung des Ceramidgehalts und der erhöhten aSMase Aktivität nach Inkubation mit PGPC könnte mit der langen Inkubationszeit vor den Sphingolipidanalysen erklärt werden. So wäre es möglich, dass die Erhöhung des Ceramidgehalts nur zu einem früheren Zeitpunkt sichtbar ist, weshalb Sphingolipidanalysen nach einer kürzeren Inkubationszeit sinnvoll wären. Nach Inkubation mit POVPC kam es interessanterweise zu keiner Erhöhung der aSMase Aktivität. Damit steht dieses Ergebnis, wie oben beschrieben, im Gegensatz zu Resultaten mit der murinen B16 Zelllinie und anderen Melanomzelllinien, wo sich eine Erhöhung der aSMase Aktivität auch nach Inkubation mit POVPC gezeigt hatte (Luise Britz und Claudia Ramprecht, unveröffentlichte Daten).

Die Erhöhung des Ceramidgehalts nach Inkubation mit POVPC könnte daher durch die alleinige Aktivierung der *de novo* Synthese oder der Entstehung aus Sphingosin (Salvage Pathway) erklärt werden (Levy und Futerman, 2010). Eine Abklärung der beteiligten Enzyme wäre daher ebenfalls sinnvoll. Wie bereits von Kolesnick (2002) beschrieben wurde, könnte ein verändertes Gleichgewicht zwischen Sphingosin-1-Phosphat und Ceramid ebenfalls eine Rolle bei der Induzierung des Zelltodes spielen, was eine Erklärung für den erhöhten Ceramidgehalt darstellen würde. Darüber hinaus ist eine Aktivierung der neutralen SMase möglich (Levade und Jaffrezou, 1999). Bei der Durchführung von Vorversuchen mit der SCC13 Zelllinie, wurde jedoch festgestellt, dass diese eine deutlich niedrigere Grundaktivität als die saure SMase hat und in Folge dessen eine nSMase bedingte Ceramiderhöhung in dieser Zelllinie als eher unwahrscheinlich erscheint. Der ebenfalls erhöhte Sphingomyelingehalt könnte durch den Umbau von Ceramid zu Stande kommen. Möglicherweise könnte dies als letzter Versuch der Zelle, den drohenden Zelltod zu verhindern, gedeutet werden.

Nicht außer Acht zu lassen ist die Bedeutung von „Lipid rafts“ und Ceramid Plattformen bei der Mediation von Ceramid bedingter Apoptose. Dabei handelt es sich um Regionen der Zellmembran, die eine hohe Ordnung und einen hohen Sphingolipid- und Cholesterol-Gehalt haben. Diese beeinflussen die Membraneigenschaften hinsichtlich ihrer Fluidität und sind in Signalwegen involviert. Ceramid Plattformen werden trotz ihrer vergleichsweise geringeren Größen ähnliche Eigenschaften nachgesagt. So spielen die initiale Membran-Zusammensetzung, die Mobilität der Proteine und Lipide innerhalb der Membran und verschiedene Moleküle die diese Eigenschaften beeinflussen beispielsweise eine Rolle bei der Aktivität von SMasen (Silva *et al.*, 2009). Es ist daher möglich, dass oxidierte Phospholipide die Membraneigenschaften dahingehend beeinflussen, dass diese wiederum eine erhöhte SMase Aktivität veranlassen. Als unmittelbare Folge der SMase Erhöhung wird Ceramid gebildet, was wieder Einfluss auf die Membraneigenschaften hat. Möglicherweise spielt dabei die sekretorische Form von aSMase eine Rolle, da hier gezeigt wurde, dass diese in Vesikel in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert ist und somit unabhängig vom pH Wert Sphingomyelin auch direkt an der Membran oder in Vesikel hydrolysieren kann. Außerdem wurde nachgewiesen dass diese Form der aSMase auch in Mikrodomänen die einen hohen Sphingomyelingehalt haben, lokalisiert ist (Kolesnick, 2002; Levade und Jaffrezou, 1999).

