

# **Untersuchung von Ceramid- und Adenosinanalogen bei der Apoptose von EL4-Zellen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt dem Fachbereich 1  
(Physik / Elektrotechnik)  
der Universität Bremen

von

**Katja Popp**

April 2000

# Inhaltsverzeichnis

Abstract

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Thematik und Zielsetzung	1
<b>2 Zellen und biologische Membranen</b>	<b>4</b>
2.1 Moleküle der Zellmembran	6
2.1.1 Phospholipide	6
2.1.2 Sphingolipide	7
2.1.3 Fettsäuren	8
2.1.4 Cholesterin	9
2.2 Lipidtransport	10
2.3 Asymmetrie der Zellmembranen	11
2.4 Modellmembranen	12
2.4.1 Mikrosomen	12
2.4.2 Liposomen	12
2.5 Phasenzustände	13
<b>3 Zellzyklus und Zelltod</b>	<b>14</b>
3.1 Nekrose	16
3.2 Apoptose	16
3.2.1 Apoptose im Immunsystem	17
3.2.2 Morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose	18
3.2.3 Plasmamembranveränderungen bei der Apoptose	20
3.2.4 Molekulargenetische Komponenten der Apoptose	20
3.2.5 Mitochondriale Veränderungen bei der Apoptose	21
3.3 Signalübertragungssysteme	22
3.3.1 Tubercidin im Adenosinmetabolismus	25
3.3.2 Spezifität der Ceramide bei der Apoptose	25
<b>4 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1 Zellkultur	27

4.2 Stammlösungen der Apoptoseinduktoren	27
4.2.1 C <sub>2</sub> -Ceramide	27
4.2.2 Tubercidin	28
4.3 Zellvitalität und Apoptosetests	28
4.3.1 MTT-Test	29
4.3.2 Trypanblau-Ausschlussfärbung	30
4.3.3 Quantifizierung der Apoptose mit Propidiumiodid	31
4.3.4 Quantifizierung der Apoptose mit DAPI	32
4.3.5 Nachweis apoptotischer Zellkernveränderung	34
4.3.6 Nachweis apoptotischer Plasmamembranveränderung	37
4.4 Lipidmetabolismus von C <sub>6</sub> -NBD-Ceramiden	39
4.4.1 Lipidtransport	40
4.4.2 Lipidsynthese	40
4.5 Liposomenpräparation	41
4.6 Charakterisierung der Membranen von EL4-Zellen	42
4.6.1 Membranisolation	42
4.6.2 Bestimmung des Proteingehalts	46
4.6.3 Lipidextraktion	47
4.6.4 Trennung und Isolierung verschiedener Lipidklassen	49
4.6.5 Phosphorbestimmung	50
4.6.6 Cholesterinbestimmung	51
4.6.7 Fettsäurebestimmung	52
4.7 Physikalische Grundlagen und Messmethoden	54
4.7.1 Fluoreszenz	54
4.7.2 Fluoreszenzspektroskopie	57
4.7.3 Generalisierte Polarisierung	57
4.7.4 Laser Scanning Mikroskopie	60
4.7.5 Durchflusszytometrie	62
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>65</b>
5.1 Zellwachstum und Vitalitätsbestimmung	65
5.2 Untersuchung der Apoptoseraten in EL4-Zellen	68
5.2.1 Nachweis von DNA-Fragmenten	68
5.2.2 DNA-Ladder	71

5.2.3 Flowcytometrische Analysen	71
5.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse	73
5.3 Untersuchungen der Membranen von EL4-Zellen	76
5.3.1 Proteingehalt	76
5.3.2 Lipidzusammensetzung	76
5.3.3 Lipidmetabolismus	79
5.3.4 Fettsäuremuster	83
5.3.5 Membranfluidität	86
<b>6 Diskussion</b>	<b>94</b>
6.1 Apoptosewege	94
6.1.1 Sphingomyelinkreislauf	95
6.2 Apoptosestadien	96
6.2.1 Mitochondriale Aktivität	96
6.2.2 Plasmamembranasymmetrie	97
6.2.3 Nukleare Zellkernveränderung	99
6.2.4 Zellzyklusuntersuchungen	100
6.3 Membranveränderungen	101
6.3.1 Lipid- und Fettsäurezusammensetzung	101
6.3.2 Physikalische Membranveränderungen	103
6.4 Ausblick	105
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
Literaturverzeichnis	109
Anhang	115

## Abkürzungen:

<b>AA:</b>	Arachidonsäure
<b>ADC:</b>	Adenylatzyklase
<b>AIF:</b>	Apoptose induzierende Faktoren
<b>AIDS:</b>	acquired immunodeficiency syndrome
<b>ATP:</b>	Adenosin 5-triphosphat
<b>AV:</b>	Annexin V
<b>BSA:</b>	Rinderserumalbumin
<b>C<sub>2</sub>:</b>	D- <i>erythro</i> -C <sub>2</sub> -Ceramid
<b>cAMP:</b>	cyklisches Adenosin 3, 5-monophosphat
<b>CAPK:</b>	Ceramid aktivierende Proteinkinase
<b>CAPP:</b>	Ceramid aktivierende Proteinphosphatase
<b>CDK:</b>	Cyclin abhängige Kinase
<b>Cer:</b>	Ceramide
<b>Chol:</b>	Cholesterin
<b>CrmA:</b>	Cytokin Respons modifier
<b>CTC:</b>	Cupfer-tartrat-carbonat
<b>DAG:</b>	Diacylglycerol
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-phenylindol
<b>DISC:</b>	death initiating signaling complex
<b>DMEM:</b>	Dulbecco's modified Eagle's Medium
<b>DMF:</b>	Dimethylformamid
<b>DMSO:</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA:</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DOC:</b>	Na-Desoxycholat
<b>EDTA:</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF:</b>	epidermal growth factor
<b>ER:</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>FACS:</b>	fast analysing cell sorter
<b>FCM:</b>	Flowcytometry
<b>FCS:</b>	Fötale Kälberserum
<b>FI:</b>	Fluoreszenzintensität
<b>FITC:</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>FS:</b>	Fettsäuren
<b>GC:</b>	Gaschromatograph
<b>GSC:</b>	Gaschromatographie
<b>GSL:</b>	Glycosphingolipid
<b>h:</b>	Stunde
<b>Hepes:</b>	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
<b>HPLC:</b>	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
<b>HWM:</b>	high weight molecular
<b>ICE:</b>	Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme
<b>IL:</b>	Interleukin
<b>IP3:</b>	Inositoltriphosphat
<b>JNK:</b>	c-Jun N-terminale Proteinkinase
<b>LSM:</b>	laser scanning mikroskopie
<b>LUV:</b>	large unilamellar vesicle
<b>LUVET:</b>	large unilamellar vesicle extruder Technik
<b>LWM:</b>	low weight molecular

<b>MAPK:</b>	Mitogen aktivierende Proteinkinase
<b>min:</b>	Minuten
<b>MLV:</b>	multi lamellar vesicle
<b>MTT:</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide
<b>NBD:</b>	Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole
<b>NGF:</b>	nerve growth factor
<b>NL:</b>	neutrale Lipide
<b>NSL:</b>	neutrale Sphingolipide
<b>p53:</b>	Phosphoprotein von 53 kDa
<b>PARP:</b>	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
<b>PBS:</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PC:</b>	Phosphatidylcholin
<b>PCD:</b>	Programmierter Zelltod
<b>PKA:</b>	Proteinkinase A
<b>PKC:</b>	Proteinkinase C
<b>PC:</b>	Phosphatidylcholin
<b>PE:</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>PI:</b>	Phosphatidylinositol
<b>Pi:</b>	Propidiumiodid
<b>PL:</b>	Phospholipide
<b>PLA2:</b>	Phospholipase A2
<b>PLTP:</b>	Phospholipidtransportproteine
<b>PM:</b>	Plasmamembran
<b>PS:</b>	Phosphatidylserin
<b>RNA:</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROS:</b>	reactiv oxygen species
<b>SAPK:</b>	stress-aktivierte Proteinkinase
<b>SDS:</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Ser:</b>	Serin
<b>SL:</b>	Sphingolipide
<b>SM:</b>	Sphingomyelin
<b>SMase:</b>	Sphingomyelinase
<b>Sph:</b>	Sphingosin
<b>SUV:</b>	small unilamellar vesicle
<b>TCA:</b>	Trichloressigsäure
<b>TCR:</b>	T-Zell-Rezeptoren
<b>TLC:</b>	Dünnschichtchromatographie
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TMM:</b>	transmembrales mitochondriales Membranpotential
<b>Tub:</b>	Tubercidin
<b>Tris:</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>Tyr:</b>	Tyrosin
<b>UV:</b>	ultraviolett
<b>VT:</b>	Volumenanteil

## Abstract

Apoptosis is a form of cellular „suicide“ and is activated in response to physiological and pathological stimuli. This fundamental process of cell regulation executes one or more biochemical programs leading to cell death.

The mouse cell line EL4, displaying specific T-cell membrane marker (Thy-1,2 also known as Fas receptor, Apo-1 or CD95), was used to investigate apoptosis characteristics and to test the effect of adenosine and ceramide analogs due to changes in plasma membrane. Adenosine has profound effects on immune competent cells, and it is implicated in the intrathymic apoptotic deletion of T-cells during development. During the last few years it has been shown that the Fas receptor has emerged as a key initiator of apoptosis, in a number of different cell types by the Fas ligand/receptor interaction through stimulation of sphingomyelin hydrolysis. The hydrolysis product ceramide is the intracellular messenger of the sphingomyelin cycle and mediates apoptosis, cell cycle arrest and differentiation.

In the present study after 10 min incubation time with C<sub>6</sub>-NBD-ceramide confocal laser scanning microscopy shows, that the fluorescence was exclusively in the nuclear periphery regions. After 1h of incubation at 37°C metabolised sphingomyelin-NBD and glucosylceramide-NBD were chromatographically identified in EL4 cells. In apoptotic EL4 cells the intracellular increase of C<sub>6</sub>-NBD-ceramide compared to the control cells was documented after 24h preincubation with N-acetyl-N-sphingosine (C<sub>2</sub>-ceramide). These data show that synthetic cell permeable C<sub>2</sub>-ceramide inhibits standard pathways of sphingolipid biosynthesis. Synergistic effects were detected with the adenosine analog 7-Deazaadenosine (tubercidine). Both agents induced concentration and time-dependent morphological and biochemical changes in EL4 cells.

Effects on cell viability were assessed by studying cell membrane integrity with trypan blue. The evaluation of mitochondrial function, using MTT-assay, showed that mitochondrial damage followed the same kinetics as the trypan blue staining of ceramide induced cell death. Hence the early damage of mitochondria with low doses of tubercidine does not lead to necrotic cell death. Morphological changes indicative for apoptosis, such as condensation of chromatin and externalisation of phosphatidylserin (PS), were observed by confocal fluorescence microscopy following nucleic acid staining with propidium iodide and annexin V binding. The amount of apoptotic cells and cell cycle characteristics were quantified by flow cytometry. DNA fragmentation was analysed by fluorescence spectroscopy with diamidinophenylindol (DAPI) binding. As the hallmark of apoptosis DNA fragmentation was detected by agarose gel electrophoresis. Earlier apoptotic effects could be detected with tubercidine induced cells displaying DNA laddering after 24h compared to ceramide induced cells which show a DNA ladder after 48h.

In apoptotic EL4 cells the lipid composition of the plasma membrane was investigated as an early target of ceramide and tubercidine induced apoptosis. Plasma membranes were isolated by differential and density gradient centrifugation. The phospholipids were separated by thin layer chromatography and quantified photospectrometrically. No significant changes of the phospholipid composition could be detected, but a depletion of the phospholipid content and an increase in the cholesterol level leading to an increase in the cholesterol/phospholipid ratio in apoptotic cells. Our data indicate that this plasma membrane alteration represents an early apoptotic event, even if nuclear changes were not well detectable by different apoptosis tests.

A dramatic increase in the plasma membrane fatty acid content of apoptotic cells could be detected, particularly in the ceramide induced cells. Also the unsaturation degree of the fatty acids rises. The resulting lipid and fatty acid changes are supposed to destabilise the plasma membrane and to lead to membrane blebbing and apoptotic body formation.

The lipids and the fatty acid composition are important regulators of cellular function and the membrane fluidity. The fluorescence dye laurdan was chosen to determine membrane fluidity in terms of generalised polarisation (GP) values in isolated membranes and whole cells. At the early apoptotic stages no significant alterations of the GP could be detected indicating a regulation mechanism to maintain membrane integrity.

The investigation of apoptotic EL4 cell lipid compositions, ceramide metabolism, and modulation of the fatty acid spectra indicate that these variations stand for an early apoptotic phase, and that the mode of action of the lipid messenger ceramide is, compared to tubercidine, not a direct effect of the DNA fragmentation in the pathway of programmed cell death.

# 1 Einleitung

## 1.1 Thematik und Zielsetzung

Die drei Prozesse Apoptose, Differenzierung und Proliferation stehen auf molekularer Ebene in einem engen Regulierungsgleichgewicht, was noch immer Gegenstand der heutigen Forschung ist. Die Störung dieser Prozesse ist oft die Ursache von Krankheiten. Die defekte Regulation der Apoptose - der sogenannte programmierte Zelltod (PCD) - spielt bei Krebs, AIDS, Autoimmunerkrankungen und degenerativen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle (Carson et al., 1993). Die zellulären Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, ob die Zelle proliferiert, differenziert oder stirbt, funktionieren dann nicht mehr „richtig“.

Bei der Apoptose kommt es zu einer Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zellen. Im Zellkern kommt es zur Kondensation des Chromatins und zur einer spezifischen Fragmentierung der DNA. Das gesamte Zellvolumen wird reduziert („shrinking“), an der Plasmamembran bilden sich Ausstülpungen („blebbing“), und die Asymmetrie ihrer Lipidverteilung hebt sich auf. Interne und externe Membranen werden aber nicht zerstört, so dass der Zellinhalt eingeschlossen bleibt. Die sterbende Zelle fragmentiert in kleine „apoptotic bodies“, die von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden. Es entsteht dadurch keine Entzündungsreaktion, da toxische Enzyme und Entzündungsmediatoren nicht ausströmen können. Bei der Nekrose, dem passivem Zustand des Zelltods, wird hingegen die Zellmembran lysiert, die DNA unspezifisch gespalten und es kommt zum Ausstrom intrazellulärer Komponenten, was zu Entzündungsreaktionen des Gewebes führen kann.

Apoptotischer Zelltod kann durch verschiedene physikalische und chemische Stimuli ausgelöst werden: Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels, Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, ionisierende Strahlung, Inhibition von DNA-Synthese, oxidativer Stress, Wachstumsfaktorenmangel, Zytokine und Glucocorticoide. An der Entschlüsselung, wie diese Faktoren zu einem Todessignal in der Zelle umgesetzt werden, wird intensiv geforscht. Die Möglichkeit, regulierend in den Apoptosepfad von Zellen eingreifen zu können, liefert die Grundlage für neue vielversprechende Therapiekonzepte.



Eine wichtige Rolle im Apoptosepfad spielen Proteinkinasen, die wiederum ihrerseits durch Phosphorylierung wichtige Signalmoleküle aktivieren. Die Aktivierung der Proteinkinasen kann durch Vermittler, den sogenannten „second messenger“ Molekülen erfolgen.

In Analogie zum gut untersuchten Diacylglycerol-Kreislauf wurde ein Sphingomyelin-Kreislauf postuliert, dessen Produkte für die Regulierung der Proliferation, Differentiation und Apoptose mit verantwortlich gemacht werden (Pushkareva et al., 1995). Ein Produkt der membrangebundenen Sphingomyelinase-Aktivierung, das Ceramid, wird auch als Signal von Plasmamembran-Schäden diskutiert (Jarvis et al., 1994).

An einer Zelllinie (EL4), die von Tumorgewebe aus einem Mäusethymus abstammt, wurde gezeigt, dass Sphingomyelinase (SMase) durch Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aktiviert wurde (Mathias et al., 1993). SMase hydrolysiert Sphingomyelin (SM) zu Ceramid (Cer). Dieser Ceramidanstieg in den Zellen korrelierte mit der Auslösung des programmierten Zelltodes. Auch an anderen Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen einem Ceramidanstieg und der Auslösung von Apoptose aufgedeckt. Über die spezifischen Targetmoleküle der Ceramide, deren Lokalisation und Wirkungsmechanismus im Apoptosepfad ist jedoch noch wenig bekannt.

Ein Adenosinanalogue mit antitumorale und apoptose-induzierende Wirkung ist Tubercidin (7-Deaza-Adenosin). Dieses Molekül kann bei seinem Anabolismus die Reaktionswege von Adenosin nutzen und wird so letztlich in die DNA und RNA eingebaut, was als möglicher Wirkungsmechanismus diskutiert wird.

In dieser Arbeit wurden an EL4-Zellen Untersuchungen mit zwei Induktoren durchgeführt, von denen man annimmt, dass sie auf verschiedenen Signalwegen die Apoptose auslösen können: das zellpermeable Ceramid-Analog *D-erythro*-N-acetyl-sphingosine (*D-erythro*-C<sub>2</sub>-Ceramid) und das Adenosinanalogue Tubercidin.

Das Ziel ist es, physikalische und chemische Veränderungen insbesondere der Plasmamembran (PM) mit apoptotischen Prozessen zu korrelieren. Die Untersuchung der PM ist deshalb von besonderem Interesse, da in ihr eine Vielzahl von Rezeptoren lokalisiert sind, die bei der Signalweiterleitung von großer Bedeutung sind. Aber auch bei der Kommunikation der Zellen untereinander spielt sie eine wichtige Rolle. Da die PM sich ständig durch die Synthese von Lipiden in den intrazellulären Organellen selbst erneuert, ist auch der Lipidtransport für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen entscheidend. Die Lipide sind aber nicht nur Bausteine der PM, sondern besitzen wie z.B. Ceramide auch „second messenger“-Funktionen und sind

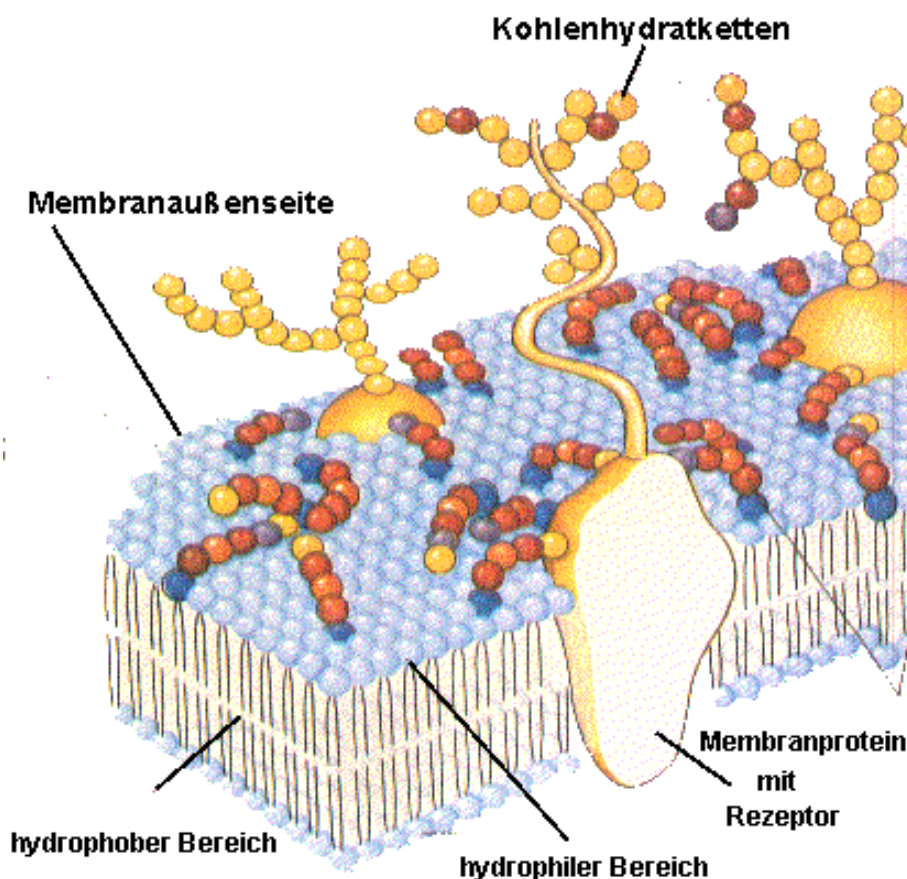
somit direkt an der Signalweiterleitung beteiligt. Mit Hilfe von fluoreszierenden Ceramidanalogen soll die Lokalisation dieses "second messenger"-Systems in den EL4-Zellen aufgeklärt werden.

Die Realisierung dieser Ziele setzte die Bearbeitung folgender Punkte voraus:

- Optimierung von Inkubationszeit und Induktorkonzentration zur Akkumulation apoptotischer Zellpopulationen
- Erarbeitung einer schonenden Methode zur Isolierung von PM aus den EL4-Zellen
- Eindeutige Detektion und Quantifizierung von Apoptose in EL4-Zellen
- Bestimmung physikalischer und chemischer Parameter der Membranisolate mittels Fluoreszenzspektroskopie, Dünnschicht- und Gaschromatographie
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zur Lokalisation des Ceramidmetabolismus.

## 2 Zellen und biologische Membranen

Zellen, die Grundbausteine des Lebens, sind auf unterschiedliche Aufgaben spezialisiert und variieren stark in ihren Morphologien. Neben ihren unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen haben sie auch Gemeinsamkeiten. Als Grenzschicht zwischen Innenraum und Umgebungsmilieu dient ihnen die sogenannte Plasmamembran (PM). Neben ihrer Aufgabe als Strukturelement wirkt sie wie ein Filter, das äußerst selektiv den Eintritt von Nährstoffen steuert und für den Austritt von Abfallprodukten verantwortlich ist. Darüber hinaus dient die PM auch als Empfänger für äußere Signale, die biochemisch transformiert werden und so bestimmte Folgereaktionen der Zelle auslösen.

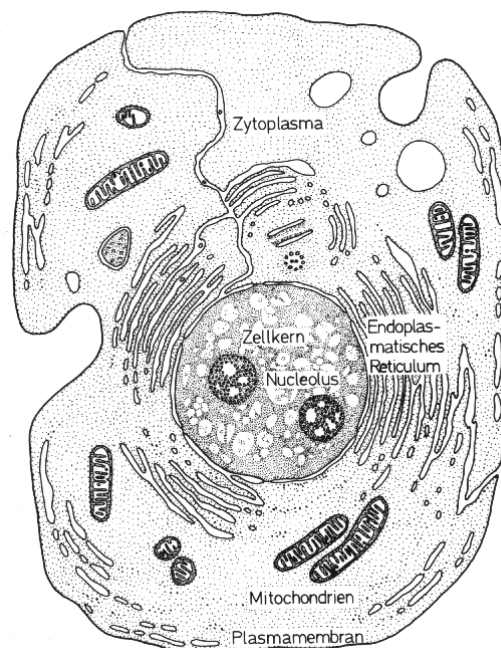


**Abb. 2.1** Aufbau einer Zellmembran nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972), bestehend aus Lipiden mit hydrophoben und hydrophilen Anteilen und integralen Membranproteinen, die als Rezeptoren dienen können und ihren Kohlenhydratanteilen, die in den extrazellulären Raum hineinreichen

Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972) bildet eine Lipid-doppelschicht das Grundgerüst von biologischen Membranen (Abb. 2.1). In ihr eingebettet sind die integralen Membranproteine, die die Lipidschicht ganz oder teilweise durchdringen, während die peripheren Membranproteine an der Oberfläche adsorbiert sind. Die Lipide und Proteine sind innerhalb der Membranen relativ frei beweglich. Die Platzwechselrate benachbarter Lipide beträgt  $10^6$ - $10^8$  s<sup>-1</sup>, während der Platzwechsel der Lipide von einer Seite der Doppelschicht zur anderen (Flip-Flop-Rate) mit  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  s<sup>-1</sup> vernachlässigbar klein ist (Harrison und Lunt, 1977).

Integrale Membranproteine besitzen eine hydrophobe mittlere Region, die im Kohlenwasserstoffkern der Membran lokalisiert ist. An diesen Transmembranabschnitt schließt sich auf der extrazellulären Membranseite ein kohlenhydratreicher Anteil an, während ins Zytoplasma ein mit polaren und ionisierten Seitenketten reicher Anteil hinein reicht. Entsprechend der Membranfunktion und der Richtungsspezifität der Transportsysteme ist auch die Verteilung der Membranlipide asymmetrisch.

Bei Eukaryonten befinden sich im zytoplasmatischen Raum viele subzelluläre Organellen wie Zellkern (Nukleus), Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum (ER) und der Golgi-Apparat (Abb.2.2).



**Abb. 2.2** Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle mit ihren Organellen: Zellkern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Reticulum, Plasmamembran (Knippers, 1985)

Diese Zellorganellen werden ebenfalls von Membranen begrenzt, die sich aber in ihrer Lipidzusammensetzung und ihrem Proteingehalt unterscheiden. Im Zellkern befindet sich die genetische Information, die durch die Sequenz der Nukleotide in der DNA kodiert ist. Die DNA ist um Histone aufgewickelt mit dazwischen liegenden Linkerregionen. Ein Histonabschnitt mit Linkerregion wird als Nukleosomeneinheit bezeichnet.

Am ER befinden sich an der dem Zytoplasma zugewandten Membranseite die Ribosomen, an denen die Proteinsynthese stattfindet. Außerdem werden im ER die Lipide synthetisiert, die in den Golgi-Apparat weitergeleitet werden, um dort modifiziert zu werden. Von dort gelangen sie an ihren Bestimmungsort. Auf den Lipidtransport wird noch genauer im Abschnitt 2.2 eingegangen.

In den Mitochondrien wird die Energie für die Zellen bereitgestellt. Dafür wird chemische Energie aus Fetten und Kohlenhydraten in ATP umgewandelt.

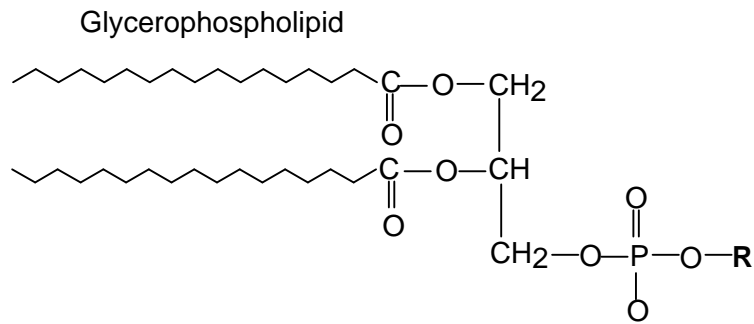
## **2.1 Moleküle der Zellmembran**

Lipide sind wasserunlösliche Biomoleküle und können mit Hilfe nicht-polarer Lösungsmittel, wie z.B. Chloroform aus organischem Material extrahiert werden. Membranlipide bestehen aus einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Bereich. Auf Grund dieses amphiphilen Charakters sind Lipide in der Lage, in wässriger Umgebung spontan Doppelschichten auszubilden.

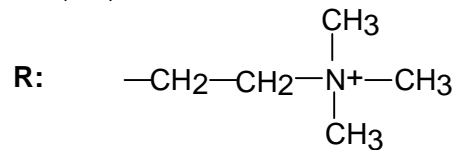
Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) kann die Trennung und Analyse einzelner Lipide durchgeführt werden. Innerhalb der Lipidfraktion natürlicher Membranen findet man Glycerophospholipide, auch Phospholipide (PL) genannt, als Hauptbestandteil.

### **2.1.1 Phospholipide**

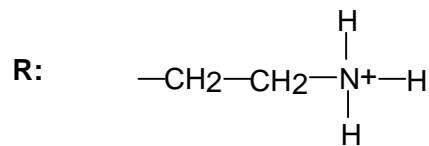
Die Glycerophospholipide sind Glycerinester von Fettsäuren, zwei Hydroxyl-Gruppen des Glycerins (*sn*-1- und *sn*-2-Position) sind mit Fettsäuren und die dritte mit Phosphorsäure verestert. Von diesem Grundgerüst ausgehend erhält man durch Veresterung der Phosphorsäuregruppe weitere Phospholipide (Abb. 2.3) wie z.B. Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylcholine (PC) und Phosphatidylethanolamine (PE).



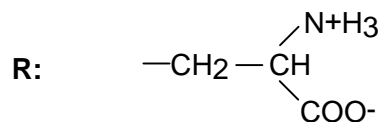
Phosphatidylcholine (PC)



Phosphatidylethanolamine (PE)



Phosphatidylserine (PS)



**Abb. 2.3** Aufbau und Strukturformel der Glycerophospholipide PC, PE und PS

### 2.1.2 Sphingolipide

Neben den PL sind die Sphingolipide als wichtige Membranbestandteile zu nennen. Sphingolipide sind durch das Auftreten von Sphingosin, einem langkettigen Aminoalkohol, charakterisiert (Abb. 2.4). Die N-acylierten Derivate, die Ceramide, treten in der Natur in freier Form nur in geringen Mengen auf, bilden aber die Ausgangssubstanz für häufiger vorkommende Sphingolipide wie Sphingomyelin (SM). SM sind Ceramide mit einer Phosphocholin-Gruppe. Es ist vor allem in der Myelinscheide enthalten und mit 4-10% in anderen Geweben am Gesamt-Phospholipidgehalt



SYMBOL	Trivialname	Systematischer Name
Gesättigte Fettsäuren		
14:0	Myristinsäure	Tetradecansäure
16:0	Palmitinsäure	Hexadecansäure
18:0	Stearinsäure	Octadecansäure
20:0	Arachinsäure	Eicosansäure
Ungesättigte Fettsäuren		
18:1	Ölsäure	9-Octadecensäure
18:2	Linolsäure	9, 12-Octadecadiensäure
18:3	$\alpha$ -Linolensäure	9, 12, 15-Octadecatriensäure
20:4	Arachidonsäure	5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure

**Tabelle. 2.1** Häufig vorkommende Fettsäuren in Zellmembranen

Die Doppelbindungen der Fettsäuren haben fast immer cis-Konfiguration. Dies führt zu einer starren 30°-Krümmung der Kohlenwasserstoffketten, wodurch sich das spezifische Volumen der Moleküle vergrößert. Dadurch vergrößert sich der mittlere Abstand der Lipidmoleküle in der Membran, die Van-der-Waals-Kräfte werden verringert und es kommt zu einer Zunahme der Fluidität. Die Fluidität der Membran wird neben dem Bindungscharakter auch über die Kohlenwasserstoffkettenlänge reguliert. Ungesättigte, kurzkettige Fettsäuren haben einen niedrigeren Schmelzpunkt als gesättigte, länger-kettige Fettsäuren. Zellen können durch die Fettsäurezusammensetzung ihre Membraneigenschaften den Milieubedingungen anpassen. Die Bestimmung der Fettsäuremuster hat sich als Methode etabliert, um sich ändernde Milieufaktoren zu erfassen.

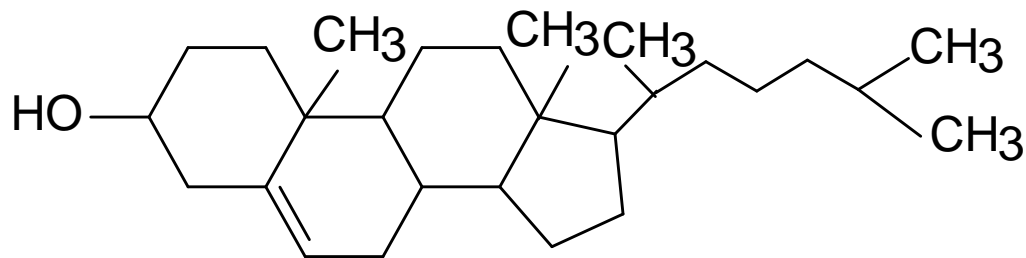
#### 2.1.4 Cholesterin

Insbesondere in eukaryotischen Plasmamembranen findet man einen hohen Anteil an Cholesterin (Abb. 2.5) oder verwandten Steroiden. In den Lipoproteinen des Blutplasmas ist es zu 70% mit langkettigen Fettsäuren zu Cholesterylester verestert. Das Cholesterinmolekül besteht aus einer Hydroxyl-Gruppe, die in der Lipidmembran in der Nachbarschaft zu den polaren Kopfgruppen der PL angeordnet ist, während das



starre und planare Ringsystem mit den Kohlenwasserstoffketten in Van-der-Waals-Wechselwirkung tritt. Durch diese Wechselwirkung werden die Lipidketten geordnet, einander angenähert und wesentlich unbeweglicher gemacht, was die Fluidität erniedrigt und mechanische Festigkeit der Membran verstärkt (Demel et al., 1976). Außerdem wird durch die vom Cholesterin bewirkte dichtere Anordnung der Lipidmoleküle die Permeabilität für kleine hydrophile Moleküle und Ionen durch die Membran vermindert.

## Cholesterin



**Abb. 2.5** Strukturformel von Cholesterin

## 2.2 Lipidtransport

Die meisten Organellenmembranen besitzen eine zu geringe enzymatische Kapazität, um alle ihre Membranlipide selbst zu synthetisieren. Das Endoplasmatische Retikulum (ER) spielt bei den Biosyntheseprozessen der Zelle eine zentrale Rolle. Die Synthese der Transmembranproteine und Lipide ist hauptsächlich in diesem Kompartiment lokalisiert. Alle wichtigen Phospholipide wie PC, PE, PI und PS werden von Enzymen in der ER-Membran katalysiert. Aber auch die Synthese von Cholesterin und Ceramiden findet dort statt. In typischen Zellkulturen macht es näherungsweise die Hälfte der gesamten Membranmenge aus. Es besteht aus einer stark gefalteten, zusammenhängenden Membran und verzweigt sich in das Zytoplasma hinein. Der von der Membran umschlossene Innenraum wird als ER-Lumen bezeichnet. An das ER schließt sich der Golgi-Apparat an, in den die Ceramide transportiert werden, um dort als Vorstufe für die Synthese von Glycosphingolipiden und Sphingomyelin zu dienen. Vom ER und vom Golgi-Apparat werden die neu synthetisierten Lipide durch

verschiedene Transportprozesse auf die anderen Organellenmembranen verteilt, die in ihrer Lipidzusammensetzung sehr unterschiedlich sind. Während im ER kaum SM, PS und Cholesterin enthalten sind, ist die PM mit diesen Lipiden angereichert. Die unterschiedlichen Lipidkompositionen in den Organellenmembranen können nur durch aktive Transportprozesse aufrechterhalten werden.

Beim Lipidtransport unterscheidet man zwischen einem vesikulären Transport und einem nicht-vesikulären Transport. Der vesikuläre Transport ist in den Zellen der Haupttransportweg für die Lipide und ist mit dem sekretorischen Transportvesikelweg vergleichbar, wie er auch von Proteinen benutzt wird. Es schnüren sich vom ER Vesikel ab, die über den Golgi-Apparat zur Targetmembran gelangen, wo sie mit ihr fusionieren. Der Membranverlust, der durch das Abschnüren der Vesikel vom ER verursacht wird, wird durch die Neusynthese kompensiert.

Zur Kategorie der nicht vesikulären Transportprozesse gehören die PL-Transportproteine (PLTP). Bei diesem Transportmechanismus heften sich die Lipide an spezielle Proteine, die als Transportvehikel dienen und die Lipide zur Targetmembran befördern. Dieser Transportprozess ist schneller als der vesikuläre Transport und von niedrigen Temperaturen und von pharmakologischen Substanzen (z.B. Brefeldin A, Monensin) unabhängig, die den vesikulären Transport blockieren können. Neben unspezifischen PLTP gibt es auch spezielle monospezifische PLTP, die für Änderungen in der zellulären Lipidkomposition verantwortlich gemacht werden.

## **2.3 Asymmetrie der Zellmembran**

Die Plasmamembran zeichnet sich nicht nur durch das Vorhandensein bestimmter Lipide aus, sondern auch durch deren asymmetrische Verteilung zwischen innerer und äußerer Membranseite. In Erythrocyten sind SM und Glycolipide hauptsächlich im extrazytosolischen (externen, äußeren) Monolayer der Membran lokalisiert.

Im Gegensatz dazu ist PS auf der Innenseite des Bilayers lokalisiert. Der Mechanismus, durch welchen PS sich im inneren Bilayer konzentriert wird immer noch kontrovers diskutiert (Williamson et al., 1994). Ein Modell geht davon aus, dass die Kopfgruppe von PS mit Proteinen im Cytoskelett, speziell Spectrin, wechselwirkt. Andere Modelle (Beverly et al., 1998) gehen davon aus, dass bestimmte Membranpumpen dafür verantwortlich sind, die Asymmetrie der PM aufrechtzuerhalten: (i)

eine ATP abhängige nach innen gerichtete Aminophospholipid-Translokase (Flippase), (ii) eine ATP-abhängige nach außen gerichtete Pumpe (Floppase), (iii) eine ATP-unabhängige beidseitig gerichtete Pumpe (Scramblase).

## **2.4 Modellmembranen**

Die Membranen von Zellen sind hoch komplexe Systeme. Für die Untersuchung von physikalischen Parametern bedient man sich verschiedener Membranmodelle, um möglichst definierte Randbedingungen einstellen zu können. Neben den Lipidmonoschichten auf wässrigen Phasen spielen Bilayersysteme eine wichtige Rolle. Zu den Bilayersystemen zählen Mikrosomen und Liposomen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### **2.4.1 Mikrosomen**

Als Mikrosomen werden allgemein aus Zellen extrahierte Membranbestandteile bezeichnet, die in polarer Umgebung Vesikel bilden. Durch differentielle Ultrazentrifugation können verschiedene Organellmembranpräparationen separiert werden oder ganze Organellen gewonnen werden. Ein- oder angelagerte Enzymsysteme bleiben weitestgehend erhalten, ebenso wie die ursprüngliche Lipidzusammensetzung.

### **2.4.2 Liposomen**

Liposome sind sphärischgeschlossene Lipiddoppelschichten, die analog zur Zellmembran ein wässriges Kompartiment umschließen. Abhängig vom Herstellungsverfahren lassen sich Liposomen nach ihrer Größe und Anzahl ihrer Lamellen in „small unilamellar vesicle“ (SUV <100nm), „large unilamellar vesicle“ (LUV >100nm) und „multi lamellar vesicle“ (MLV) unterteilen.

## 2.5 Phasenzustände

Die Moleküle der biologischen Membranen sind in der Ebene frei beweglich, was mit einem flüssig-kristallinen Zustand ( $L\alpha$ ) vergleichbar ist. Je niedriger der Ordnungsparameter der Moleküle ist, desto fluider ist die Membran. Aus diesem Zustand können die Lipide in den geordneteren Gel-Zustand ( $L\beta$ ) übergehen, z.B. bei Temperaturniedrigung, die Membran ist dann rigider. Zwischen diesen Phasenzuständen wird ein reversibler Phasenübergang 1. Ordnung bei einer lipidspezifischen Übergangstemperatur ( $T_c$ ) beobachtet. Im Gelzustand befinden sich die Kohlenwasserstoffketten in einer gestreckten parallelen Anordnung (*trans*-Konformation). Der flüssig-kristalline Zustand zeichnet sich durch eine erhöhte Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten und durch eine weniger dichte Packung der Lipidmoleküle aus, was auf eine zunehmende Zahl von *gauche*-Konformeren zurückzuführen ist. Aus biologischen Membranen extrahierte Lipide weisen eine heterogene Kohlenwasserstoffketten- und Kopfgruppenverteilung auf und zeichnen sich deshalb nicht durch einen Phasenübergang bei einer spezifischen Temperatur aus. Die Lipid-Matrix von biologischen Membranen muss, um ihre Funktion zu erfüllen, im flüssig-kristallinen Zustand vorliegen. Eine Änderung des Phasenzustandes der Membran hat Störungen biologischer Funktionen zur Folge. Zellen und Organismen verfügen deshalb über Kompensationsmechanismen, mit denen sie eine konstante Membranfluidität aufrechterhalten können.

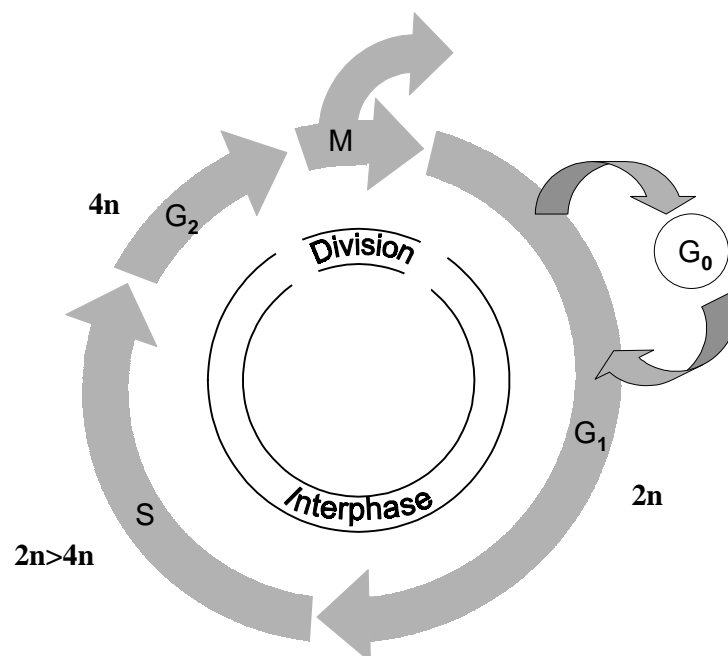
Werden Organismen wie z.B. Bakterien extremen Temperaturschwankungen ausgesetzt, so reagieren diese mit einer veränderten Lipidsynthese. Eine Temperaturniedrigung führt zu vermehrtem Einbau von kurzkettigen, verzweigten und/oder ungesättigten Fettsäuren. Eine Temperaturerhöhung hat die Synthese und den Einbau längerer und vollständig gesättigter Fettsäuren zur Folge. Dieses Anpassen der Lipidzusammensetzung an die jeweiligen Temperaturverhältnisse garantiert das Vorliegen der Membran in der flüssig-kristallinen Phase und wird als homoviskose Adaption bezeichnet.

### 3 Zellzyklus und Zelltod

In Organismen ist die Zellteilungsrate ein streng regulierter Prozess, der eng mit Wachstum, Differentiation, und Gewebeerneuerung verwoben ist. Generell teilen sich Zellen nicht, solange sie kein Signal erhalten, das sie in die aktiven Phasen des Zellzyklus eintreten lässt. Diese Signale werden im allgemeinen als Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Mitogene bezeichnet.