Auch wenn die Erhöhung von aSMase nach Inkubation mit PGPC einen guten Hinweis auf die Apoptose auslösende Signalkaskade dieses Lipids gibt, so ist der vollständige Mechanismus noch ungeklärt. Auch ungeklärt bleibt der Wirkmechanismus von POVPC. So ist neben der mitochondriell bedingten Apoptose auch eine Aktivierung der „Death Receptor“ abhängigen Apoptose (Mathias *et al.*, 1998) möglich, wobei die nicht vorhandene Colokalisation von BY-POVPE und BY-PGPE mit den Mitochondrien gegen eine Aktivierung der mitochondriell bedingten Apoptose spricht. Auch ein Zusammenspiel zwischen mehreren Kaskaden erscheint durchaus als möglich.

Modelle wonach Ceramid-Plattformen in die Aktivierung von Apoptose involviert sind, beschreiben sowohl Fas als auch TNF $\alpha$  abhängige Prozesse. Bei Fas aktivierter Apoptose könnte beispielsweise die Bindung von FasL zur Freisetzung von geringen Mengen an Caspase 8 führen, was zu einer Rekrutierung von aSMase an die Zellmembran führen könnte. Durch die aSMase bedingte Spaltung

von Spingomyelin könnten so Ceramid-Plattformen entstehen, welche die weitere Signalkaskade von Fas (siehe Einleitung) veranlassen könnten. Daneben kann Ceramid auch direkt an verschiedene Zielproteine innerhalb der Zellen binden. Darunter befinden sich CAPP und CAPK (siehe Einleitung), Isoformen von Proteinkinase C sowie CathepsinD (Kolesnick, 2002). CAPPs verursachen als Reaktion auf erhöhte Ceramid Konzentrationen beispielsweise Wachstumsstillstand und Apoptose, wobei in diesem Zusammenhang unter anderem eine Involvierung von Bcl-2 erwähnt wird (Kolesnick, 2002; Zimmermann *et al.*, 2001). Eine Aktivierung der MAPK Kaskade erscheint ebenfalls als möglich (Loidl *et al.*, 2003). Außerdem kann die Bildung von CathepsinD zur Aktivierung von Apoptose führen (Kolesnick, 2002). Dieses Protein befand sich interessanter Weise auch unter den Zielproteinen von BY-POVPE in Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012).

Ceramid könnte daher einerseits als Apoptose induzierendes Agens genutzt werden und andererseits könnte das Blockieren der Ceramid-Produktion eine gute Strategie darstellen, um Nebenwirkungen in Folge von Chemotherapie oder Bestrahlung zu verhindern (Kolesnick, 2002).

Um den Einfluss der oxidierten Phospholipide auf die Zellwanderung bei invasiven und metastasierenden Plattenepithelkarzinomen zu analysieren, wurden Migrationsassays durchgeführt. Diese „Wundheilungs-Assays“ unterscheiden sich von anderen Migration-Assays dahingehend, als dass bei ihnen nicht die Migration durch eine Membran, sondern die Migration in eine zellfreie Fläche gemessen wird (Cherepanova *et al.*, 2009).

Bei der HaCaT Zelllinie zeigte sich dabei nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  E-PGPC oder E-POVPC eine teilweise signifikante Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit. Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf geben, dass die beiden Ether-Lipide in niedrigen Konzentrationen die Migration von Keratinozyten unterstützen, während sie in höheren Konzentrationen toxisch auf weiße Hautkrebszellen wirken (siehe FACS-Messungen). Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Wirkung dieser oxidierten Phospholipide stark konzentrationsabhängig ist. Während sich nach Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  E-PGPC eine Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit zeigt, kommt es nach Inkubation mit 25  $\mu\text{M}$  desselben Lipids zu einer Steigerung der Nekroserate. Im Gegenzug zu den beiden Ether-Lipiden wirkten sich PGPC



und POVPC in niedrigen Konzentrationen leicht negativ auf die Migrationsgeschwindigkeit von HaCaT Zellen aus, was wiederum die Frage in den Raum stellt ob die Gruppe an der *sn*-1 Position doch bedeutungsvoller ist, als es die FACS-Messungen hätten schließen lassen. Bei B16 Zellen zeigte sich indessen eine starke Verringerung der Wundheilungs-Geschwindigkeit nach Inkubation mit 5  $\mu$ M POVPC (Luise Britz, unveröffentlichte Daten).