Ruhende Zellen befinden sich in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus. Daneben werden noch vier weitere Phasen unterschieden, denen unterschiedlich funktionelle Leistungen zugeordnet werden:

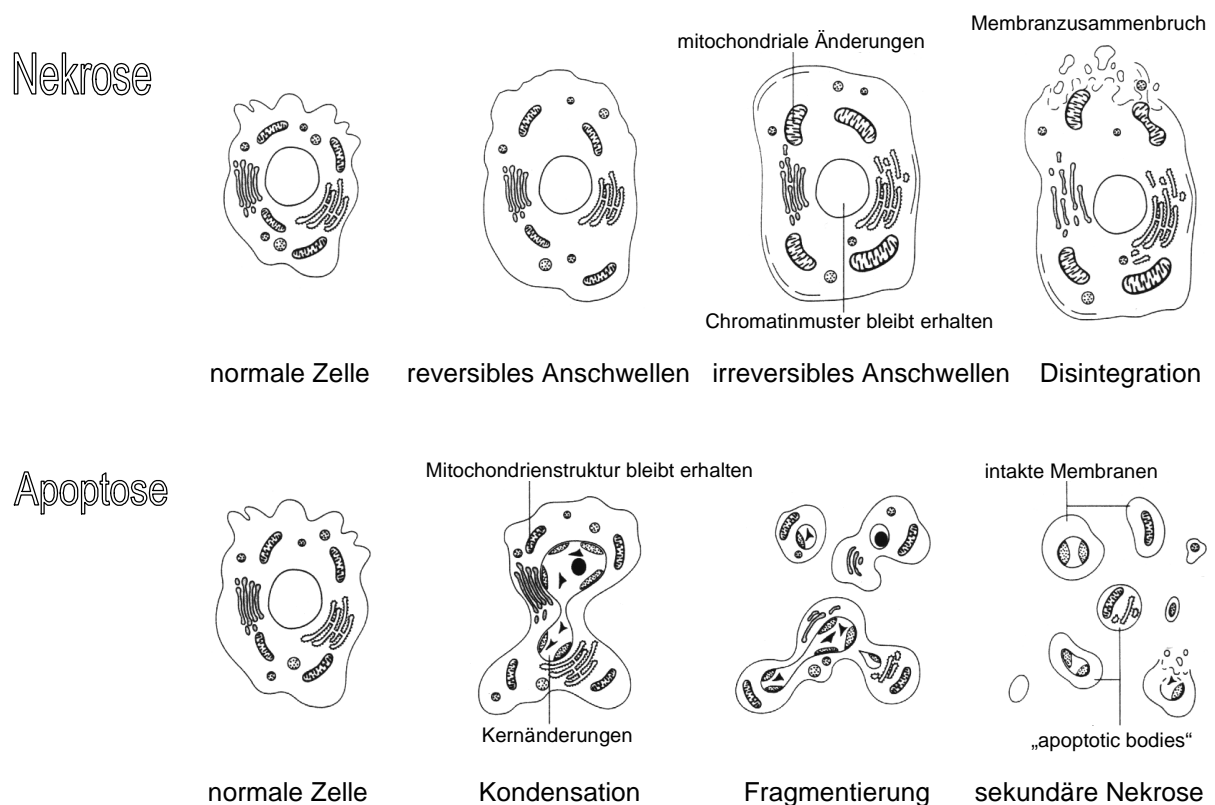
- M-Phase (Mitosephase): Hier erfolgt die eigentliche Zellteilung.
- $G_1$ -Phase: Übergang zwischen der Mitose- und Synthesephase. Hier findet ein großer Teil der Zelleistung statt (Protein-, Fettsynthese).
- S-Phase (Synthesephase): Der DNA-Gehalt der Zellen verdoppelt sich.
- $G_2$ -Phase: Hier bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor.



**Abb. 3.1** Zellzyklusphasen mit jeweiligem DNA-Gehalt pro Zelle:  $2n$  entspricht dem einfachen,  $4n$  dem doppelten DNA-Gehalt

Diese Phasen werden jedoch nur von einem Teil der Zellen, der sog. Wachstumsfraktion, durchlaufen. Ein anderer Teil befindet sich in der Ruhephase und nimmt nicht am Teilungsprozess teil. Diese Zellen haben jedoch die Möglichkeit, bei Bedarf im Zellzyklus in die S-Phase einzutreten. Die Dauer der S-, G<sub>2</sub>-, und M-Phase ist bei Säugerzellen ziemlich einheitlich. Insgesamt beträgt sie etwa 8 – 20 Stunden. Am längsten ist die S-Phase, am kürzesten die Mitose. Unterschiedliche Zykluszeiten werden durch die G<sub>1</sub>-Phase verursacht, deren Dauer für verschiedene Gewebe beträchtlich variiert. In den einzelnen Phasen können die Zellen ganz unterschiedlich auf verschiedene Reize reagieren. So ist der durch ionisierende Strahlung hervorgerufene biologische Schaden in der M-Phase am größten, während die Zellen in der S-Phase nahezu strahlenresistent sind.

Für die Entstehung und Erhaltung von „Leben“ ist neben Zellteilung und –wachstum der Zelltod genauso von Bedeutung. Es werden zwei Formen des Zelltods unterschieden: Nekrose und Apoptose (Abb 3.2).



**Abb 3.2** Vergleich zwischen nekrotischen und apoptotischen Zelltod anhand von morphologischen Charakteristika

### **3.1 Nekrose**

Die Nekrose ist ein pathologischer Prozess und tritt ein, wenn Zellen von den gewohnten physiologischen Umgebungen abweichenden physikalischen oder chemischen Bedingungen ausgesetzt sind. Als Auslöser für den nekrotischen Zelltod gelten z.B. extreme Temperaturerhöhung, pH-Wert Änderungen, mangelnde Sauerstoffversorgung (Hypoxie), aber auch toxische Substanzen können zur Nekrose führen. Morphologisch weisen nekrotische Zellen eine geschädigte PM auf, was zu einem Einstrom von extrazellulären Ionen und Wasser führt. Die Zellen und deren Organellen schwellen an und die metabolische Aktivität lässt nach. Die Organellen und die Zelle selbst werden lysiert und deren Inhalt freigesetzt, was eine lokale Entzündungsreaktion zur Folge haben kann.

### **3.2 Apoptose**

Apoptose ist ein Zelltod, der unter normalen physiologischen Bedingungen stattfindet. Er wird bei der Zellerneuerung und Gewebehomöostase beobachtet. Die Bedeutung der Apoptose für die embryonale Entwicklung, die Onkogenese, und die Immunantwort wird besonders deutlich, wenn diese Prozesse fehlreguliert sind. So sorgt bei der embryonalen Entwicklung der apoptotische Zelltod dafür, dass Organe und Extremitäten richtig ausgebildet werden.

Bei Tumorzellen hingegen kommt es zu einer verstärkten Zellvermehrung. In vielen Tumoren wird durch einen genetischen Schaden verhindert, dass Apoptose induziert werden kann. Die Zellen haben inaktivierte Gene, die für die Codierung von p53 verantwortlich sind, einem Protein, das für die Aktivierung der Apoptose mitverantwortlich ist. Zellen die kein p53 haben oder in großen Mengen den Apoptosisinhibitor Bcl-2 produzieren, können resistent gegen die gängigen Krebstherapien (Bestrahlung und Chemotherapie) sein.

In einer Vielzahl von menschlichen Krebszellen hat man eine Überexpression von Bcl-2 gefunden. Während die Proteine der Familie Bcl-2 die Apoptose inhibieren, wird sie von den nahen Verwandten Bax und Bad gefördert. Die Apoptoseempfindlichkeit scheint über das Verhältnis dieser Blocker und Promoter genetisch verankert zu sein.

Genau weiß man aber noch nicht, wie diese Moleküle die Regulation der Apoptose beeinflussen. Auf die Schlüsselemente im Apoptoseweg wie Todesrezeptoren, Membranänderungen, Protease-Kaskade, mitochondriale Änderungen und DNA-Fragmentierung wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels noch näher eingegangen.

### **3.2.1 Apoptose im Immunsystem**

Bei der Immunantwort spielen T-Zellen zur Abwehr von Viren und andern Mikroben eine wichtige Rolle. Sie entstehen aus Vorläuferzellen (Lymphozyten), die im Knochenmark gebildet werden. Diese unreifen Zellen wandern in den Thymus, wo sie zu sogenannten Thymozyten heranreifen und mit bestimmten Rezeptoren ausgestattet werden, die es ermöglichen, Infektionen aufzuspüren. Gleichzeitig dürfen sie aber nicht körpereigene Stoffe angreifen, da es sonst zur Zerstörung von gesundem Gewebe kommen kann. So sollten nur solche Thymozyten in den Blutkreislauf gelangen, die die richtigen Rezeptoren gebildet haben. Zellen ohne funktionale oder mit falschen Rezeptoren werden durch Apoptose eliminiert.

T-Zellen werden aktiviert, indem ihre T-Zell-Rezeptoren (TCR) spezifisch an Zellen mit exponierten Antigenen binden. Durch Proliferation entstehen Klone aktivierter T-Zellen. Die Zellen bilden besondere Rezeptoren aus und setzen Lymphokine (Zytokine) frei, über die sie mit anderen Immunzellen (z.B. Makrophagen), aber auch untereinander kommunizieren. Durch Ausbildung und Ausschüttung von Interleukin-2 (IL-2) –Rezeptoren können sich die aktivierten T-Zellen gegenseitig zu Wachstum und Proliferation anregen. Aktivierte T-Zellen, die an eine Zielzelle gebunden sind, führen durch zytotoxische Substanzen den Tod der Zelle herbei (Zytotoxizität der T-Zellen).

Diese Wechselwirkungen verschiedener Zellen im Immunsystem höherer Organismen setzt die wechselseitige Erkennung von Zelloberflächen voraus. Bis jetzt ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit die PM direkt oder indirekt diese Prozesse beeinflussen kann.

Nachdem eine Infektion von den T-Zellen erfolgreich bekämpft wurde, müssen sich die aktivierten T-Zellen ebenfalls selbst aus dem Verkehr ziehen, da es sonst zu chronischen Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen kommen kann. Das kann auf verschiedene Weise erfolgen. Eine Möglichkeit ist die Verarmung an Überle-



benzifaktoren (z.B. IL-2), und ein anderer Mechanismus, der in letzter Zeit an Aufmerksamkeit gewonnen hat, funktioniert über ein Molekül, das FAS (CD95, Apo-1) genannt wird. FAS ist in der Plasmamembran lokalisiert und ragt mit dem einen Ende in den extrazellulären Raum hinein, während das andere Ende im intrazellulären Raum liegt und für die Weiterleitung von Signalen verantwortlich ist. Wenn bei aktivierten T-Zellen der FAS-Ligand an FAS bindet, dann wird Apoptose ausgelöst. Das Vorhandensein von FAS und FAS-Ligand in der Zellmembran ist abhängig vom Zustand der Zelle, und somit auch ihre Fähigkeit apoptotisch zu werden.

Neben dem FAS Liganden können noch andere Signalstoffe wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aber auch Zytostatika, freie Radikale, Wasserstoffperoxid, Hyperthermie, DNA-Schäden sowie Gamma- und UV-Strahlen Apoptose auslösen. Für diese Art des physiologischen Zelltods sind die Zellen des Immunsystems besonders sensitiv.

### **3.2.2 Morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose**

Der Zelltod durch Apoptose ist ein hochgradig asynchroner Prozess. Alle Zellen durchlaufen dabei aber drei charakteristische morphologische Phasen (Abb. 3.2).

Während der ersten Phase (Induktion- oder Initiationsphase) behalten die Zellen noch weitgehend ihre normale Morphologie. Es kommt zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen biochemischen Veränderungen. An der PM wird PS, das normalerweise ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert. In der zweiten Phase (Ausführungs- oder Verarbeitungsphase) stülpt sich die Plasmamembran aus und es bilden sich Bläschen („membrane blebbing“). Das Zellvolumen verringert sich, die Organellen bleiben intakt und auch der Stoffwechsel funktioniert weiter. Im Zellkern werden calcium- und magnesiumabhängige DNAsen aktiviert, welche die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke (180bp) zerschneidet.

Die dritte Phase (Exekutions - oder aktive Phase) der Apoptose ist dadurch charakterisiert, dass sich Bläschen vom Zellkörper abschnüren. Der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich. *In vivo* werden diese sogenannten „apoptotic bodies“ von phagozytierenden Zellen aufgenommen, ohne dass es zu Entzündungsreaktionen kommt. *In vitro* schwellen die „apoptotic bodies“ letztlich und lysieren, man

spricht dann auch von sekundärer Nekrose. Diese Phasen treten selbst bei Zellen, die durch Mitose synchronisiert wurden, nicht zeitgleich auf (Messam et al., 1998). Inwieweit die biochemischen Prozesse mit diesen morphologischen Veränderungen korrelieren, ist noch nicht vollständig geklärt. Ab einem kritischen Punkt während der Apoptose sind die Zellen irreversibel auf dem Weg zu sterben. Von Krippner et al., (1996) wurde für diesen Punkt die Inaktivierung von Cytochrom c im Apoptoseprogramm vorgeschlagen. Durch die Stimulation mit FAS/APO-1 treten irreversible Änderungen kurz nach dem Beginn der Apoptose auf, während bei der Apoptose durch Wachstumsfaktormangel die Zellen viel später den kritischen Punkt der irreversiblen Änderung überschreiten. Zellen, die „blebbing“ zeigen haben den kritischen Punkt schon überschritten. Vor diesem Punkt kann der apoptotische Prozess dadurch gestoppt werden, dass der Stimulus entfernt wird oder der Apoptosepfad blockiert wird, z.B. durch die Modulation des Protoonkogens Bcl-2.

Die Möglichkeit, regulierend in die apoptotischen Prozesse eingreifen zu können, gilt als vielversprechender Therapieansatz für viele Krankheiten und erklärt das große Interesse der Wissenschaft an der Erforschung der Apoptose.

Die Asynchronität als charakteristisches Merkmal der Apoptose wurde schon früh beobachtet, und von wenigen Ausnahmen (FAS/APO-1, Staurosporin) abgesehen sterben die Zellen einer Population über einen ausgedehnten Zeitraum (Stunden bis Tage). Um die Schwierigkeiten, die dieses asynchrone Verhalten bei der Bestimmung von zellulären und biochemischen Veränderungen mit sich bringt, zu minimieren, können verschiedene Strategien verfolgt werden. Durch Dichtegradientenzentrifugation können angereicherte Populationen von Zellen aus verschiedenen Phasen gewonnen werden, oder die Durchführung der Analysen geschieht an individuellen Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Problem der Asynchronität versucht zu minimieren, indem die Kulturbedingungen der Zellen und die Induktorkonzentration so gewählt wurden, dass möglichst viele Zellen mit noch erhaltener Plasmamembranintegrität für die Analysen vorlagen.

### 3.2.3 Plasmamembranveränderungen bei der Apoptose

Apoptotische Zellen werden *in vivo* von Makrophagen oder phagozytierenden Zellen aufgenommen. Der exakte Mechanismus, durch den sie zum Target für die Phagozytose, werden ist noch nicht geklärt. Es wurden aber schon eine Reihe von Änderungen an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen beobachtet, die als Signal für die Phagozytose diskutiert werden:

- Eine Veränderung der terminalen Reste von Seitenketten der Zelloberflächenglycoproteinen, die neue Zuckerreste exponieren (Duvall et al., 1985; Savill et al. 1993).
- Das Auftauchen von Oberflächenglycoproteinen, die als Rezeptoren für von Makrophagen ausgeschüttete adhesive Moleküle wie Thrombospondin dienen (Asch et al., 1987).
- Der Verlust der Asymmetrie der Zellmembranphospholipide, die die Hydrophobizität und Ladung der Membranoberfläche ändern (Fadok et al., 1992).

### 3.2.4 Molekulargenetische Komponenten der Apoptose

CED3 ist der Prototyp einer Familie von Proteasen, die als Caspasen (Cysteinylasspartate-specific proteinases) bezeichnet werden. Sie spalten Proteine und zerschneiden auch Genmaterial. Bis jetzt wurden elf verschiedene Caspasen in tierischen Zellen identifiziert. Sie liegen in den Zellen in inaktiver pro-enzymatischer Form vor. Die Aktivierung der Proteasen ist ein irreversibler Schritt im Apoptoseweg. Neben den Zytoskelettproteinen (Actin, Fodrin) wird als weiteres Substrat dieser Proteasen das Enzym Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) diskutiert. PARP ist ein Protein, das bei der DNA-Reparatur involviert ist. Die Protease mit der größten Aktivität gegen PARP wurde als CPP32 (caspase3/prICE/Yama/apopain) identifiziert (Fernandes-Alnemri et al., 1994; Tewari et al., 1995).

Als eine der am besten charakterisierten Caspasen gilt Caspase 1, auch ICE (Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme) genannt, die auch als mögliches Target von Ceramiden diskutiert wird.

### 3.2.5 Mitochondriale Veränderungen bei der Apoptose

In apoptotischen Zellen ist die mitochondriale Physiologie gestört. Während der Apoptose ändert sich die mitochondriale Permeabilität und apoptose-spezifische Protease-Aktivatoren werden von den Mitochondrien ausgeschüttet. Dies geschieht durch eine Permeabilitätsänderung der äußeren mitochondrialen Membran, was zum Ausstrom von Cytochrom C führt (Kantrow et al., 1997) und die Aktivierung von Caspasen fördert (Kluck et al., 1997). Außerdem gelangen AIF („apoptosis inducing factors“) ins Zytoplasma, die proteolytische Aktivität besitzen und selbst in der Lage sind, Apoptose auszulösen.

Die PS-Exposition während der Apoptose scheint mit dem mitochondrialen Permeabilitätsübergang einherzugehen. Es ist aber nach wie vor unklar, ob diese Phänomene kausal zusammenhängen, oder ob der Schwund an ATP als Konsequenz der mitochondrialen Disfunktion die Ursache für die Inhibierung der Aminophospholipidtranslokase ist und somit verhindert, dass exponiertes PS auf die Innenseite der Plasmamembran zurückgepumpt wird. Aber nicht nur PS, sondern auch PE wird während einer frühen Phase der Apoptose auf dem äußeren Layer der PM exponiert (K. Emoto et al., 1997).

Vor den Kernveränderungen beim PCD wurde bis jetzt in vielen Zellen eine Verringerung des transmembralen mitochondrialen Membranpotentials (TMM) beobachtet. Das TMM ist nötig, um den elektrochemischen Protonengradienten aufrechtzuerhalten, der für die mitochondriale ATP-Synthese nötig ist. Die Reduzierung vom TMM korreliert mit einer Verringerung der mitochondrialen Gentranskription. Außerdem findet man auch eine NADH-Verarmung und damit den Zusammenbruch des Energiemetabolismus in apoptotischen Zellen, was mit der Aufhebung der Plasmamembranasymmetrie in Zusammenhang gebracht wurde.

Die Caspase CED4 stammt aus mitochondrialen Quellen und könnte die Apoptose durch Regulierung des Energiemetabolismus steuern. Damit bestünde eine Verbindung zwischen CED4 und Substanzen wie ROS („reactiv oxygen species“) oder Calcium, die schon seit längerem im Verdacht stehen, durch mitochondriale Schädigungen Apoptose auszulösen.

Aber auch das Protein Bcl-2, dessen Terziärstruktur den bakteriellen kanalbildenden Proteinen gleicht, gelangt in die äußere Membran der Mitochondrien, wo es Hetero-

dimere bilden kann und somit direkt für dem Zusammenbruch des TMM verantwortlich sein könnte.

### 3.3 Signalübertragungssysteme

Die Akzeptanz von Apoptose als Resultat eines gut definierten, aber bis jetzt noch nicht vollständig verstandenen zellulären biochemischen Prozesses wirft die Frage nach den Mechanismen auf, wie bestimmte in die Zelle gelangende extrazelluläre Botenstoffe, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), als Signal zum Zelltod übersetzt werden. Der Rezeptor erhält den Todesstimulus durch die Bindung des Liganden und initiiert eine Reihe von Protein-Protein Wechselwirkungen durch die Bildung eines Komplexes. Dieser Proteinkomplex wird auch als DISC („death initiating signaling complex“) bezeichnet und übermittelt den externen Stimulus an interne sekundäre Botenstoffe („second messenger“).

Man unterscheidet heute fünf Klassen von Rezeptoren oder Signalübertragungssystemen: Ionenkanal-gekoppelte, G-Protein-gekoppelte, Tyrosin-Kinasen-gekoppelte, SMase-gekoppelte und PKC-abhängige. In diesen Signalübertragungssystemen haben die Moleküle  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, freie Fettsäuren, Ceramide und Diacylglycerol (DAG) wichtige „second messenger“ Funktionen.

Es wird im Folgenden aber nur auf die Signalübertragungssysteme näher eingegangen, in denen die „second messenger“ cAMP und Ceramide hauptsächlich beteiligt sind.

Zyklische Nucleotide spielen eine Schlüsselrolle bei der Steuerung von vielen biologischen Prozessen, besonders bei der Regulation des Zellzyklus. In dem Signalpfad über cAMP wird das Erregungssignal über die G-Proteine auf Adenylatzyklasen (ADC) übertragen. Die ADC ist in der PM lokalisiert, und ihre Aktivität ist von der Lipidkomposition abhängig. Dieses Enzym wandelt ATP in cAMP um, während eine Phosphodiesterase cAMP zu 5'AMP abbaut. 5'AMP wird von der 5'-Nucleotidase, einem spezifischen Enzym der PM, weiter zu Adenosin abgebaut.

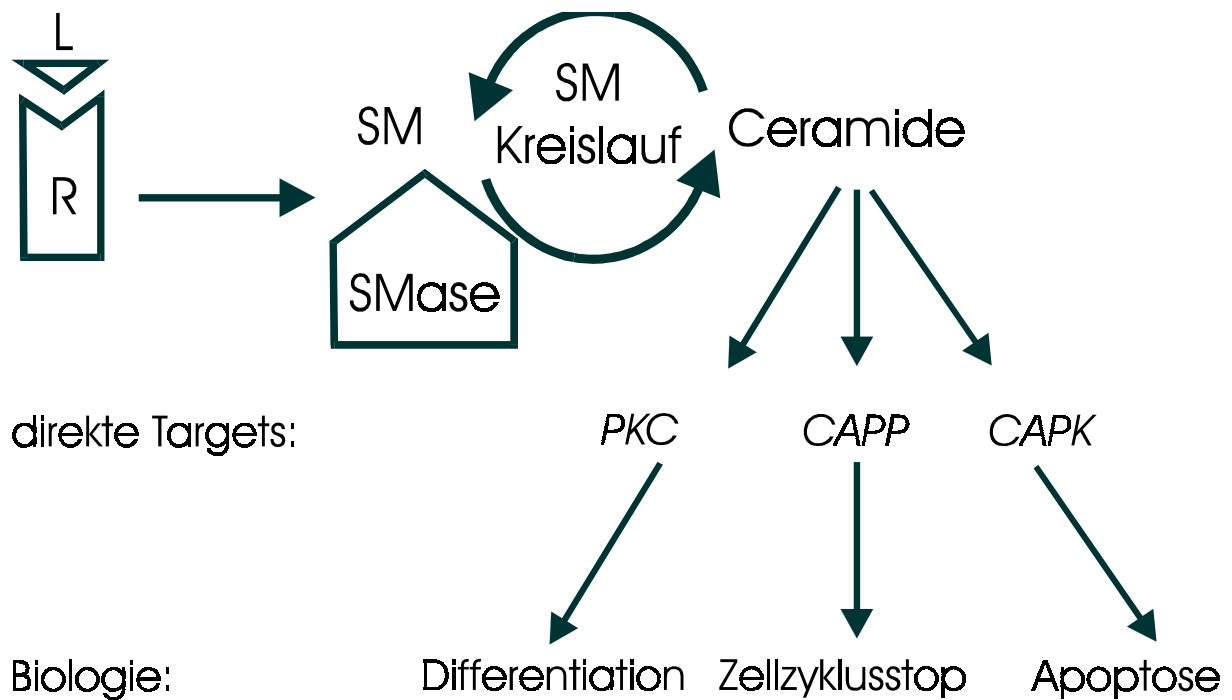
Bei der Untersuchung der Signalwege müssen Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen, sog. „crosstalks“, berücksichtigt werden (Mathias et al., 1993).

Proteinkinasen (PKA, PKC) sind wichtige membrangebundene Enzyme, deren Aktivität ebenfalls über den cAMP-Spiegel gesteuert wird. Sie katalysieren die Übertra-

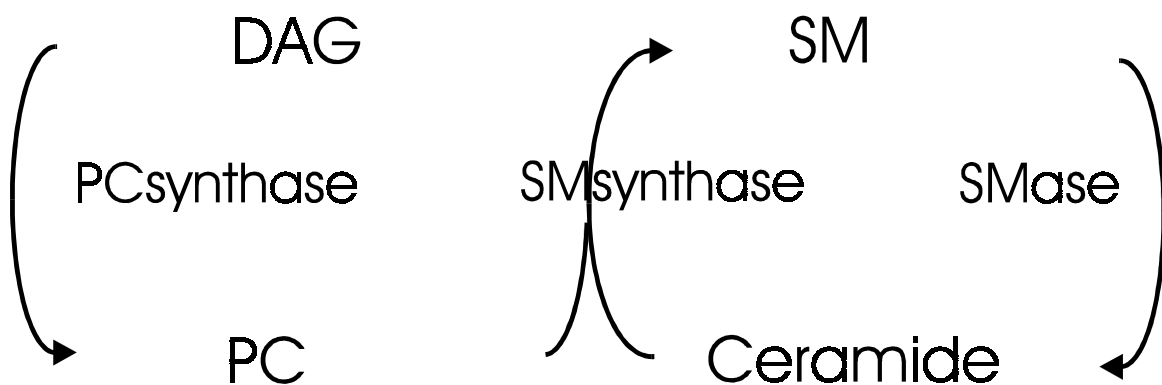
gung von Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Seitenketten in den Proteinen. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins - häufig ein Enzym - was zu einer funktionellen Änderung (Aktivierung oder Deaktivierung) desselben führt. Die Aktivierung der PKC durch Diacylglycerin (DAG) und  $\text{Ca}^{2+}$ , beeinflusst so unterschiedliche zelluläre Prozesse wie Sekretion und DNA-Synthese. Darüber hinaus nimmt man an, dass die PKC in vielen tierischen Zellen die  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Pumpen der PM, die dazu dienen, den intrazellulären pH-Wert zu regulieren, steuert. Als Folge eines intrazellulären pH-Anstieg wird die Zelle zum Zellwachstum angeregt. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der damit verbundene pH-Anstieg führt zur Dekondensation des Chromatins, der erste Schritt für die Zellteilung. Im Zusammenhang mit der Apoptose könnte der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg für die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Endonuklease verantwortlich sein, die die DNA in den „Linker-Regionen“ schneiden, was nach wie vor als Kriterium für Apoptose gilt.

Die Hydrolyse durch die SMase von Sphingomyelin zu Ceramid wird durch eine Reihe extrazellulärer Agentien wie  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\gamma$ -Interferon und Interleukin-1 generiert. Im Fall von  $\text{TNF-}\alpha$  bindet der 55kDa-Rezeptor für  $\text{TNF-}\alpha$  an SMase, was als Mechanismus für die Aktivierung vorgeschlagen wurde (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Außerdem wurde berichtet, dass  $\text{TNF-}\alpha$  stimulierte Aktivierung der SMase über Phospholipase  $\text{A}_2$  (PLA2) und Arachidonsäure (AA) als gekoppelte Zwischenschritte verläuft. Die Mechanismen, durch welche die anderen Agentien die Aktivierung der SMase aktivieren, sind noch nicht eindeutig geklärt worden.

Ceramid ist ein zentrales Molekül in Sphingolipidstruktur und -metabolismus. Alle Sphingolipide enthalten Ceramide als hydrophiles Basiselement, und sie entstehen durch den Biosyntheseweg, der hauptsächlich die 1-hydroxyl-Position des Ceramids modifiziert. Obwohl eine Vielzahl von Informationen über Sphingolipide, deren Struktur, Metabolismus und biologische Aktivität besteht, insbesondere der Glycosphingolipide, wurde ihre Rolle als Transmembransignalübertragungsfaktor erst in den letzten Jahren erkannt (Hannun, 1997) und der Sphingomyelinkreislauf als Signalübertragungsmechanismus etabliert (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3** Sphingomyelinkreislauf als Signalübertragungsmechanismus: Durch eine Ligand (L)–Rezeptor (R)–Wechselwirkung wird der SM-Kreislauf aktiviert und das Signal an direkte Targets (PKC, CAPP, CAPK) weitergeleitet, die unterschiedliche Reaktionen der Zelle auslösen können



**Abb. 3.4** Direkte Kopplung des SM- und DAG-Kreislaufs mit den beteiligten Enzymen (PCsynthase, SMSynthase und SMase)

Neutrale oder saure SMasen hydrolysieren SM zu Ceramid und PC, während eine SMSynthase Ceramid wieder in SM umwandelt. Durch das Enzym SMSynthase besteht eine direkte Kopplung des SM-Kreislaufs mit dem DAG-Kreislauf, da es den Transfer der Choline-Kopfgruppe vom PC auf die Ceramide katalysiert und so SM und DAG entstehen. Es wird daher auch vermutet, dass das Verhältnis von

Ceramiden zu DAG entscheidend für den zellulären Zustand ist (Bettaieb et al., 1999)

Zwischen der Induktion und den biologischen Endpunkten der Apoptose liegen Membranveränderungen, Signaltransduktion, Ionentransport und Interaktion mit den Stoffwechselwegen. Dieses komplizierte Geflecht der Signalübertragungssysteme zu entschlüsseln und zu verstehen, wie die Zelle funktioniert, ist immer noch eine große Herausforderung.

### **3.3.1 Tubercidin im Adenosinmetabolismus**

Beim Adenosinderivat Tubercidin (7-Deaza-Adenosin) ist der Stickstoff an der 7-er Position der Adeninbase durch ein CH substituiert. Durch diese Veränderung wird Tubercidin von den Enzymen, die normalerweise Adenosine spalten, nicht mehr als Substrat erkannt. So kann Tubercidin nicht durch den Purinmetabolismus ausgeschieden werden. Es kann aber die Reaktionswege im Anabolismus des Adenosins im Purinkreislauf nutzen, so dass es letztendlich in die DNA und RNA eingebaut wird. Das führt zu einer Inhibierung der DNA- und RNA-Polymerasen, so dass keine neue DNA mehr aufgebaut wird und die Proteinbiosynthese reduziert wird. Das ist ein möglicher Erklärungsansatz für den Wirkungsmechanismus des Tubercidins.

Neben antibakterieller, antiviraler und antiparasitärer Wirkung hat Tubercidin auch antitumorale Wirkung und wurde auch schon in klinischen Studien getestet. Allerdings nur mit mäßigem Erfolg, da die Nebenwirkungen zu groß waren. Für die Untersuchung des programmierten Zelltods scheint es aber sehr geeignet, da es an leukämischen Rückenmarkszellen (IPC-81) ein hohes Potential für die Induktion von Apoptose zeigte.

### **3.3.2 Spezifität der Ceramide bei der Apoptose**

Die Entwicklung von exogenen zellpermeablen Ceramidanalogen erlaubte die Untersuchung von zellulären Aktivitäten der Ceramide. Es wurde gezeigt, dass das zellpermeable Ceramid-Analog *D-erythro*-N-acetyl-sphingosine (*D-erythro*-C<sub>2</sub>-Ceramid) die durch TNF $\alpha$  induzierten Effekte simulieren kann (Jarvis et al., 1994), was ein



Hinweis darauf ist, dass das Ceramid als „second messenger“ fungiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die metabolischen Vorläufer *D-erythro*-dihydroceramide, die keine 4,5-trans-Doppelbindung am Sphingosinrückgrad aufweisen, nicht aktiv waren, was die Spezifität der *D-erythro*-Ceramidstruktur zeigt (Obeid et al., 1993). Diese struktur- und stereoisomerspezifischen Voraussetzungen für die Generierung biologischer Effekte lassen vermuten, dass Ceramide direkt biochemische Targets aktivieren, die Apoptose auslösen. Als direkte Targets der Ceramide wurden eine Membrankinase (CAPK), eine Phosphatase (CAPP) und eine Proteinkinase C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ) identifiziert. Weitere direkte zelluläre Targets sind die Zellzyklusregulierungsmoleküle Rb und c-myc und stress-aktivierende Proteinkinasen (SAPKs) wie c-Jun N-terminale Proteinkinase (JNK). Diese Aufzählung ist nur beispielhaft und bei weitem nicht vollständig. Für eine ausführlichere Darstellung der Interaktion von Ceramiden mit Caspasen und anderen apoptotischen Signalkaskaden muss auf weiterführende Literatur verwiesen werden (Hannun, 1997 und Kolesnick et al., 1998).

Einige Studien (Sillence et al., 1997) lassen jedoch Zweifel an dem jetzigen Modell aufkommen, nachdem die Aktivierung der SMase ein Schlüsselement des Signaltransduktionsereignisses der rezeptor-vermittelten Apoptose ist. Danach ist die Ceramidproduktion eher eine Konsequenz des PCDs und kein Regulator des apoptotischen Prozesses (Boesen-de Cock et al., 1998 und Gamen et al., 1998).

## 4 Material und Methoden

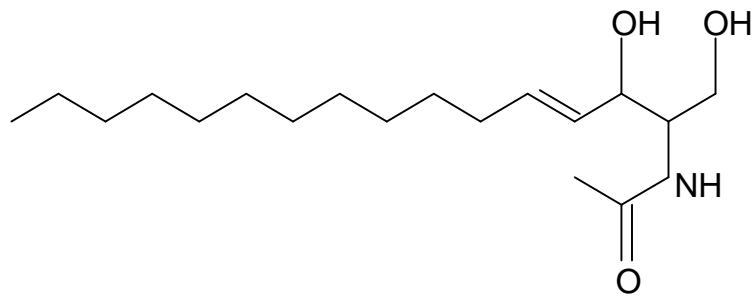
### 4.1 Zellkultur

Die Zelllinie EL4 (European Collection of Cell Cultures - Centre for Applied Microbiology & Research, UK) existiert seit etwa 20 Jahren. Sie wurde abgeleitet von einer Maus mit einem Thymustumor. Sie entspricht einer frühen Entwicklungsstufe von T-Zellen und wird als solche besonders von den Immunologen in verschiedenster Weise verwendet. Sie sind sehr gute IL-1-Responder und werden daher auch viel benutzt. Es gibt eine große Anzahl von Tochterlinien. Nur noch wenige benutzen die „originale“ EL4. Die Zellen wurden in Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Jeden dritten bzw. zweiten Tag wurde das Medium erneuert, die Zellen wurden in einer Dichte von  $1-3 \cdot 10^5 \text{ml}^{-1}$  in Plastikzellkulturflaschen (Nalge Nunc, FRG) ausplattiert und höchstens bis zur 20. Passage verwendet.

### 4.2 Stammlösungen der Apoptoseinduktoren

#### 4.2.1 C<sub>2</sub>-Ceramide

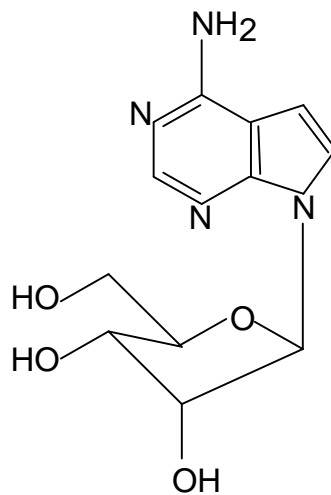
Das zellpermeable Ceramid-Analog *D-erythro*-N-acetyl-sphingosine (*D-erythro*-C<sub>2</sub>-Ceramid) wurde in einer Stammlösung von 40mM in DMSO angesetzt. Die DMSO Konzentration lag in allen Experimenten jeweils unter 1% im Medium. Zellschädigende Lösungsmiteleinflüsse von DMSO an den EL4-Zellen wurden unterhalb dieser Lösungsmittelkonzentration nicht beobachtet. Bei den standardmäßig benutzten Ansätzen, die 10µM C<sub>2</sub>-Ceramid enthielten, lag die DMSO Konzentration im Medium bei 0,25%.



**Abb 4.1** Chemische Strukturformel von C<sub>2</sub>-Ceramid

#### 4.2.2 Tubercidin

Tubercidin (7-Deaza-Adenosin) ist ein Adenosinanalogue, das sich vom Adenosin durch die Substitution des Stickstoffatoms N-7 durch ein Kohlenstoffatom auszeichnet. Für die Ansätze wurde Tubercidin aus einer Stammlösung von 1mM in Phosphatpuffer (PBS) verwendet. Eine Endkonzentration von 1µM Tubercidin im Medium wurde standardmäßig für die Experimente eingesetzt.



**Abb 4.2** Chemische Strukturformel von Tubercidin

#### 4.3 Zellvitalität und Apoptosetests

In vitro-Zellvitalität kann auf verschiedene Weise bestimmt werden (morphologisch, biochemisch). Die einfachste und klassische Technik ist die Trypanblau-Ausschlussfärbung, mit der die Membranpermeabilisierung detektiert wird. Aber auch

colorimetrische Methoden, wie z.B. der MTT-Test, der die Änderungen der mitochondrialen Aktivität misst, sind weit verbreitet. Ihr Vorteil liegt insbesondere darin, dass eine große Anzahl von Zellkulturproben untersucht werden kann. Da sich in frühen Phasen der Apoptose weder die Membranpermeabilität noch die mitochondriale Aktivität ändert, sind spezielle Tests für die Detektion von Apoptose entwickelt worden.

#### **4.3.1 MTT-Test**

Colorimetrische Assays messen die metabolische Aktivität der Mitochondrien in den Zellen. MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-y]-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) ist ein Farbstoff, der nur von lebenden Zellen metabolisiert wird. Durch die quantitative Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität (Mosemann, 1983) kann man auf die biochemische Vitalität schließen. Die Dehydrogenasen sind Enzyme, die zu einem Reduktasesystem in der Atmungskette der Mitochondrien gehören. Das gelbe Substrat Tetrazoliumsalz wird von ihnen in blaues Formazansalz umgesetzt. Dieser Farbumschlag wird photometrisch quantifiziert und zeigt damit die Aktivität der Mitochondrien an, was Rückschlüsse auf den Energiemetabolismus der Zellen zulässt.

##### **Stammlösungen:**

- 5g/l MTT in PBS
- 0,04N HCl in Isopropanol

Die Zellen wurden als Mikrokulturen in den Vertiefungen (Wells) auf einer Mikrotiterplatte mit 8\*12 Vertiefungen angesetzt. Für die Analyse wurden die Zellen 24h lang konzentrationsabhängig mit der Substanz, deren Wirkung getestet werden soll, inkubiert. Danach setzt man dem Zellkulturmedium jeweils 10µl der MTT-Stammlösung zu und inkubiert 2h lang unter den Standardkulturbedingungen. Das Tetrazoliumsalz wird von zellulären Enzymen in wasserunlösliches Formazan umgewandelt. Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto größer ist die Gesamtaktivität der mitochondrialen Dehydrogenase in der Probe und damit der Anteil an gebildetem Formazan. Mit 100µl Isopropanollösung pro Well lassen sich die Formazankristalle lösen und bei

geeigneter Wellenlänge die Absorption mit einem Microtiterplate-Reader (Dynatech MRX) in jedem Well bestimmen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Dehydrogenase-Aktivität und der optischen Dichte. Die relative Absorption des gebildeten Formazans in den Proben wurde bei 550nm zu einer festen Referenzwellenlänge von 620nm quantifiziert. In einem Bereich von 50.000 bis 200 Zellen ist die Absorption direkt proportional zu der Anzahl der Zellen pro Well. Die Zellen selbst stören die Absorptionseigenschaften nicht, selbst bei einer Zelldichte von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml (Mosemann, 1983).

Es ist aber zu beachten, dass die Kulturbedingungen (wie pH-Wert und Glucosekonzentration im Kulturmedium) die MTT-Antwort stark beeinflussen. Der metabolische Zustand der Zellen ist z.B. auch von der Zellkonzentration abhängig. Proliferierende Zellen sind metabolisch stärker aktiv als Zellen, die nicht proliferieren und in der Ruhephase sind, so dass dieser Test nicht nur empfindlich auf Zellvitalität und induzierte Zytotoxizität ist.

#### **4.3.2 Trypanblau-Ausschlussfärbung**

Der Farbstoff Trypanblau kann nur in Zellen eindringen, deren Plasmamembran geschädigt ist. Auf Grund seines anionischen Charakters bindet er unspezifisch an Proteine und akkumuliert sich so in den Zellen. Mit diesem Test lässt sich die Membranintegrität der Zellen beurteilen. Die Zellen, die eine intakte Membran haben, erscheinen im Mikroskop durchsichtig (gesund), während die dunkel eingefärbten Zellen den Farbstoff durch ihre nicht mehr intakte Membran aufgenommen haben. Letztere gelten als tot (nekrotisch). Auch diejenigen Zellen, die nur schwach blau gefärbt sind, werden als tot betrachtet.

20µl Trypanblaulösung (0,4%) wurden mit 20µl Zellsuspension gemischt. Diese Zellen werden unter dem Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung mit Hilfe einer Zählkammer gezählt. Der Prozentsatz der nekrotischen Zellen an der Gesamtzellzahl wird angegeben, nachdem mindestens 100 Zellen und zwei Mikroskopfelder ausgezählt wurden. Bei dieser Methode ist darauf zu achten, dass die Endkonzentration von Trypanblau im Test nicht über 0,2% liegt, da Trypanblau in höheren Konzentrationen selbst zytotoxisch ist. Mit der Auszählung wurde 2min nach der Farb-

stoffzugabe begonnen, da auch die gesunden Zellen den Farbstoff nach längerer Inkubationszeit aufnehmen.

Diese Methode ist gut geeignet, um schnell einen qualitativen Überblick über den Zustand einer Zellpopulation zu bekommen. Der Trypanblau-Test wurde deshalb routinemäßig parallel zu den Experimenten durchgeführt.