Im klaren Gegensatz dazu stehen Versuche mit VSMC, welche gezeigt haben, dass nach Inkubation mit POVPC eine Erhöhung der Wundheilungs-Geschwindigkeit (Scratch Assay) sowie der Migrationsgeschwindigkeit (Migrations Assay) feststellbar ist (Pidkovka *et al.*, 2007; Cherepanova *et al.*, 2009). Im Unterschied zu den oben beschriebenen Zellen, zeigten SCC13 Zellen keine signifikanten Änderungen der Wundheilungs-Geschwindigkeit nach Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse erneut, dass die Wirkung von oxidierten Phospholipiden stark vom Zelltyp- sowie Konzentrations-abhängig ist. Die in diesem Absatz beschriebenen Eigenschaften könnten damit einen neuen Ansatz bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen darstellen. So könnte die in niedrigen Konzentrationen ausgelöste Erhöhung der Wund-Heilungsgeschwindigkeit von HaCaT Zellen auf eine zusätzliche unterstützende Wirkung bei der Regeneration des betroffenen Gewebes hindeuten, während gleichzeitig eine Induktion von Apoptose in weißen Hautkrebszellen erreicht werden könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass oxidierte Phospholipide in SCC13 Zellen bevorzugt Apoptose auslösen. Fluoreszierende Analoga von PGPC und POVPC werden rasch in die Zellen aufgenommen und es konnte eine Lokalisierung im ER nachgewiesen werden. Interessanterweise hatten die oxidierten Phospholipide keinen Einfluss auf die Migration von SCC13 Zellen. Ein höherer Ceramid- und Sphingomyelin-Gehalt nach Inkubation mit POVPC kann wahrscheinlich auf die *de novo* Synthese oder den „Salvage Pathway“ zurückgeführt werden. Eine Abklärung der beteiligten Enzyme wäre daher sinnvoll. Die höhere aSMase Aktivität nach Inkubation mit PGPC korreliert nicht mit den Ergebnissen der Sphingolipidanalyse, wonach ein erhöhter Ceramid-Gehalt zu erwarten gewesen wäre. Dies könnte aufgrund der unterschiedlichen Inkubationszeiten zu Stande gekommen sein.

Um die Relevanz dieser Ergebnisse zu analysieren wurde im weiteren Versuchsverlauf ein Screening von anderen weißen Hautkrebszelllinien durchgeführt. Außerdem wurden die Zielproteine von BY-POVPE in SCC13 Zellen analysiert. In Zukunft könnte über die funktionelle Analyse möglicher Ziele in Form von Knock-down Experimenten, der biochemische Mechanismus hinter der Aktivierung von Apoptose durch die oxidierten Phospholipide geklärt werden. Beispielsweise könnte die Inhibierung von sMase mit NB6 zeigen, ob die *de novo* Synthese von Ceramid an der apoptotischen Signaltransduktion beteiligt ist. Ebenfalls häufig mit der apoptotischen Signalkaskade in Verbindung gebracht, stellt die Familie der Caspasen sowie die der „Death Rezeptoren“ ein mögliches Ziel zukünftiger Forschungen dar. Im Rahmen dieses Projekts wurde daher bereits die Beteiligung von Caspasen als Executorenzyme am apoptotischen Signalweg analysiert.

Die Resultate dieser Arbeit stehen damit am Beginn einer vielversprechenden Versuchsreihe, die neue Aspekte dieser sonst so negativ behafteten Moleküle darlegen könnte.

## 6. Literaturverzeichnis

Altmeyer P, Reich S: *Hautkrebs- Ein oft unterschätztes Risiko. Risikofaktoren, Diagnostik, Therapie und Prognose*. W. Kohlhammer Druckerei GmbH Co., Stuttgart. 1. Auflage, 2006. ISBN 978-3-17-018620-0

Batzri S, Korn E: *Single bilayer liposomes prepared without sonication*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1973; 298(4): 1015-1019.

Berdel WE, Okamoto S: *Ether Lipids in Cancer Chemotherapy*. *Keio J Med*. 1990; 39 (2): 75-78.

Berliner JA., Leitinger N, Tsimikas S: *The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis*. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: 207–212.

Berridge MV, Tan AS, McCoy K, Wang R: *The biochemical and cellular basis of Cell Proliferation Assays that use Tetrazolium salts*. *Biochimica*. 1996; 4: 14-19.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D *et al.*: *Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Ceratinocyte Cell Line*. *Journal of Cell Biology*. 1988; 106: 761-771.