### **4.3.3 Quantifizierung der Apoptose mit Propidiumiodid**

Auf dem gleichen Prinzip der Ausschlussfärbung beruht auch die Färbung mit Propidiumiodid (Pi). Dieser Fluoreszenzfarbstoff gelangt ebenfalls erst nach der Schädigung der PM in die Zelle. Dort bindet er spezifisch an Nukleinsäuren, hauptsächlich an die doppelsträngige genome DNA. Diese Methode wurde sowohl für die flowzytometrischen Untersuchungen (FACS) als auch für die Laserscanningmikroskopie (LSM) angewendet.

Beim apoptotischen Zelltod kommt es zu Veränderungen innerhalb des Zellkerns und zu einer spezifischen Degradierung der DNA. Für die Analyse der nuklearen DNA mit dem FACS werden die Zellen mit Ethanol permeabilisiert. Die durch apoptose-spezifischen Abbau der genomischen DNA entstandenen Bruchstücke gelangen nun aus der Zelle. Die verbliebene hochmolekulare DNA im Zellkern wurde anschließend mit Propidiumiodid angefärbt.

Im FACS kann dann die Fluoreszenzintensität und damit die DNA-Menge im Kern der einzelnen Zellen genau quantifiziert werden. Apoptotische Zellen in der untersuchten Population enthalten weniger hochmolekulare genome DNA, und es bildet sich ein sogenannter „sub-G<sub>1</sub>-Peak“. Es wird allerdings nur der Gesamtverlust von DNA-Material der Zellkerne ermittelt, was unter Umständen auch andere, nicht apoptotische Ursachen haben kann.

#### **Material und Geräte**

- Zellen ca.  $1 \cdot 10^6$
- Rnase A III (1000 U/ml) (Sigma, FRG)
- Probenpuffer (Ansatz für 1l: 1g Glucose in 1l PBS gefiltert durch ein 0,2µm Filter, Lagerung bei 4° C)

- Propidiumiodidstammlösung 1mg/ml (Ansatz für 10ml: 10mg Pi in 10ml H<sub>2</sub>O lösen und durch ein 0,2µm Filter filtrieren, lichtgeschützt bei 4° C lagern)
- Reagenz I (2ml frisch ansetzen: 100µl Pi=50µg/ml, 200µl Rnase A III=100U/ml, 1700µl Probenpuffer)
- Isotonische Lösung (ISOTON II AZIDE-FREE BALANCED ELECTROLYTE SOLUTION)
- FACS (Coulter, USA)

Die Zellen wurden 5min bei 200g abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Dann wurde eine Zählprobe abgenommen und der Ansatz auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro ml verdünnt in 70% Ethanol fixiert und über Nacht im Kühlraum bei 4° C gelagert.

Am nächsten Tag wurde aus der vorbereiteten Zellsuspension 250µl bzw. 500µl entnommen, was einer Zellzahl von ca. 250000 (500000) entspricht, und in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Mit einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde bei 4000 U/min 2min lang der Überstand abzentrifugiert und verworfen. Zum Pellet wurden 100µl Reagenz I gegeben, resuspendiert und 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben in Glasröhrchen umgefüllt und mit 700µl-1000µl isotonischer Lösung verdünnt und bis zur Messung auf Eis gestellt.

#### 4.3.4 Quantifizierung der Apoptose mit DAPI

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylinole) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an Adenin/Thymin-Clustern in doppelsträngiger DNA bindet. DAPI wurde zur Quantifizierung des gesamten DNA-Gehalts und zur Analyse der prozentualen DNA-Fragmentierung eingesetzt. Bei der fluoreszenzspektroskopischen Messung wird die Eigenschaft des Fluorophors ausgenutzt, dass er im gebundenen Zustand eine ca. 50 mal höhere Fluoreszenzintensität aufweist als in wässriger Umgebung.

#### Material und Geräte

- $1 \cdot 10^7$  Zellen
- PBS pH 7,4

- Lysierpuffer pH 7,4 (100mM Tris, 3mM EDTA, 0,2% Triton X 100)
- DAPI-Puffer (DAPI von Sigma)
- Zentrifugen (Sorval, Eppendorf, Biofuge)
- Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer, FRG)

Für die Ansätze wurden in 10ml Medium  $5 \cdot 10^6$  EL4-Zellen in Petrischalen angesetzt und  $10 \mu\text{M}$  C<sub>2</sub>-Ceramide bzw.  $1 \mu\text{M}$  Tubercidin zu den Kulturen hinzupipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit einer Pipette aus den Petrischalen in 50ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Die Petrischalen wurden mit ca. 5ml PBS-Puffer ausgespült, um alle Zellen vom Boden abzulösen, was mit dem Mikroskop kontrolliert wurde. Die Zellen wurden 5min bei 200g vom Medium gewaschen. Das Pellet wurde in 1,5ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß umgefüllt. Die Proben wurden erneut 5min lang bei 200g zentrifugiert. Der Überstand und damit DNA, die durch die geschädigte PM von nekrotischen Zellen in den Überstand gelangen konnte, wurde verworfen.

Zum Lysieren wurden die Zellen in 600 $\mu\text{l}$  Lysierpuffer (100mM Tris, 3mM EDTA, 0,2% Triton X 100) resuspendiert und die Proben 15min auf Eis gestellt. Dann wurden sie 15min lang bei 4° C und 13000g zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation müssen der Überstand, der die fragmentierten Anteile der DNA enthält, und das Pellet, in dem die chromosomale DNA enthalten ist, sorgfältig getrennt werden. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgehoben und in ein Eppendorfgefäß gefüllt.

Zum Pellet wurde 600 $\mu\text{l}$  Lysierpuffer hinzugefügt, mit Hilfe einer Pasteurpipette gut resuspendiert und in ein Glasgefäß (ca. 4ml) umgefüllt. Zur Homogenisierung wurden die Proben auf Eis gestellt und 1,5min lang mit Ultraschall behandelt. Die Proben wurden bei -20° C gelagert. Die fluoreszenzspektroskopische Quantifizierung des DNA-Gehalts vom Überstand des Zelllysates und der Zellkerne erfolgte durch die DAPI-Bindung innerhalb der nächsten 24h.

Die Anregungswellenlänge wurde am Fluoreszenzspektrometer auf 362nm eingestellt und die Emission bei 455nm detektiert, was dem Absorptions- und Emissionsmaximum von DNA-gebundenem DAPI entspricht.

Die Messküvetten wurden mit 3ml DAPI-Puffer gefüllt und der Leerwert ermittelt. Danach wurden fünfmal nacheinander 10 $\mu\text{l}$  vom Überstand des Zelllysates in die



Küvetten pipettiert und jeweils die Fluoreszenzintensitäten (FI) bei den o.a. Wellenlängen bestimmt. Danach wird genau so mit dem Homogenat der Zellkerne verfahren. Die Messungen erfolgten immer 2min nach der Probenmengezugabe, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Inkubationszeiten zu vermeiden. Für die Auswertung wurden die FI-Differenzen ermittelt, die durch die Zugabe der Proben verursacht wurden. Die FI-Differenzen vom Überstand des Zelllysates wurde mit denen des Homogenats der Zellkerne ins Verhältnis gesetzt. Die FI von DAPI aus dem Überstand des Zelllysates stammt von niedermolekularen DNA-Fragmenten (LWM-DNA), die aus dem Kern gelangen konnten, während die DAPI-FI vom Homogenat der Zellkerne die hochmolekulare (HWM-DNA) und damit unfragmentierte DNA im den Zellkernen repräsentiert. Dieses Verhältnis kann als Apoptoserate interpretiert werden.

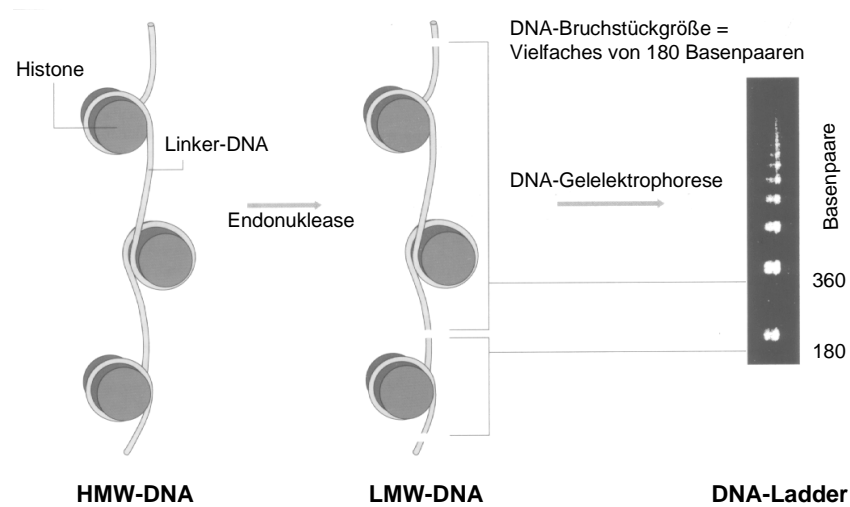
#### **4.3.5 Nachweis apoptotischer Zellkernveränderung**

Die durch Endonukleasen katalysierte internukleosomale DNA Fragmentierung zu Mono- und Oligonukleosomen kann durch Gel-Elektrophorese quantitativ bestimmt werden und ist als eindeutiger Apoptosenachweis anerkannt. Dieser Assay ist schwer zu quantifizieren und weist die Apoptose durch ein spezifisches DNA-Leitermuster nach. Dieses DNA-Leitermuster wird auch als DNA-Ladder bezeichnet und besteht aus DNA-Fragmenten von ca. 180bp und Vielfachen dieser Nukleosomeneinheit (Abb. 4.3).

Die genome DNA wird aus den zu untersuchenden Zellen isoliert. Die negativ geladenen Nukleinsäuren werden aufgrund eines von außen angelegten elektrischen Feldes durch das Trärgel gezogen, welches ihnen in Abhängigkeit ihrer Größe einen definierten Diffusionswiderstand entgegenbringt. DNA-Stränge gleicher Größe diffundieren demnach mit gleicher Geschwindigkeit durch das Gelmaterial. Nach kurzer Zeit bilden sich Banden im Gel aus, die mit einem Marker verglichen werden, der eine bestimmte Größe repräsentiert.

Sind in der Population Zellen apoptotisch abgestorben, erhält man nach Färbung des Gels ein spezifisches Muster, eine sogenannte DNA-Leiter (DNA-Ladder). Jede Sprosse der DNA-Ladder entspricht dem Vielfachen einer Nukleosomeneinheit von 180bp. Kritisch bei dieser Analyse ist der Zeitpunkt, zu dem die genome DNA isoliert

wird. Erfolgt die Aufreinigung, wenn sich die meisten Zellen bereits in einer sehr späten Phase der Apoptose befinden, kann man die DNA-Ladder nicht mehr eindeutig identifizieren. Die DNA-Degradierung ist dann soweit fortgeschritten, dass man nur noch einen Schmier erhält, der sich von dem Muster bei nekrotischen Zellen nicht unterscheidet.



**Abb 4.3** Schematische Darstellung des DNA-Laddertest (Boehringer Mannheim)

Die Detektion apoptotischer Zellen mittels Gel-Elektrophorese ist eine gute Ergänzung zu den Auswertungen mittels Mikroskop oder FACS. Sie wurde benutzt, um die DNA-Fragmentierung durch die Endonukleasen in die Nucleosomeneinheiten qualitativ nachzuweisen.

### Material und Geräte

- $4 \cdot 10^6$  Zellen
- PBS
- Lysispuffer (10 mM Tris; 0,5% Triton X-100; pH 7,5)

- TE-Puffer (10 mM Tris; 1mM EDTA; pH 7,5)
- Phenol (TE-gesättigt)
- Chloroform
- Isoamylalkohol
- RNase A (Boeringer Mannheim, FRG): Stammlösung 10mg/ml
- Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml): 1g Ethidiumbromid (Life Technologies) in 100 ml Aqua dest. lösen. Zum Färben 4µl auf 100ml der 1,6% Agaroseele geben. 1,6g Agarose (Biozym) auf 100ml Gelen in 1xTAE
- 50x TAE-Elektrophorese-Puffer (500ml): 2 M Tris, 0,25 M Natrium-Acetat 0,5M EDTA, pH 7,8. In ca. 300ml Aqua dest. lösen, mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen und filtrieren
- DNA-Probenpuffer (50 ml): 40% (w/v) Saccharose in 1mM EDTA, pH 8; 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) SDS
- DNA-Marker: 60µl DNA-Leiter (1µg/µl), 40µl 10xTAE, 300µl Aqua dest., 100µl DNA-Probenpuffer, 10min bei 56° C inkubieren, aliquotieren und bei -20° C bis zum Gebrauch lagern.
- Agarose („Biozym“ Agarose DNA Spezial Agarose für Elektrophorese von Nukleinsäuren>500Bp, Hess Oldendorf, FRG)
- Ethanol (100% und 70%)
- 3M NaCl
- Probe:13µl TE + 2µl RNase A + 5µl DNA-Probenpuffer
- Horizontale Gelelektrophoreseapparatur (wide mini Sub cell, Bio Rad)
- Gelform
- Taschenformer
- DNA-Marker (Gibcol BRL, USA)

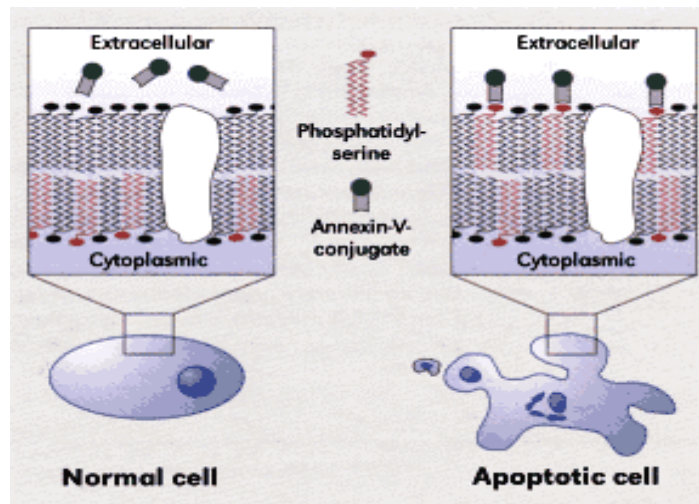
Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in 400µl Lysispuffer resuspendiert und 30min auf Eis stengelassen. Danach wurden die Zellkerne abzentrifugiert (10min bei 13000g). Der nukleinsäurehaltige Überstand wird abgenommen und mit

400µl Phenol gemischt und abzentrifugiert (2min bei 13000g). Der Überstand wurde abgenommen und mit 800µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und wieder zentrifugiert (2min bei 13000g). Dann wurde der Überstand mit 1 Volumenanteil (VT) Chloroform vermischt und zentrifugiert (2min, bei 13000g). Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde zu einem VT Überstand 2,5 VT 100% Ethanol und 0,1 VT 3M NaCl-Lösung (Endkonzentration 300mM) zugegeben. Die Proben wurden dann 30min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und danach 30min bei 13000g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gelöst und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mit einer Vakuumzentrifuge (Speed vac) wurde das Pellet getrocknet und in 13µl TE-Puffer resuspendiert. Um für die Messung störende RNA zu eliminieren wurde 1h RNA abgebaut mit RNase A (Endkonzentration  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in TE-Puffer) bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Zur Anfärbung der Proben wurde noch 5µl DNA-Probenpuffer zur isolierten DNA hinzugefügt. Danach erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1,6%igen Agarosegel (Lauf bei 70V ca. 1,5h). Das Agarosegel wurde zuvor durch sukzessives Lösen von Agarose in erwärmten TAE-Puffer hergestellt. Nach Abkühlung auf ca.  $60^{\circ}\text{C}$  wurden 4µl 1%ige Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt. Danach wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben, kurz abgewartet bis sich eine feste Schicht gebildet hat und die DNA-Proben in die Gelvertiefung, die während des Festwerdens mit einem Plastikschieber erzeugt wurden, hineinpipettiert. Das Gel wurde mit einer ausreichenden Menge Elektrophoresepuffer bedeckt, um die Kammer unter wässriger Lösung zu halten (ca. 500ml). Es wurde eine Spannung von 70V angelegt und nach 90min das Gel aus der Gelform genommen und unter UV-Licht fotografiert.

#### **4.3.6 Nachweis apoptotischer Plasmamembranveränderungen**

Der Nachweis der DNA Fragmentierung bei der Apoptose ist jedoch nicht immer möglich, gerade in frühen Stadien der Apoptose, die sich dadurch auszeichnen, dass die Integrität von Organellen und Zellmembranen noch erhalten ist. Während der Apoptose kommt es zu einer Translokation von PS von der zytoplasmatischen Seite der PM auf die Zelloberfläche. Annexin V (AV) ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig PL-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS. Mit einem Fluorescein (FITC)-konjugierten Annexin V lässt sich das Auftreten von PS im extrazellulären PM-Layer und damit eine frühe

Phase der Apoptose nachweisen. Annexin V-FITC wird von mehreren Firmen als Apoptosemarker in sogenannten Kits angeboten (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4** Schematische Darstellung des Annexin V-FITC Apoptostest (Boehringer Mannheim)

In Verbindung mit Propidiumiodid (Pi) kann zwischen frühen und späten Apoptosestadien unterschieden werden (Boersma et al., 1996). Durch die Asynchronität des apoptotischen Prozesses kommt es zum simultanen Auftreten von Zellpopulationen mit AV<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup> und AV<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup> Markierung.

Zellpopulationen der frühen Apoptosephase sind AV<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup> markiert und weisen eine intakte Zellmembran auf. Bei den AV<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup> markierten Zellen ist die Plasmamembran geschädigt, Propidiumiodid kann in die Zelle eindringen und markiert die DNA im Kern, was auf ein späteres Apoptosestadium hinweist.

Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin V binden kann und die Kerne mit Propidiumiodid markiert werden, lassen sich nekrotische Zellen von spätapoptotischen nur schwer unterscheiden. Im Vergleich mit anderen Techniken eignet sich die Annexin V-FITC/Pi Methode besonders für die Untersuchung früher apoptotischer Phasen.

### Material und Geräte

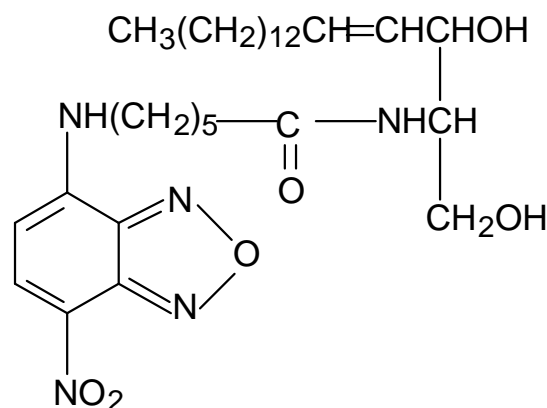
- LSM 410 (Zeiss, FRG)
- Annexin V-FITC Stammlösung (Boehringer Mannheim, FRG)
- HEPES-Puffer (10mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4)

- Propidiumiodid (Sigma, FRG) Stammlösung (50µg/ml)

Die Annexin V-FITC/Pi Lösung wird vor jedem Versuch frisch angesetzt. 20µl Annexin V-FITC werden mit 1000µl Hepes-Puffer verdünnt. Dazu werden 20µl der Propidiumiodid-Stammlösung gegeben. Die Zellen werden mit PBS gewaschen, gezählt und  $5 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$  in 1,5 ml Eppendorf Gefäße abgefüllt. Diese werden 5min bei 200g zentrifugiert und das Pellet in 100µl der frisch angesetzten Farbstofflösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10min wird 10µl von dieser Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetropft und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

#### 4.4 Lipidmetabolismus von C<sub>6</sub>-NBD-Ceramiden

Intensiv werden die Zusammenhänge zwischen apoptotischen Prozessen und Änderungen der Plasmamembran erforscht. In gesunden Zellen wird die PM durch Lipide, die im ER und Golgi-Apparat synthetisiert werden, ständig erneuert. Die Lipide gelangen über verschiedene Transportmechanismen durch das Cytoplasma an die Zellmembranen. Über den Lipidtransport insbesondere bei der Apoptose ist erst wenig bekannt. Mit einem fluoreszierenden Ceramidanalogue NBD-C<sub>6</sub> (Abb 4.5) sollen Zusammenhänge zwischen apoptotischen Prozessen und dem Lipidtransport bzw. der Lipidsyntheserate aufgedeckt werden.



**Abb 4.5** Chemische Strukturformel von C<sub>6</sub>-NBD-Ceramid

## Material und Geräte

- 1% BSA Fraktion V (Serva) in DMEM (1,2mg:100ml)
- $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml
- C<sub>6</sub>-NBD-Ceramide  $4 \cdot 10^{-6}$ M in DMSO (Molecular Probes)
- LSM 410 (Zeiss, FRG)
- Fluoreszenzspektrometer LS 50B (Perkin Elmer, FRG)

### 4.4.1 Lipidtransport

Die Zellkulturen wurden mit den Induktoren in 4-Lochmultischalen ausplattiert, und 20h lang standardmäßig inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abzentrifugiert (2min bei 1500U/min) und die Zellen in 1ml Medium (mit/ohne FCS) resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 10 $\mu$ M NBD-C<sub>6</sub> angefärbt. Die Farbstoffinkubationszeit betrug je nach Experiment zwischen 10min und 4h und erfolgte unter den Standardkulturbedingungen.