Boullier A, Bird DA, Chang MK *et al.*: *Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis*. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 947: 214-222.

Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA *et al.*: *A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88 (22): 10124-10128.

Chen R, Brady E, McIntyre TM: *Human TMEM30a Promotes Uptake of Antitumor and Bioactive Choline Phospholipids into Mammalian Cells*. *Journal of Immunology*. 2011; 186: 3215-3225.

Cherepanova OA, Pidkovka NA, Sarmiento OF: *Oxidized Phospholipids Induce Type VIII Collagen Expression and Vascular Smooth Muscle Cell Migration*. *Circulation Research*. 2009; 104: 609-618.

Daleke D: *Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry*. *Journal of Lipid Research*. 2003; 44: 233-242.

Deigner HP, Hermetter A: *Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology*. *Current Opinion in Lipidology*. 2008; 19: 289-294.

*FACSCalibur Produktbroschüre*. BD Biosciences, Stand: 16.07.2012.

Fadeel B, Xue D: *The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2009; 44(5): 264-277.

Feingold KR: *The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis*. *Journal of Lipid Research*. 2007; 48: 2531–2546.

Fruhirth GO, Loidl A, Hermetter A: *Oxidized Phospholipids: From molecular properties to disease*. *Biochimica et Biophysica acta*. 2007; 1772: 718-736.

Fruhirth GO, Moutzi A, Loidl A *et al.*: *The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells*. *Biochimica et Biophysica acta*. 2006; 1761 (9):1060-1069.

Ganten D (Hrsg.), Ruckpaul K (Hrsg.), Ruiz-Torres A: *Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen*. Springer Verlag, Berlin. 1.Auflage, 2004. ISBN 3-540-00858-6

Gault CR, Gault CR, Obeid LM, Hannun YA: *An overview of Sphingolipid Metabolism: from synthesis to breakdown*. Adv. Exp. Med. Biol. 2010; 688: 1-23.

Goni FM, Alonso A: *Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity*. FEBS Letters. 2002; 531 (1): 38-46.

Gordesky S, Marinetti GV: *The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane*. Biochemical and Biophysical Communications. 1973; 50 (4): 1027-1031.

Hannun YA, Luberto C: *Ceramide in the eukaryotic stress response*. Cell Biology. 2000; 10 (2): 73-80.

Hartler, J. *et al.*: Lipid Data Analyzer: unattended identification and quantitation of lipids in LC-MS data. Bioinformatics (Oxford, England). 2011; 27(4): 572–577.

Hermetter A, Stütz H, Franzmair R *et al.*: *1-O-Trityl-sn-glycero-3-phosphocholine: a new intermediate for the facile preparation of mixed acid 1,2-diacyl glycerophosphocholines*. Chem. Phys. Lipids. 1989; 50: 57-62.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR *et al.* *Caspase-3 Is Required for DNA Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis*. Journal of Biological Chemistry. 1998; 273 (16): 9357-9360.

Kågedal K, Johansson U, Öllinger K: *The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress*. FASEB Journal. 2001; 15: 1592-1594.

Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA: *The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling*. Cell Signal. 2008; 20(6): 1010–1018.

Kolesnick R: *The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway*. Journal of Clinical Investigation. 2002; 110 (1): 3-8.

Lang PA, Kempe AD, Tanneur V *et al.*: *Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet- activating factor.* Journal of Cell Science. 2005; 118: 1233-1243.

Levade T, Jaffrezou JP: *Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?* Biochimica et Biophysica Acta. 1999, 1438: 1-17.

Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV: *Oxidized LDL: Diversity, Patterns of recognition, and Pathophysiology.* Antioxidants & Redox Signalling. 2010; 13 (1): 39-75.

Levy M, Futerman AH: *Mammalian ceramide Synthases.* IUBMB Life. 2010; 62 (5): 347-356.

Liang CC, Park AY, Guan JL: *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.* Nature Protocols. 2007; 2: 329-333.

Löffler G: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Springer Verlag, Wien. 6. Auflage, 2004. ISBN 3-540-23885-9.

Loidl A, Claus R, Deigner HP, Hermetter A: *High-precision fluorescence assay for sphingomyelinase activity of isolated enzymes and cell lysates.* Journal of Lipid Research. 2002; 43: 815-823.