Danach wurden die Zellen in DMEM mit 1% BSA gewaschen, um das nicht gebundene fluoreszierende Ceramid aus dem Medium wegzufangen. Auf Grund der fehlenden polaren Kopfgruppe und der Hydrophilität der C<sub>6</sub>-NBD Kette kann das Molekül leicht durch die wässrige Phase zu inneren Membranen diffundieren.

Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen in 100 $\mu$ l Analysepuffer resuspendiert. Davon wurde ein Tropfen auf ein Deckgläschen aufgetragen und sofort untersucht.

### 4.4.2 Lipidsynthese

Nach der Lipidanalyse aus den ganzen Zellen wurden die fluoreszierenden Metabolite von NBD-C<sub>6</sub>, Sphingomyelin (NBD-SM) und Glycosylceramide (NBD-GlyCer) auf einem Dünnschichtchromatogramm getrennt und identifiziert. Sie waren ohne Sprühen aufgrund gelber Abfärbungen auf dem Gel zu erkennen. Sie wurden mit Hilfe des NBD-C<sub>6</sub> Standards und durch den Vergleich der relativen RF-Werte, für die zwei Hauptmetabolite der Ceramide, mit Literaturwerten identifiziert (Obradors et al.,

1997). Die Banden wurden vom Gel abgelöst, und in Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzspektrometer in den  $\mu$ -Küvetten. Das NBD wurde bei 466nm angeregt, und die Fluoreszenzintensitäten beim Emissionsmaximum von 518nm wurden miteinander verglichen und in Abhängigkeit der verschiedenen Metabolite dargestellt.

## 4.5 Liposomenpräparation

Die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen sind mit der sogenannten Extrudertechnik präpariert worden, was zu einer homogenen Liposomenfraktion führt. Die Liposomen wurden von Lorenz Egli (Abteilung Chemie und Biochemie der Universität Bern, Schweiz) hergestellt.

### Material und Geräte

- Tris 0,1M; pH 7,4
- DMPC
- Chloroform
- Rotationsverdampfer
- Vakuumschrank
- Extruder (Lipex Biomembranes, Canada)
- Polycarbonatfilter (Porengröße: 0,1 $\mu$ m)

DMPC wurde in Chloroform gelöst. Diese Lösung wurde in einem Rundkolben am Rotationsverdampfer eingeeengt und getrocknet. Dabei bildet sich an der Gefäßwand ein bereits orientierter Lipid-Trockenfilm aus. Dieser wird in wässriger Lösung (Tris-Puffer) dispergiert; dabei quellen die Lipide auf, lösen sich von der Gefäßwand ab und bilden MLV mit einer heterogenen Größenverteilung von 0,05 $\mu$ m-30 $\mu$ m (Lichtenberg et al., 1988) aus. Da solche Vesikel in ihrer Beschaffenheit oft für viele Zwecke ungeeignet sind, werden sie durch Nachfolgeverfahren in ihrer Größe und/oder anderen Eigenschaften modifiziert. Die wichtigsten Methoden zur Weiterverarbeitung von



MLV in Vesikel von kleinerem Durchmesser sind die Ultraschallhomogenisation, die French Press-Homogenisation und das Extrusionsverfahren (Hope et al., 1995).

Eine sehr milde Methode stellt die Extrusion von Liposomen unter Druck durch Polycarbonatfilter definierter Porengröße dar. Sie hat im Gegensatz zur Ultraschallhomogenisation keine degradierende Wirkung (Hydrolyse und beschleunigte Oxidation) und weist eine bessere Reproduzierbarkeit auf. Die Zerkleinerung der PL-Vesikel durch Extrusion beruht auf der Scherung der Vesikel an den Poren der eingesetzten Filter. Bei mehrmaligem Extrudieren von MLV durch Filter mit der Porengröße 0,1 µm oder kleiner resultieren zunehmend Liposomen mit unilamellarem Charakter (LUVET).

## **4.6 Charakterisierung der Membranen von EL4-Zellen**

Mit Hilfe der Dichte- und Gradientenzentrifugation wurden aus den EL4-Zellen Mikrosomen und Plasmamembranen (PM) gewonnen. Das Ablaufschema ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

### **4.6.1 Membranisolation**

Zur Isolation von PM aus ganzen Zellen gibt es verschiedene Verfahren. Die Zellen können mit Hilfe eines Detergenz lysiert werden oder durch mechanische Arbeit aufgebrochen werden (pottern). Eine schonendere Methode ist die Verwendung einer Stickstoffdruckbombe, in der die Zellen einem hohen Druck ausgesetzt sind und durch einen nachfolgenden Druckabfall zum Platzen gebracht werden, was zur Bildung von Plasmamembranvesikeln in der Größe von 200nm-700nm führt.

#### **Material und Geräte**

- Zellzahl insgesamt ca.  $5 \cdot 10^9$
- Puffer 1: 0,14 KCl, 20mM Hepes, pH 7
- EDTA 0,1M
- Puffer 2: 10mM Hepes pH 7.0 (hypotonisch)
- Puffer 3: 0,14 KCl, 20mM Hepes, pH 7

- 35% Sucrose, wird in Puffer 3 gelöst
- Puffer 4: 25mM Tris-HCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9 (optimal für 5'Nucleotidaseaktivität)
- Druckbombe
- Sorvall-Zentrifuge RC-5B, Rotor SS-34
- Ultrazentrifuge RP65T

1\*10<sup>8</sup> Zellen pro ml werden in Puffer 1 resuspendiert. Die 50ml Zentrifugenröhrchen mit ca. 25ml Inhalt werden nacheinander für 30min bei 30bar in die Druckbombe gestellt. Danach wird belüftet und die Zellsuspension aufgefangen. Unter dem Mikroskop wird geprüft, ob sich die meisten Zellen aufgelöst haben. Nach Zugabe von 300µl EDTA 0,1M wird das Zentrifugenröhrchen auf 30ml mit Puffer 1 aufgefüllt und auf die Zentrifugenröhrchen für den Rotor SS-34 verteilt. Für die Gesamtproteinbestimmung werden 100µl abgenommen.

1. Zentrifugation: Sorvall RC-5B, Rotor SS-34

15min 4500U/min (1500g), große Fragmente und Kerne sedimentieren sich ab, der Überstand wird weiter bearbeitet. (Für Proteinbestimmung werden 40µl entnommen). Die Zentrifugenröhrchen werden mit Puffer 1 aufgefüllt.

2. Zentrifugation: Sorvall RC-5B, Rotor SS-34

20min 16000U/min (20000g), sowohl Kerne als auch Mitochondrien gehen ins Pellet. Der Überstand wird weiter bearbeitet (100µl werden für die Proteinbestimmung abgenommen).

3. Zentrifugation: RP65T

60min 53000U/min (175000g), ins Pellet sedimentieren sich die Mikrosomen und die Plasmamembran, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 1ml Puffer 2 resuspendiert.

Die Zellsuspension in den Röhrchen wird zu einer Probe vereint und über Nacht im Kühlraum gelagert.

#### 4. Zentrifugation ohne Bremse: RP65

60min 53000U/min (175000g), der hydrotonische Puffer löst noch Proteine von den Membranen, die in den Überstand gehen, deshalb eignet sich auch der Überstand für die Proteinbestimmung. Das Pellet wird für die Plasmamembranfraktion weiter bearbeitet und in 4,5ml Puffer 3 resuspendiert, der kein  $MgCl_2$  enthält was für die Konservierung des Enzymstatus von Vorteil ist.

Mit Hilfe eines Sucrosegradienten wird die Plasmamembranfraktion durch eine weitere Zentrifugation gewonnen. Dafür wird das Pellet in einer Konzentration von ca. 1-3mg Protein/ml gelöst. Als Richtwert gilt, dass  $1 \cdot 10^9$  Zellen ca. 1mg Protein in der Plasmamembran enthalten.

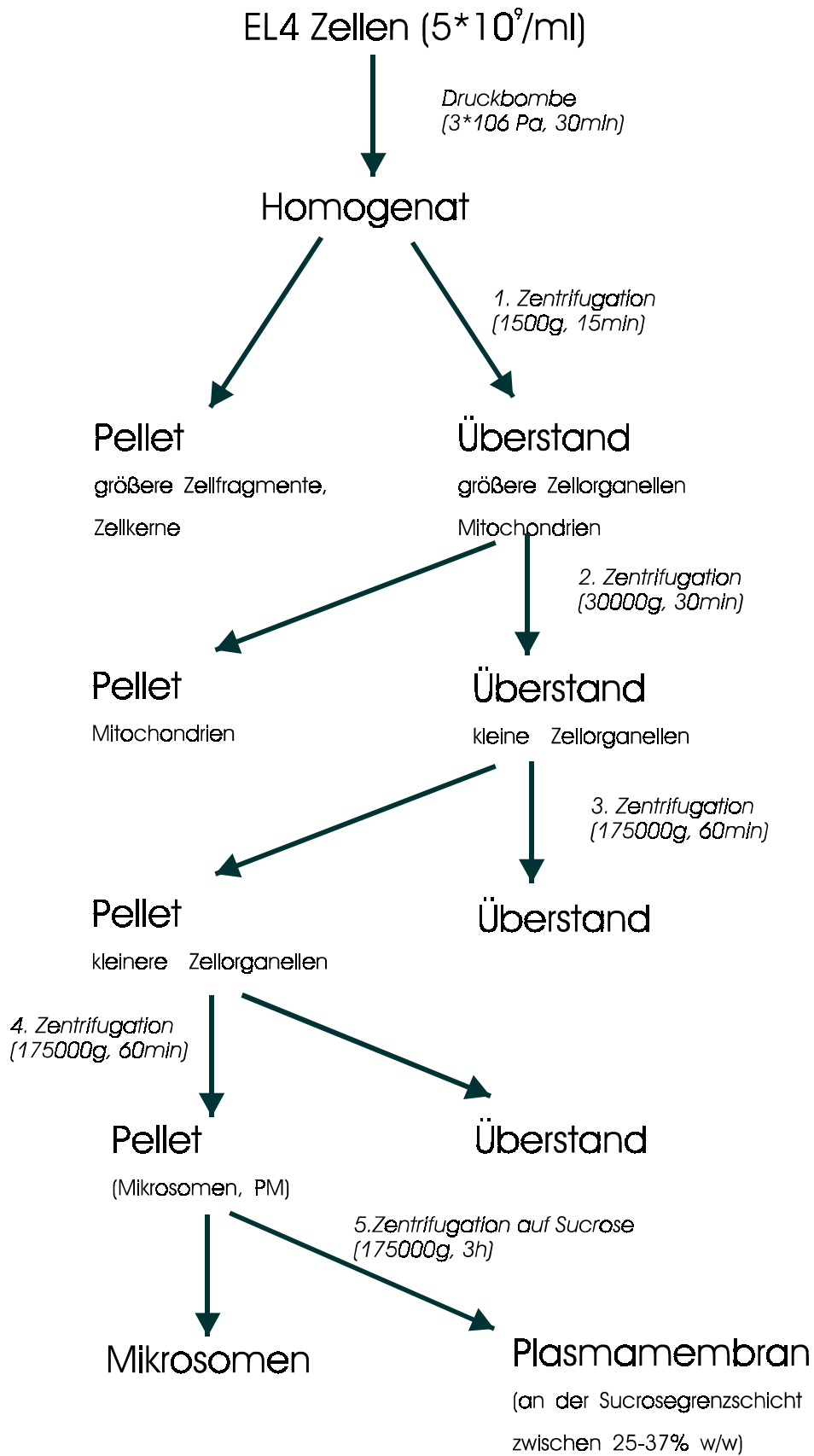
#### 5. Zentrifugation ohne Bremse: RP65T

3h 53000U/min (175000g), 1,5ml der Probe wird auf 7ml Puffer 3 geschichtet und das Zentrifugenröhrchen mit Puffer 3 aufgefüllt und ausgewogen.

Die Plasmamembranfraktion setzt sich an der Dichtegrenze zur Sucroseschicht ab, während sich im Pellet die mikrosomale Fraktion (ER-Fraktion) sedimentiert. Die Plasmamembranfraktion (PM-Fraktion) wird gewonnen, indem man mit einer Pasteurpipette durch die Pufferschicht ca. die Hälfte der Pufferschicht absaugt und von allen Proben in einem Zentrifugenröhrchen sammelt. Das wird mit Puffer 3 aufgefüllt. Auch die Pellets werden zu einer Probe vereinigt, nachdem die Sucrose abgekippt und verworfen wurde und das Pellet in Puffer 2 resuspendiert wurde.

#### 6. Zentrifugation ohne Bremse: RP65T

1h 53000U/min (175000g), die vereinigten Proben werden von Sucrose gewaschen. Das Pellet wird in Puffer 4 resuspendiert: erst in 100 $\mu$ l, dann auf 1 ml auffüllen. Dann wird die Probe in 50-100 $\mu$ l Portionen abgefüllt und  $2 \cdot 10^6$  für die Proteinbestimmung abgenommen.



**Abb 4.6** Ablaufschema der Dichte- und Gradientenzentrifugation zur Isolierung der Mikrosomen und Plasmamembranen (PM) aus EL4-Zellen

#### 4.6.2 Bestimmung des Proteingehalts

(Modifizierte Lowry-Methode)

Diese Methode zur Proteingehaltsbestimmung (Peterson, 1977) beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums (Farbumschlag) eines Kupferkomplexes (CTC). Je mehr Proteine an CTC gebunden werden desto blauer wird die Lösung, was mit einem Absorptionsspektrometer quantifiziert werden kann.

#### Material und Geräte

- Proteinproben von der Plasmamembranisolierung
- Cupfer-tartrat-carbonat (CTC)
  - a) 0,2%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  und 0,4% Kaliumtartat getrennt lösen
  - b) 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

Eine Lösung von a) und b) wird im Verhältnis 1:1 herstellen, indem b) unter rühren der Lösung a) hinzugefügt wird

- 10% Dodecylsulfat-Na (Laurylsulfat) SDS
- 0,8N NaOH
- Folin Ciocalteus Phenolreagenz
- 0,15% Na-Desoxycholat (DOC)
- 72% Trichloressigsäure (TCA)
- 1mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)
- Absorptionsspektrometer (Shimadzu)
- Tischzentrifuge (Eppendorf)
- Vortex-Mixer

Reagenz A: erst kurz vor Gebrauch ansetzen

CTC: 1 VT

NaOH: 1 VT

SDS: 1 VT

$\text{H}_2\text{O}$ : 1 VT

### Reagenz B:

Folin Reagenz: 1 VT

H<sub>2</sub>O: 5 VT

Da das Probenvolumen für die Proteinbestimmung sehr knapp war, wurden für die Absorptionsmessungen Mikroküvetten eingesetzt, die ein Messvolumen von 100µl besitzen. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurden definierte Konzentrationen von BSA eingesetzt. Mit der BSA-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in 1,5ml Eppendorfgläsern mit 100µl Endvolumen angesetzt und gegen eine Referenzprobe gemessen. Die auf den Proteingehalt zu untersuchenden Proben werden ebenfalls auf 100µl Volumen eingestellt.

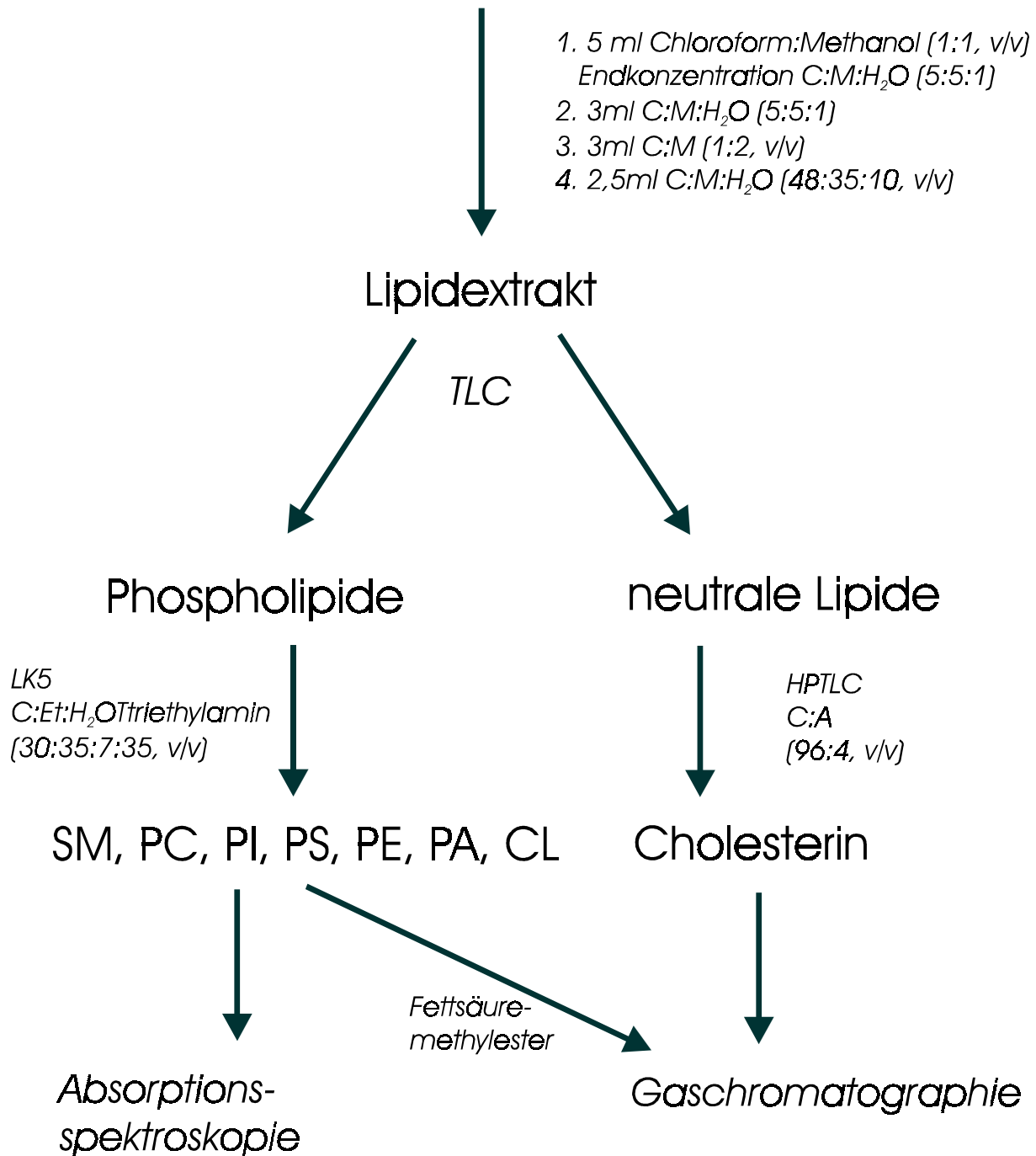
In die Eppendorfhütchen werden 10µl 0,15% DOC gefüllt, auf dem Vortex-Mixer gemischt und 10min inkubiert. Anschließend werden 10µl TCA hinzugegeben, wieder gut gemischt und 15min inkubiert. Danach erfolgt eine Zentrifugation (15min bei 500U/min) mit der Eppendorftischzentrifuge. Der Überstand wird verworfen. Zu dem Pellet werden 100µl H<sub>2</sub>O pipettiert und anschließend 100µl Reagenz A. Danach wird gut gemischt und 10min inkubiert. Dann werden 50µl Reagenz B hinzugefügt. Gut gemischt und noch 30min abgewartet, bevor die Messung erfolgt. Bei 750nm werden gegen den Leerwert im Absorptionsspektrometer die Extinktionen gemessen. Eine Regressionsanalyse ergab eine lineare Abhängigkeit von der Extinktion und der Proteinmenge für den Bereich zwischen 1,25µg-25mg Protein pro ml. Mit Hilfe der Werte aus der BSA-Eichkurve wird der Proteingehalt in den Membranproben bestimmt.

### **4.6.3 Lipidextraktion**

Aus den isolierten Membranen wurden wie schematisch in Abbildung 4.7 dargestellt ein Lipidextrakt gewonnen und weiter dünnschichtchromatografisch in verschiedene Lipidklassen aufgetrennt und weiter analysiert.

# Plasmamembranen, Mikrosomen

(0,1-1 mg/Protein)



**Abb. 4.7** Ablaufschema der Analysen aus den isolierten Membranen und die verwendeten Methoden

## Material und Geräte

- EL4-Zellhomogenate, PM (0,1-0,3mg/Protein), Mikrosomen (1-3mg/Protein)

- Zentrifuge
- Lösungsmittel p.a. (Sigma, Fluka)
- Rotationsverdampfer
- Vakuumtrockenschrank

Bei der Lipidextraktion wurde die von Suzuki (1964) modifizierte Methode von Folch et al. (1957) angewendet. Die isolierten Plasmamembranen und Mikrosomen wurden mit 0,3ml H<sub>2</sub>O versetzt und in 3ml Chloroform:Methanol (1:1, v/v) aufgenommen, so dass eine Endlösung von Chloroform:Methanol:H<sub>2</sub>O (5:5:1, v/v/v) entstand. Nach einer Extraktionszeit von 2h wurde das Pellet abzentrifugiert (300g, 10min) und der Überstand in einem Glaskölbchen aufgefangen. Nach dem gleichen Schema wurden drei weitere Lipidextraktionen durchgeführt: (i) 1,5ml Chloroform:Methanol:H<sub>2</sub>O (5:5:1, v/v/v); (ii) 1,5ml Chloroform:Methanol (1:2, v/v); und (iii) 1,5ml Chloroform:Methanol:H<sub>2</sub>O (48:35:10, v/v/v). Die vereinigten extrahierten gesamten Lipide wurden unter Stickstoff am Rotationsverdampfer verdampft und über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 30° C getrocknet. Für die weitere Analyse wird der Lipidextrakt aus den Glaskölbchen durch mehrmaliges Einengen unter Stickstoff in 50-100µl eines Chloroform:Methanol (2:1, v/v) Gemisches aufgenommen.