Loidl A, Sevcsik E, Riesenhuber G *et al.*: *Oxidized Phospholipids in Minimally Modified Low Density Lipoprotein Induce Apoptotic Signaling via Activation of Acid Sphingomyelinase in Arterial Smooth Muscle cells.* Journal of Biological Chemistry. 2003; 278 (35): 32921-32928.

Majno G, Joris I: *Apoptosis, Oncosis and Necrosis- An Overview of Cell Death.* American Journal of Pathology. 1995; 146 (1): 3-15.

Makpol S, Abdul RN, Kien HC *et al.*: *Inhibition of Mitochondrial Cytochrome c Release and Suppression of Caspases by Gamma-Tocotrienol Prevent Apoptosis and Delay Aging in Stress-Induced Premature Senescence of Skin Fibroblasts*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2012; 2012: 785743.

Masters JRW (Hrsg.), Palsson B (Hrsg.): *Human Cell Culture Vol.1- Cancer Cell Lines Part 1*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1.Auflage, 1999.  
ISBN 0-7923-5143-6

Mathias S, Peña LA, Kolesnick R: *Signal transduction of stress via ceramid*. *Biochem. Journal*. 1998; 335 (3): 465-480.

McIntyre TM: *Bioactive oxidatively truncated phospholipids in inflammation and apoptosis: Formation, targets and inactivation*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1818 (10): 2456-2464.

Mirnikjoo B, Balasubramanian K, Schroit AJ: *Suicidal Membrane Repair Regulates Phosphatidylserine Externalization during Apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284 (34): 22512-22516.

Moumtzi A, Trenker M, Flicker KH: *Import and fate of fluorescent analogs of oxidized phospholipids in vascular smooth muscle cells*. *Journal of Lipid research*. 2007; 28: 565-581.

Nieto-Miguel T, Fonteriz RI, Vay L *et al.*: *Endoplasmatic Reticulum Stress in the Proapoptotic Action of Edelfosine in Solid Tumor Cells*. *Cancer Research*. 2007. 67 (21): 10368-10378.

Orfanos CE, Garbe C: *Therapie der Hautkrankheiten*. Springer Verlag, Berlin. 2. Auflage, 2002. ISBN 3-540-41366-9

Pegorier S, Stengel D, Durand H *et al.*: *Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications for atherosclerosis*. *Atherosclerosis*. 2006; 188 (2): 433-443.

Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Tuterman AH: *When Do Lasses (Longevity Assurance genes) Become Cer S (Ceramide Synthases)?* The Journal of Biological Chemistry. 2006; 281: 25001-25005.

Pidkovka NA, Cherepanova OA, Yoshida T: *Oxidized Phospholipids Induce Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells In Vivo and In Vitro.* Circulation Research. 2007, 101: 792-801.

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E *et al.*: *The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmatic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action.* EMBO Journal. 2001; 20 (11): 2690-2701.

*Produkt Information Vybrant<sup>®</sup> MTT Cell Proliferation Assay Kit.* Molecular Probes<sup>®</sup>-Invitrogen<sup>™</sup>(V13154). März 2012.

*Produkt Information Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa<sup>®</sup>.* Molecular Probes<sup>®</sup>-Invitrogen<sup>™</sup> (V13241 and V13245). 1.September 2010.

Ravid T, Tsaba A, Gee P *et al.*: *Ceramide accumulation precedes caspase-3 activation during apoptosis of A549 human lung adenocarcinoma cells.* Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 2003; 284 (6) 1082-1092

Reiss U, Oskouian B, Zhou J *et al.*: *Sphingosine-phosphate Lyase Enhances Stress-Induced Ceramide Generation and Apoptosis.* Journal of Biological Chemistry. 2003, 279 (2): 1281-1290.

Rhode S, Grurl R, Brameshuber M. *et al.*: *Plasma Membrane Fluidity Affects Transient Immobilization of Oxidized Phospholipids in Endocytotic Sites for Subsequent Uptake.* Journal of Biological Chemistry. 2008; 284: 2258-2265.



Riedl S, Rinner B, Asslaber M *et al.*: *In search of a novel target-Phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy.* Biochemica et Biophysica Acta. 2011; 1808: 2638-2645.