#### **4.6.4 Trennung und Isolierung verschiedener Lipidklassen**

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC) erfolgte die Auftrennung des Gesamtlipidextraktes. Die Lipide wurden dabei entsprechend ihrer Polarität in neutrale Lipide (NL) und polare Lipide/Phospholipide (PL) getrennt.

##### **Material und Geräte**

- NL bzw. NSL: HPTLC Diol F<sub>254</sub>S Platten 10\*10cm für Nano-Dünnschichtchromatographie (Merck, Darmstadt, FRG)
- Dünnschichtchromatographie-Platten 20\*20cm LK5 (LK6DF) (Whatman Laboratories Clinton, NJ) für PL
- PL-Standard: PC, PE, PI, PS, SM, CL (Sigma)



- NL-Standardde: Oleinfettsäure, Cholesterin, Cholesterinpalminat, Diglycerolpalminat, Triglycerolpalminat (Sigma)
- NSL-Standardde: NBD-C<sub>6</sub>, C<sub>2</sub>-Ceramid (Alexis)
- Vernebelungsgerät (Merck)
- Sprayreagenzien: Molybdatblau (Sigma), 1% Jod in Hexan, Primulinespray, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:Ethanol (1:1)

### **Phospholipide:**

Die Trennung der Phospholipide wurde durch TLC auf der LK5-Platte vorgenommen, die mit H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (2,3% in Ethanol) imprägniert wurde. Die Aktivierung erfolgte durch 15min Lagerung bei 110° C. Die DC-Kammer wurde 1h vor dem Lauf mit Filterpapier ausgekleidet und mit dem Laufmittelgemisch gefüllt. Mit dem Laufmittel Chloroform:Ethanol:H<sub>2</sub>O:Triethylamine (30:35:7:35, v/v/v/v) waren die Lipide eines Standardgemischs verschiedener Lipidklassen und der Lipidextrakt aus den Membranisolaten nach 3h getrennt. Die unpolaren Substanzen wandern in dem relativ unpolaren Laufmittelgemisch schneller als die polaren Substanzen. Die Banden der Proben wurden nach dem Trocknen zur Visualisierung mit einem Vernebler besprüht und durch den Vergleich der R<sub>f</sub>-Werte mit den Standards identifiziert.

### **Neutrale Lipide:**

Die Auftrennung der neutralen Lipide erfolgte durch TLC auf HPTLC-Platten mit dem Laufmittel CHCl<sub>3</sub>:Aceton (96:4, v/v). Danach wird die Platte mit den Sprayreagenzien besprüht und zur besseren Visualisierung bei 130° C im Thermoschrank erwärmt.

### **4.6.5 Phosphorbestimmung**

Die Phosphorbestimmung erfolgte colorimetrisch nach einer modifizierten Methode von Vaskowsky et al. (1975)

**Stammlösungen:**

Natriummolybdatlösung: 10g Natriummolybdat (Riedel) wurden in 60 ml 4N HCL gelöst. Separat wurden 0,4g Hydrazine Dehydrochloride (Sigma) in 14ml 4N HCL gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt, gemischt und 20 min bei 100° C gekocht. Danach wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Im abgekühlten Zustand wurden 14ml konzentrierte Schwefelsäure (98%) dazugegeben. Das Gemisch wurde mit Wasser auf 100ml aufgefüllt und war bei Raumtemperatur einige Wochen lagerfähig. Vor der Phosphorbestimmung wurde diese Lösung achtmal mit 4M Schwefelsäure verdünnt.

Phosphor-Eichkurve: 1,097g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden in 250ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Bei 815nm wurde die Absorption in den  $\mu\text{l}$ -Küvetten von 1-10 $\mu\text{g}$  Phosphor in 1ml  $\text{H}_2\text{O}$  bestimmt.

**Probenvorbereitung:**

Von den Dünnschichtchromatogrammen werden die getrennten Phospholipidzonen abgekratzt und in Glasröhrchen mit 60 $\mu\text{l}$  58%ige Perchlorsäure überführt. Die Röhrchen werden im Muffelofen 40min bei einer Temperatur von 200° C gehalten, um die Phospholipide zu verbrennen. Nach der Verbrennung wurde das anorganische Phosphor bestimmt, indem 20 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 180 $\mu\text{l}$  der Natriummolybdatlösung in die Röhrchen pipetiert und gründlich gevortext wurde. Danach wurde die Suspension 15min bei 100° C inkubiert und 5min bei 5000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Absorption bei 815nm im Absorptionsspektrometer gemessen und mit Hilfe der Phosphor-Eichkurve der Phosphorgehalt der Proben bestimmt.

**4.6.6 Cholesterinbestimmung**

Die Cholesterinzonen wurden von den Dünnschichtchromatogrammen abgekratzt und dreimal in 2ml Pentan eluiert. Das Adsorbent wird abzentrifugiert (5000U/min) und der Überstand in einem Rotationskolben gesammelt und unter Stickstoff verdampft. Für die gaschromatografische Bestimmung wird das Cholesterin in 100 $\mu\text{l}$  Hexan aufgenommen. Aus dieser Lösung wird ein Probenvolumen von 2-5 $\mu\text{l}$  in den

Gaschromatografen (GC) eingespritzt. Mit einer Verdünnungsreihe von 1mg Cholesterin in 1ml Hexan wurde eine Cholesterin-Eichkurve erstellt und eine Retentionszeit von 12,2min bei folgenden GC-Parametern bestimmt.

**GC-Parameter:**

Säule: 15m\*250µm\*0,1µm DB-5cb

Injektionstemperatur: 275° C

Detektortemperatur: 275° C

Trägergasdruck (He): 0,8 bar

Split-Verhältnis: 1:10

Temperaturprogramm:

200° C isotherm: 3min

200° C-275° C: 6° C/min

275° C isotherm 1,5min

Gesamtdauer: 17min

#### **4.6.7 Fettsäuremethylesterbestimmung**

Dieses Verfahren diente der Herstellung von Fettsäuremethylester von Fettsäuren für gaschromatografische Untersuchungen. Die Proben müssen vor der Methylierung hydrolysiert werden. Die GC-Analyse der aus den PL gewonnenen Fettsäuremethylester wurde als Auftragsarbeit von Dr. Lüllman und seinen Mitarbeitern am Honigforschungsinstitut in Bremen durchgeführt.

#### **Material und Geräte**

- Methanolische Natriumhydroxid-Lösung 0,5N (200mg in 10ml NaOH)
- Bortrifluorid-Methanol-Komplex (20%ige Lösung in Methanol)
- n-Pentan, n-Hexan
- wasserfreies Natriumsulfat
- gesättigte Kochsalzlösung
- Rotationsverdampfer

- Rundkolben 5 und 10 ml
- Rückflusskühler 20 bis 30 cm lang
- Probenröhrchen 14ml, verschließbar, unten konisch verjüngt
- Probenröhrchen 200 $\mu$ l, verschließbar, unten konisch verjüngt
- Siedesteinchen
- Kapillarpipetten, Peleusball
- Vakuumtrockenschrank

0,5-1mg Lipide werden in 800 $\mu$ l (0,5N NaOH in Methanol) aufgenommen und mit 2-3 Siedesteinchen in den Rundkolben gegeben, der mit einem Rückflusskühler verbunden ist. Die Probe bis zum Sieden (ca. 68° C) erhitzen. Danach durch den Rückflusskühler 1ml des Bortrifluorid-Methanol-Komplexes ohne Unterbrechung des Siedevorganges mit Hilfe der Messpipette und des Peleusballes durch den Rückflusskühler langsam zum Reaktionsgemisch geben. Etwa 2min nach der Zugabe des Bortrifluorid-Methanol-Komplexes den Kolben aus dem Heizbad entfernen und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur durch den Rückflusskühler 2ml Pentan zum Reaktionsgemisch hinzugeben. Den Rückflusskühler abnehmen und unter mehrfachem Umschwenken soviel gesättigte Kochsalzlösung in den Rundkolben geben, bis der Flüssigkeitsspiegel in den Kolbenhals gestiegen ist. Etwa 1ml der oberen Phase mit Hilfe der Kapillarpipette in ein Probenröhrchen 14ml überführen und unter Umschwenken etwas wasserfreies Natriumsulfat zur Trocknung hinzufügen. Etwa 1h stehenlassen, dann das Pentan mit einer Pipette abnehmen und in ein 5ml Kölbchen überführen, das Lösungsmittel verdampfen lassen und über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 25° C trocknen.

Am nächsten Tag die getrockneten Fettsäuremethylester von der Kolbenwand mit 100-500 $\mu$ l Pentan waschen, auf 30 $\mu$ l-50 $\mu$ l einengen und 5-10 $\mu$ l Aliquotts in 200 $\mu$ l Probenröhrchen umfüllen. Das Lösungsmittel verdampft und die Glasröhrchen werden in gasdichte Gefäße gestellt. Vor der Injektion in den GC wird die Probe in 30  $\mu$ l Hexan gelöst und davon 1 $\mu$ l für die Injektion in den GC verwendet.

## 4.7 Physikalische Grundlagen und Messmethoden

### 4.7.1 Fluoreszenz

Die Emission eines Photons von einem elektronisch angeregten Zustand wird als Lumineszenz bezeichnet, wobei man zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheidet, je nachdem ob der Übergang zwischen Zuständen gleicher oder unterschiedlicher Multiplizität erfolgt und damit spinerlaubt oder spinverboten ist.

Die einzelnen Energieniveaus können anschaulich in einem sogenannten Jablonski-Diagramm graphisch dargestellt werden (Abb. 4.8). Jedes einzelne elektronische Energieniveau wird aufgespalten in seine Schwingungsniveaus, die nochmals aufgespalten sind in dicht beieinanderliegende Rotationsniveaus.

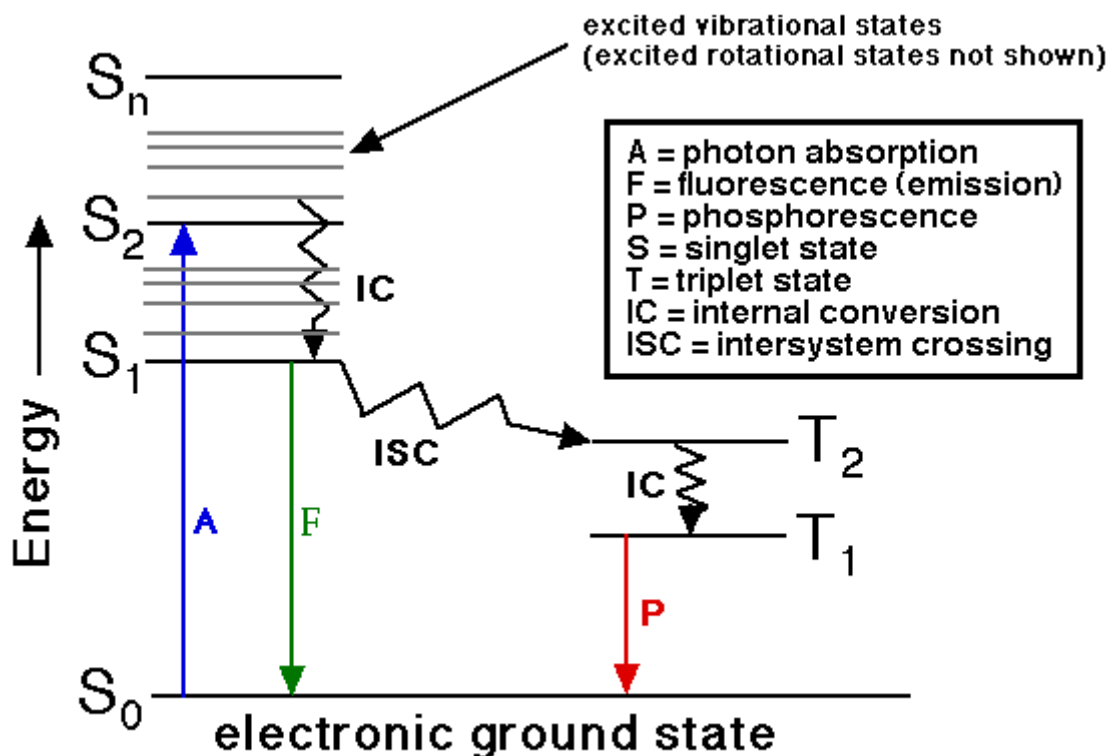


Abb. 4.8 Jablonski-Diagramm

Neben den angeregten Triplettzuständen  $T_1$  und  $T_2$  sind in Abbildung 4.8 der Singulett-Grundzustand  $S_0$  und die angeregten Singulettzustände  $S_1$ ,  $S_2$  und  $S_n$  dargestellt. Die zwischen den Energiezuständen der Schwingungsniveaus liegenden

dicht benachbarten Rotationsschwingungsniveaus sind der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. Mit Pfeilen sind die verschiedenen physikalischen Prozesse, die zwischen den Energieniveaus stattfinden können, dargestellt.

Bei Raumtemperatur liegen die meisten Moleküle in ihrem untersten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes vor. Von dort wird durch die Absorption von Licht das Molekül angeregt. Ein Molekül, das in ein höheres Schwingungsniveau angeregt wird, verliert seine Energie durch Kollision mit den Umgebungsmolekülen. Wenn die Moleküle in ein elektronisches Niveau angeregt werden, das über dem ersten angeregten Zustand liegt, gehen sie vom niedrigeren Schwingungszustand des 2. angeregten Zustandes in den höheren Schwingungszustand des ersten angeregten Zustandes über, diesen Prozess nennt man „internal conversion“ (IC). Wenn IC stattgefunden hat, geben die Moleküle durch die Kollision mit den Umgebungsmolekülen ihre Schwingungsenergie wieder sehr schnell an ihre Umgebung ab. So gelangen alle Moleküle, die in einem angeregteren Zustand als dem niedrigsten Schwingungszustand des ersten angeregten elektronischen Zustandes waren, in diesen strahlungslos zurück.

Aus dem ersten angeregten elektronischen Zustand kann das Molekül in jeden Schwingungs- und Rotationszustand des Grundzustandes zurückkehren. Bei diesem Übergang wird Licht emittiert, was als Fluoreszenz bezeichnet wird.

Kommt es zur Phosphoreszenz, gehen die angeregten Moleküle strahlungslos in einen angeregten Triplettzustand über, was als „intersystem crossing“ (ISC) bezeichnet wird, aus dem dann die Deaktivierung beobachtet wird. Sie lässt sich in flüssigen Lösungen oder Gasen nur schwer beobachten.

Bei der Anregung eines Moleküls ist mehr Energie erforderlich, als bei der Emission frei wird, was als Stokes-Gesetz (Stokes-Shift) bezeichnet wird. Bei vielen Molekülen ist das Emissionsspektrum ein Spiegelbild des Absorptionsspektrums. Das hängt damit zusammen, dass die Verteilung der Schwingungsniveaus des ersten angeregten Zustandes, welches die Form der ersten Absorptionsbande repräsentiert, oft der Verteilung der Schwingungsniveaus im Grundzustand sehr ähnlich ist, welche die Formen des Emissionsspektrums bestimmen.

Für Moleküle in Lösung liegen die Rotationsniveaus so dicht zusammen, dass sie spektrometrisch nicht aufgelöst werden können. Sie werden durch Banden um die Schwingungsniveaus dargestellt. Sind die Moleküle komplexer, überlagern sich auch

die einzelnen Schwingungsniveaus, so dass sich im Spektrum eine breite Absorptionsbande zeigt.

Die Intensitäten der Banden des Absorptions- und Emissionsspektrums stimmen nicht überein, was mit der Position des Atomkerns im Moment der Lichtabsorption zusammenhängt und als Franck-Condon Prinzip bekannt ist.

Aufgrund der geringen Masse der Elektronen erfolgt ein elektronischer Übergang gegenüber der Kernbewegung sehr schnell. Dies hat zur Folge, dass die Kerne nach einem elektronischen Übergang (Zeitdauer ca.  $10^{-16}$ s) plötzlich ein anderes auf sie wirkendes Potential spüren und dann diesem Potential zufolge eine neue Bewegung durchführen. Es werden solche Übergänge bevorzugt, die eine schnelle Anpassung der Kernbewegung an das neue Potential ermöglichen.

In die Sprache der Quantenmechanik übersetzt heißt dies, dass der wahrscheinlichste Übergang die Schwingungs-Wellenfunktion am wenigsten verändert.

Die Spektren der Fluoreszenzmoleküle werden außerdem von den Umgebungsbedingungen beeinflusst. Im folgenden wird besonders auf den Effekt der Umgebungspolarität eingegangen. Das Dipolmoment der Moleküle kann sich bei der Anregung ändern. Die Elektronen der Fluoreszenzmoleküle haben im angeregten Zustand größere Elektronenorbitale als im Grundzustand und besitzen ein größeres Dipolmoment. Die Moleküle sind im angeregten Zustand somit stärker polarisierbar. Die Dipole in der näheren Umgebung des Fluorophors relaxieren in einen neuen durch die Dipoländerung induzierten energieärmeren Gleichgewichtszustand.

Sofort nach der Emission befindet sich die Dipolorientierung der Umgebungsmoleküle noch in der Konfiguration des angeregten Zustandes. Dieser Zustand hat eine höhere Energie als die Gleichgewichtskonfiguration im Grundzustand, und so wird letztlich die Gleichgewichtskonfiguration des Grundzustandes erst nach der Relaxation der Dipole erreicht. Bei diesen Relaxationsprozessen wird die Energiedifferenz in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. In den Emissions- und Excitationsspektren zwischen den  $S_0$ - $S_1$  Grundzuständen wird eine Bandenseparation der elektronischen Energieniveaus beobachtet.

Dieser Effekt ist am größten für Fluoreszenzmoleküle, die bei ihrer Excitation in den ersten angeregten Zustand große Änderungen in ihrem Dipolmoment aufweisen, und ist um so stärker, je polarer seine Umgebung ist.

Außerdem spielt die Umgebungstemperatur und die –viskosität eine entscheidende Rolle. Bei niedrigen Temperaturen und hoher Viskosität wird die Ausrichtung der Dipole der Umgebungsmoleküle im angeregten Zustand innerhalb der Lebensdauer nicht stattfinden können, während bei hohen Temperaturen und niedriger Viskosität die Ausrichtung der Dipole stattfinden kann. Es kommt so ebenfalls zu einer Energiedifferenz auf Grund der Dipolkonfigurationen zwischen den Grundzuständen der Emissions- und Excitationsspektren.

#### **4.7.2 Fluoreszenzspektroskopie**

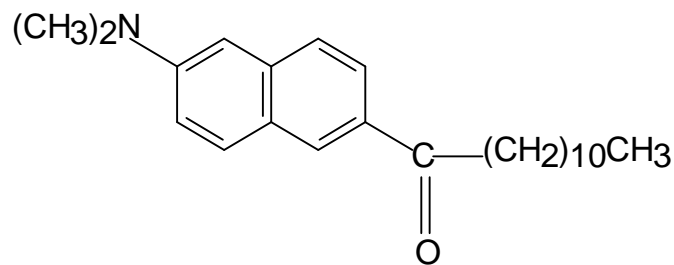
Eine gepulste Xenon Blitzlampe dient beim Fluoreszenzspektrometer LS-50B (Perkin Elmer) als Anregungsquelle. Über einen Monochromator wird die Anregungswellenlänge selektiert. Die Excitations- und Emissionsspalte wurden auf 2.5nm eingestellt. Im Strahlengang befand sich ein durch einen Wasserkreislauf temperierbarer Halter für 10mm Standardküvetten. Die Emission wurde mit Hilfe eines Monochromators wellenlängenselektiv unter 90° zum Anregungslicht detektiert.

#### **4.7.3 Generalisierte Polarisation**

Laurdan (2-Dimethylamino-6-Lauroylnaphthalene) ist ein amphiphiles Molekül (Abb. 4.9), das auf der Grundlage von Naphtalen von Weber und Farris (1979) synthetisiert wurde, um den Einfluss von Lösungmittelpolaritäten auf die Fluoreszenzspektren zu untersuchen. Dabei stellten Sie fest, dass sich mit steigender Lösungmittelpolarität das Maximum der Emission zu längeren Wellenlängen verschiebt. Da die molekulare Dynamik der Umgebungsmoleküle auf gleichen Zeitskalen wie die Fluoreszenzlebensdauer von Laurdan liegen, wird ein Teil der Anregungsenergie für die Ausrichtung der Dipole in der Umgebung aufgewendet, was zu einer Rotverschiebung des Emissionsspektrums führt. Dieses Phänomen wird als Dipolrelaxation bezeichnet. In isotropen unpolaren Lösungsmitteln zeigt das Excitationsspektrum von Laurdan nur eine kurzweilige Bande bei 340nm. In polaren Lösungsmitteln ist das Laurdan Excitationsspektrum rot-verschoben mit einem Maximum bei 370nm, und es erscheint ein weiteres Maximum bei 390nm, dessen Intensität mit zunehmender



Lösungsmittelpolarität ansteigt. Diese spektralen Eigenschaften sind eine Folge der Sensitivität von Laurdan auf die Umgebungspolarität.