Rohen JW, Lütjen-Drecoll E: *Funktionelle Histologie- Kurzgefasstes Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen nach funktionellen Gesichtspunkten.* Schattauer Verlag, Stuttgart. 4. Auflage, 2000. ISBN 3-7945-2044-0

Rohen JW: *Histologische Differenzialdiagnose- Anleitung zur Diagnose histologischer Präparate.* Schattauer Verlag, Stuttgart. 5. Auflage, 1994. ISBN 3-7945-1676-1

Ruiter G, Zerp AF, Bertelink H *et al.*: *Alkyl-Lysophospholipids Activate the SAPK/JNK Pathway and Enhance Radiation-induced Apoptosis.* Cancer Research. 1999; 59: 2457-2463.

Schwandner R, Wiegmann K, Bernardo K *et al.*: *TNF Receptor Death Domain-associated Proteins TRADD and FADD Signal Activation of Acid Sphingomyelinase.* Journal of Biological Chemistry. 1998; 273: 5916-5922.

Seumois G, Fillet M, Gillet L *et al.*: *De Novo C16- and C24-ceramide generation contributes to spontaneous neutrophil apoptosis.* Journal of Leukocyte Biology. 2007; 81: 1477-1486.

Silva LC, Futerman AH, Prieto M: *Lipid Raft Composition Modulates Sphingomyelinase Activity and Ceramide-Induced Membrane Physical Alterations.* Biophysical Journal. 2009; 96: 3210-3222.

Statistik Austria: *Jahrbuch der Gesundheits Statistik 2010.* Verlag Österreich GmbH, Wien. Auflage 2011, ISBN 978-3-902791-12-2

Stemmer U, Dunai ZA, Koller D *et al.*: *Toxicity of oxidized Phospholipids in cultured Macrophages. Lipids in health and disease.* 2012; 11 (110).

Stemmer U, Hermetter A: *Protein modification by aldehydophospholipids and its functional consequences.* *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012; 1818(10): 2436-2445.

Stemmer U, Ramprecht C, Zenzmaier E *et al.*: *Uptake and protein targeting of fluorescent oxidized phospholipids in cultured RAW 264.7 macrophages.* *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012; 1821 (4): 706-718.

Sterry W: *Kurzlehrbuch Dermatologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. 1. Auflage, 2011. ISBN 978-3-13-146271-8

Stiban J, Caputo L, Colombini M: *Ceramide synthesis in the endoplasmatic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins.* *Journal of Lipid Research.* 2008; 49: 625-634.

Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC *et al.*: *Determinants of Oxidized Phospholipids: Specific Oxidized Fatty Acyl Groups at the sn-2 Position.* *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2000; 20 (10): 2248-2254.

Szeimies RM (Hrsg.), Hauschild A (Hrsg.), Garbe C (Hrsg.) *et al.*: *Tumoren der Haut- Grundlagen, Diagnostik und Therapie in der dermatologischen Onkologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. 1. Auflage, 2010. ISBN 978-3-13-142171-5

Tsimikas S, Miller YI: *Oxidative Modification of Lipoproteins: Mechanisms, Role in Inflammation and Potential Clinical Applications in Cardiovascular Disease.* *Current Pharmaceutical Design.* 2011; 17: 27-37.

Ulfig N: *Kurzlehrbuch Histologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. 3. Auflage, 2011. ISBN 978-3-13-135573-7

Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death and Differentiation. 2003; 10: 45-65.

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC: *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. Journal of Clinical Investigation. 2005; 115 (10): 2656-2664.

Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M: *Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes*. Biol. and Pharm. Bulletin. 2006; 8: 1547-1553.

Zamazami N, Susi SA, Marchetti P *et al.*: *Mitochondrial Control of nuclear Apoptosis*. Journal of Experimental Medicine. 1996; 183 (4): 1533-1544

Zeidan Y, Hannun Y: *Activation of Acid Sphingomyelinase by Protein Kinase C  $\delta$  -mediated Phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry. 2007; 282 (15): 11549–11561.

Zeiss CJ: *The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice*. Veterinary Pathology. 2003; 40: 481-495.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: *The machinery of programmed cell death*. Pharmacology and Therapeutics. 2001; 92 (1): 57-70.