**Abb 4.9** Chemische Strukturformel von Laurdan

Wird das Lösungsmittel durch eine Membran ersetzt, stammt der Prozess der Dipolrelaxation, der die spektralen Eigenschaften beeinflusst, von einigen Wassermolekülen, die an der hydrophoben-hydrophilen Grenzschicht präsent sind, wo auch der hydrophobe, fluoreszierende Teil des Laurdanmoleküls lokalisiert ist.

In der Gelphase ist die molekulare Dynamik der umliegenden Dipole langsamer ( $4 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$ ) als die Lebensdauer von Laurdan ( $2,5 \cdot 10^9 \text{s}^{-1}$ ). So können sich die Dipole nicht während der Lebensdauer von Laurdan ausrichten. In der flüssig-kristallinen Phase kann eine Ausrichtung der Umgebungsdipole stattfinden, was sich durch eine Rotverschiebung in den Spektren auswirkt. Diese Charakteristik in den Laurdan-spektren wird bei der fluoreszenzspektroskopischen Methode zur Fluiditätsbestimmung und der Untersuchung von koexistierenden Lipidphasen ausgenutzt. Es wird also von der Dynamik der Dipole der Wassermoleküle auf den physikalischen Zustand der Membran geschlossen, der mit der generalisierten Polarisation (GP) beschrieben werden kann (Parasassi et al. 1986). Diese hat formal die gleiche Form wie die Fluoreszenzpolarisation,

$$GP = \frac{I_g - I_f}{I_g + I_f}$$

wobei  $I_g$  und  $I_f$  die Fluoreszenzintensitäten sind, die für die Maxima der Laurdan-spektren für die Gel- und flüssig-kristalline Phase charakteristisch sind.

Je nachdem, ob man die GP-Werte aus den Emissionsspektren oder den Excitationsspektren bestimmt, werden die exGP und die emGP unterschieden:

$$exGP = \frac{I_{434} - I_{490}}{I_{434} + I_{490}}$$

$$emGP = \frac{I_{410} - I_{340}}{I_{410} + I_{340}}$$

Für die Berechnung der exGP werden die Intensitäten der Wellenlänge bei 434nm, die typisch für das Maximum des Emissionsspektrums im Gelzustand ist, und die bei 490nm, die das Maximum der Emissionswellenlänge im flüssig-kristallinen Zustand repräsentiert, ausgewertet.

Für die Berechnung der emGP werden die Intensitäten der Wellenlängen 410nm und 340nm des Excitationsspektrums verwendet: Der gel-Zustand ist polarer, da sich die Wassermoleküle in einem geordneteren Zustand befinden als in der flüssig-kristallinen Phase.

Durch die Variation der Excitationswellenlänge können so bevorzugt Laurdanmoleküle in unterschiedlichen Lipidphasen angeregt werden.

Das Verhalten der GP-Werte als Funktion der Emissions- und Excitationswellenlänge kann dann dazu benutzt werden, um die Koexistenz von unterschiedlichen Domänen nachzuweisen.

Die rote Bande des Excitationsspektrums wird von Laurdanmolekülen besetzt in einer Umgebung mit orientierten Dipolen, der Gelphase der Phospholipide. Es kommt zu einer Fluoreszenz im kürzeren Wellenlängenbereich, was zu hohen exGP-Werten führt.

Wenn diese Phase nicht existiert, wird die rote Bande des Excitationsspektrums von relaxierten Laurdanmolekülen besetzt, die im Emissionsspektrum eine Rotverschiebung zeigen, was zu einer Erniedrigung der GP-Werte führt. Damit wird deutlich, dass sich beim Vorhandensein von koexistierenden Phasen die GP-Werte mit Zunahme der Excitationswellenlänge zu höheren Werten verschieben.

Befindet sich Laurdan in einer Umgebung, wo die Relaxationsprozesse schneller als die Fluoreszenzprozesse sind, so wie z.B. in der flüssig-kristallinen Phase von Phospholipiden, werden durch die Anregung im längerwelligen Bereich des Absorptionsspektrums photoselektiv Laurdanmoleküle in einer relaxierten Umgebung angeregt.

Das Emissionsspektrum wird dann durch die rote Bande dominiert, was zu geringeren exGP-Werten führt.

Die gleiche Argumentation lässt sich auch auf die emGP übertragen, nur dass die Höhe der emGP-Werte umgekehrt von den Wellenlängen abhängen, da nach der Definition der emGP-Werte die blauen und roten Banden im Vergleich zur exGP vertauscht sind.

Die Additionseigenschaften der GP-Werte können benutzt werden um die relativen Anteile der koexistierenden Phasen in der Probe zu analysieren.

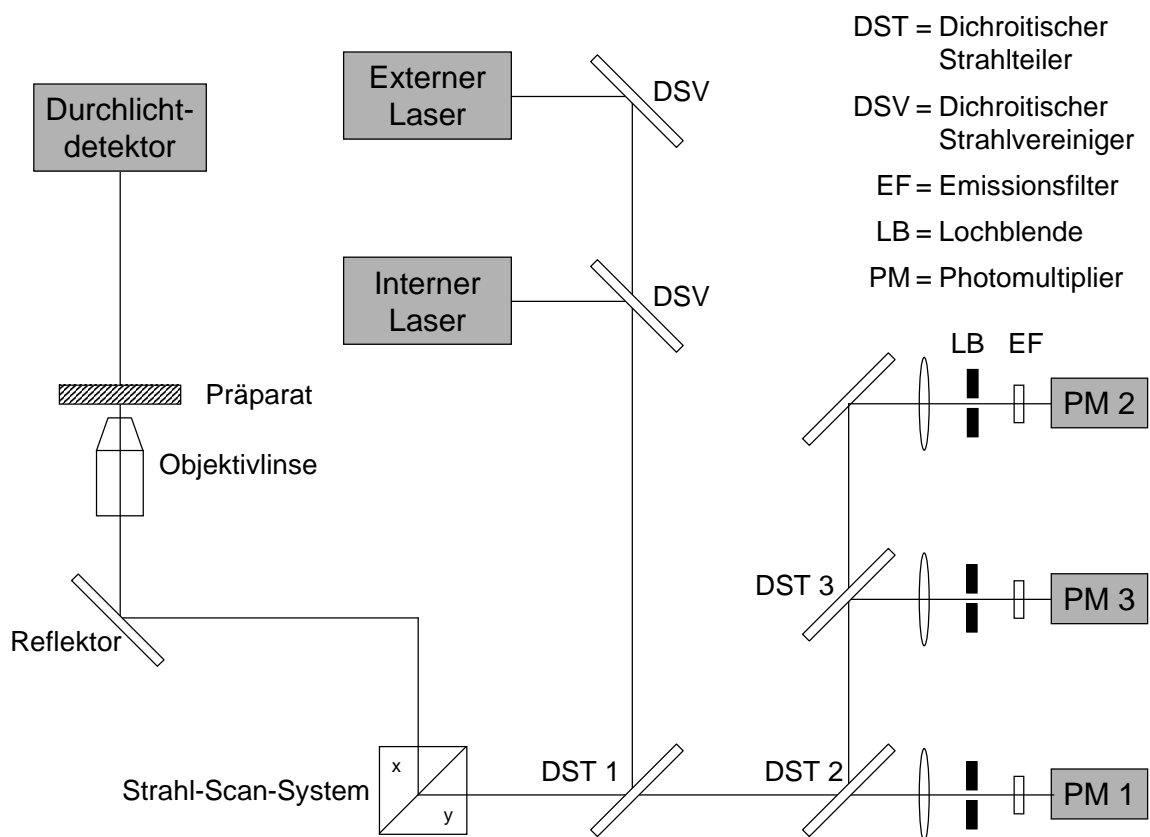
### **Material und Geräte**

- Tris 0,1M; pH 7,4
- Laurdan (Molecular Probes) Stammlösung  $10^{-4}$ M in N,N-Dimethylformamid (DMF)
- $\mu$ l-Küvetten (Hellma, FRG)
- Fluoreszenzspektrometer LS-50B (Perkin Elmer, FRG)

Die Membranfraktionen wurden bei gleichem Proteingehalt vermessen. Für die PM-Isolate wurden 50 $\mu$ g und für die mikrosomale Fraktion 150 $\mu$ g Proteine pro ml eingesetzt. Um den Materialverbrauch so gering wie möglich zu halten, wurden  $\mu$ l-Küvetten für die Messung eingesetzt, die mit einem Probenvolumen von nur 120 $\mu$ l auskommen. Die Membranisolate wurden mit Tris-Puffer auf 400 $\mu$ l verdünnt. Das Volumen wurde geteilt und mit 2 $\mu$ l der Laurdanstammlösung versetzt. Die restlichen 200 $\mu$ l wurden für die Ermittlung der Streulichtwerte benutzt. Die Endkonzentration von Laurdan in allen Proben betrug  $1 \cdot 10^{-6}$ M und wurde vor der Messung eine halbe Stunde lang inkubiert. Mit einem zirkulierenden Wasserbad wurden die verschiedenen Messtemperaturen eingestellt. Die ermittelten generalisierten Polarisationswerte wurden streulichtkorrigiert.

#### **4.7.4 Laser Scanning Mikroskopie**

Das Laser Scan Mikroskop 410 invertiert (LSM) ist schematisch in Abbildung 4.10 dargestellt. Ein Argonlaser (488nm) diente als Anregungsquelle für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (NBD, FITC, Pi).



**Abb 4.10** Schematische Darstellung eines Laser Scanning Mikroskops (Jessel, 1999)

Das Laserlicht wird über einen Farbteiler auf einen x-y Scanner gelenkt, um eine Abtastung in x und y Richtung zu erreichen. Durch die Tubuslinse des Objektivs wird der Laserstrahl beugungsbegrenzt auf das Präparat fokussiert. Das Emissionslicht gelangt über den Scanner durch ein dichroitisches Strahlteilersystem (DST 1 510nm) in die Detektoreinheit, wo die Fluoreszenzemissionen durch weitere Strahlteiler aufgetrennt werden. Auf den Photomultiplier 1 (PMT 1) gelangt das Fluoreszenzlicht von Propidiumiodid, auf den Photomultiplier 2 (PMT 2) gelangt die FITC bzw. NBD Fluoreszenz. Computergesteuerte variable Pinholes (Lochblenden) arbeiten als sogenannte Raumfilter und lassen nur solches Licht passieren, das direkt aus der Fokusebene stammt, während Licht aus anderen Ebenen wirksam unterdrückt wird. Das LSM kann neben dem konfokalen Modus auch nicht-konfokal betrieben werden. In diesem Fall werden die Pinholes so weit geöffnet, dass nicht nur das Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene den Detektor erreicht, sondern wie bei konventionellen Fluoreszenzmikroskopen üblich, auch Fluoreszenzintensitäten von

oberhalb und unterhalb der Fokusebene. Die Fluoreszenzmarkierungen ganzer Zellen lassen sich so gut detektieren, insbesondere die Effektivität der Zellkernmarkierung mit Propidiumiodid.

Das LSM ist außerdem mit einem Durchlichtdetektor (DET) ausgestattet, so dass die zwei Fluoreszenzkanäle mit dem Durchlichtanteil gleichzeitig ausgelesen und am Bildmonitor dargestellt werden können. Das ganze System ist auf ein luftschwingungsgedämpftes Trägerelement für eine Granitplatte positioniert, um die Mikroskop-Komponenten erschütterungsfrei zu lagern.

#### **4.7.5 Durchflusscytometrie**

Die Durchflusscytometrie („flow cytometry“) stellt ein universelles Messprinzip dar, das sich nahezu in allen Fragen der Zellbiologie bewährt hat. Gerade die quantitative Beurteilung verschiedener Zellparameter, verbunden mit einer hohen Durchflussrate (bis zu mehreren Zellen pro Sekunde) führten dazu, dass die zugehörigen Geräte (Abb 4.11), die auch als „fast analysing cell sorter“ (FACS) bezeichnet werden, nicht nur in der Grundlagenforschung eingesetzt werden, sondern auch in der klinischen Routinediagnostik.

Das Prinzip der Durchflusscytometrie geht auf Untersuchungen in den sechziger Jahren zurück, wo mehrere Gruppen unabhängig voneinander verschiedene Prototypen entwickelten.

Die Zellen liegen in einer Suspension vor, die aus einem Vorratsgefäß angesaugt und über ein Schlauchsystem durch eine enge Öffnung in eine Messzelle gepresst wird. Die Zellen werden in dem laminaren Flüssigkeitsstrom so geführt, dass nur jeweils eine Zelle die Öffnung passieren kann. In der Mitte des Flusskanals wird ein Argonlaserstrahl (488nm) fokussiert, der auf die vorbeifließenden Zellen trifft.

Ein Detektor in Vorwärtsrichtung detektiert die Intensität des Lichtes, das nach vorn gestreut wird („forward scatter“). Die Streueigenschaften der Vorwärtsstreuung enthalten die Information über die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle, was auch als Granularität bezeichnet wird. Sie ist bei den gesunden Zellen am größten.

Durch einen halbdurchlässigen Spiegel wird unter einem 90°-Winkel das seitlich gestreute Licht („side scatter“) auf einen weiteren Detektor gelenkt. Die Intensität des

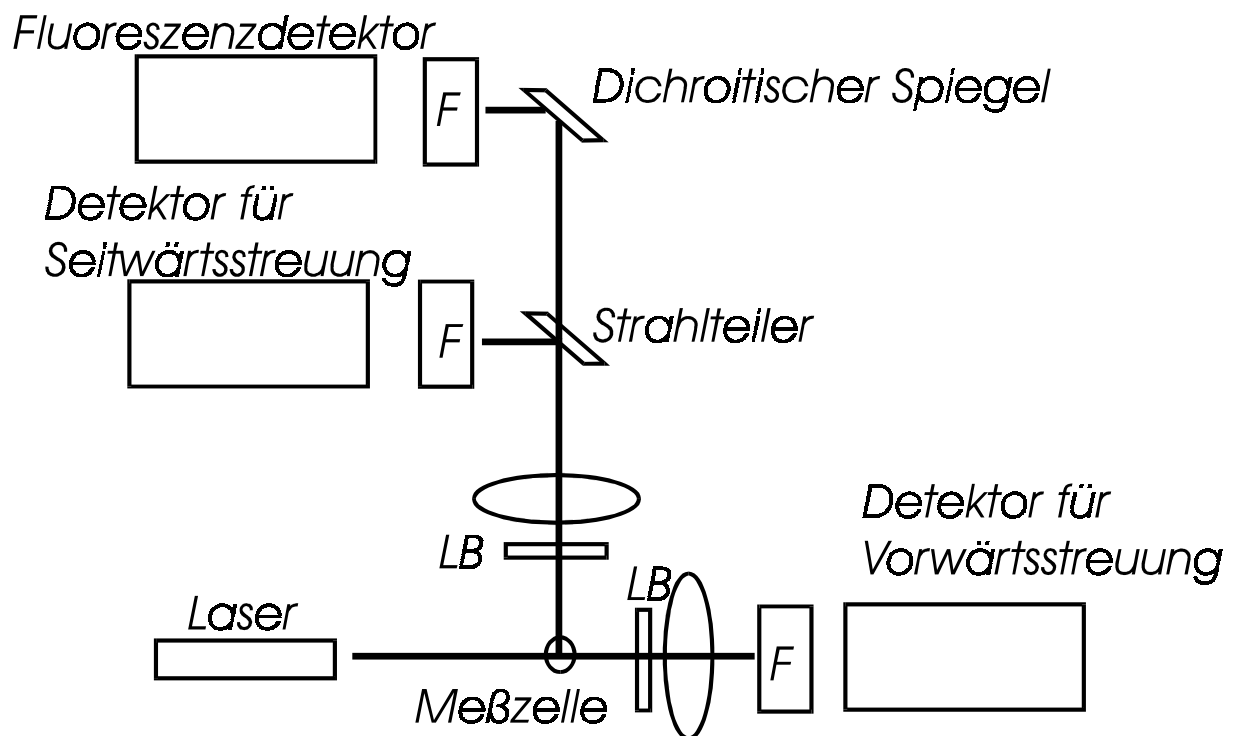
Lichts, das seitlich gestreut wird, enthält die Information über die Zellgröße. Je kleiner die Zellen, desto höher ist die Seitwärtsstreuung.

Durch zusätzliche Fluoreszenzmarkierungen der Zellen können durch halbdurchlässige Spiegel die Intensität des Fluoreszenzlichtes auf weitere Detektoren gelenkt werden.

Bei jeder Messung im Flowcytometer können somit gleichzeitig mehrere Parameter bestimmt werden:

- Die Intensität der Vorwärtsstreuung des Laserlichtes an den Teilchen
- Die Intensität der seitlichen Streuung im Winkel von  $90^\circ$  vom einfallenden Laserstrahl
- Die Fluoreszenzemissionsintensität im  $90^\circ$ -Winkel zum anregenden Laserstrahl.

Das Flowcytometer ist nach wie vor die Methode der Wahl, wenn es darum geht, durch die Quantifikation des DNA-Gehalts der Zelle schnell einen Überblick über den Zustand des Zellzyklus zu bekommen.



**Abb 4.11** Schematische Darstellung eines Flowcytometers

Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an DNA bindet, was jedoch die Permeabilisierung der Zellen voraussetzt. Zellen einer asynchronen Zellkultur weisen unterschiedlichen nukleosomalen DNA-Gehalt auf: von  $2n$  aus der  $G_0/G_1$  Phase bis zu  $4n$  aus der  $G_2/M$  Phase. Ein Histogramm zeigt die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen. Bei apoptotischen Zellen werden niedermolekulare DNA-Fragmente, die aus dem Zellkern gelangt sind, nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen abzentrifugiert. Der geringere DNA-Gehalt dieser Zellkerne führt zu einer geringeren Anfärbung mit Propidiumiodid und im Histogramm zeigt sich ein „sub- $G_1$ “ Peak.

Der extrahierte DNA-Gehalt und die Position des „sub- $G_1$ “ Peak ist vom Zelltyp und vom Puffer, in dem die Zellen resuspendiert werden, abhängig. Der größte Nachteil dieser Methode ist, dass apoptotische Zellen in der  $G_2$ -Phase, die einen reduzierten DNA-Gehalt aufweisen, auch den DNA-Gehalt von Zellen der  $G_1$ -Phase repräsentieren können und somit nicht als apoptotische Zellen detektiert werden, was zu einer Unterrepräsentation der apoptotischen Zellpopulation führt. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass Zellen, die vollständig fragmentierte Kerne haben, im Histogramm nicht mehr als ein Partikel erscheinen. Auch Zellkluster, die höhere Fluoreszenz und Streuwerte liefern, können bei der Auswertung nicht mit berücksichtigt werden.

Das FACS wurde mit der Kontrollzellpopulation kalibriert, das Histogramm in die oben beschriebenen Bereiche unterteilt und die Anzahl der Partikel vom sub- $G_1$ -Peak als Prozentwert der gesamten registrierten Ereignisse angegeben. Für die Quantifizierung wurden 5000-10000 Zellen vermessen.

## 5 Ergebnisse

Die Anzahl der Publikationen auf dem Gebiet der Apoptose ist in den letzten Jahren stetig angestiegen und damit auch die Vielfalt der „Schlüsselmoleküle“, denen im Apoptosepfad eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird. Unter anderem wird als wichtiges Molekül, das regulierend auf die Apoptose wirkt, das Ceramid diskutiert (Kolesnick et al., 1998).

In dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass auch in EL4-Zellen ein Ceramid-abhängiger Apoptosepfad existiert. Die Apoptose wurde mit einem kurzkettigen Ceramidanalogue (D-erythro-C<sub>2</sub>-Ceramid) ausgelöst und mit dem Adenosinanalogue Tubercidin verglichen, dessen apoptotische Eigenschaften in unserer Arbeitsgruppe schon früher untersucht wurden (Jessel, 1999). Dabei stehen die physikalischen und biochemischen Untersuchungen der Plasmamembran in frühen apoptotischen Phasen im Vordergrund. Es war zunächst notwendig, die Wachstumsbedingungen der EL4-Zellen zu untersuchen, um einerseits bei den Experimenten den Anteil nekrotischer / spät-apoptotischer Zellen möglichst gering zu halten, und andererseits mit hohen Zellkonzentrationen zu arbeiten, damit für die Membranisolation genügend Zellmaterial zur Verfügung stand.

### 5.1 Zellwachstum und Vitalitätsbestimmungen

Die Wachstumsbedingungen für die Auslösung von Apoptose spielen bei den meisten Zelllinien eine entscheidende Rolle. So kann es allein schon durch Serummangel im Medium zu apoptotischen Prozessen kommen. Im Kultursmedium sind in hohen Konzentrationen Wachstumsfaktoren und Zytokine enthalten. Fehlen diese, werden die Zellen eher zur Apoptose angeregt als zur Zellteilung. Selbst unterschiedliche Mediumchargen können zur Variation der Zelleigenschaften führen und damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren. Es wurden daher, bevor mit den eigentlichen Apoptose-Untersuchungen begonnen wurde, die Wachstumseigenschaften der Zelllinie EL4 untersucht.

Die in einer Konzentration von  $3 \cdot 10^5$ /ml nach jeder Passage ausplattierten Zellen verdoppeln sich innerhalb von ca. 20h. Nach der exponentiellen Wachstumsphase

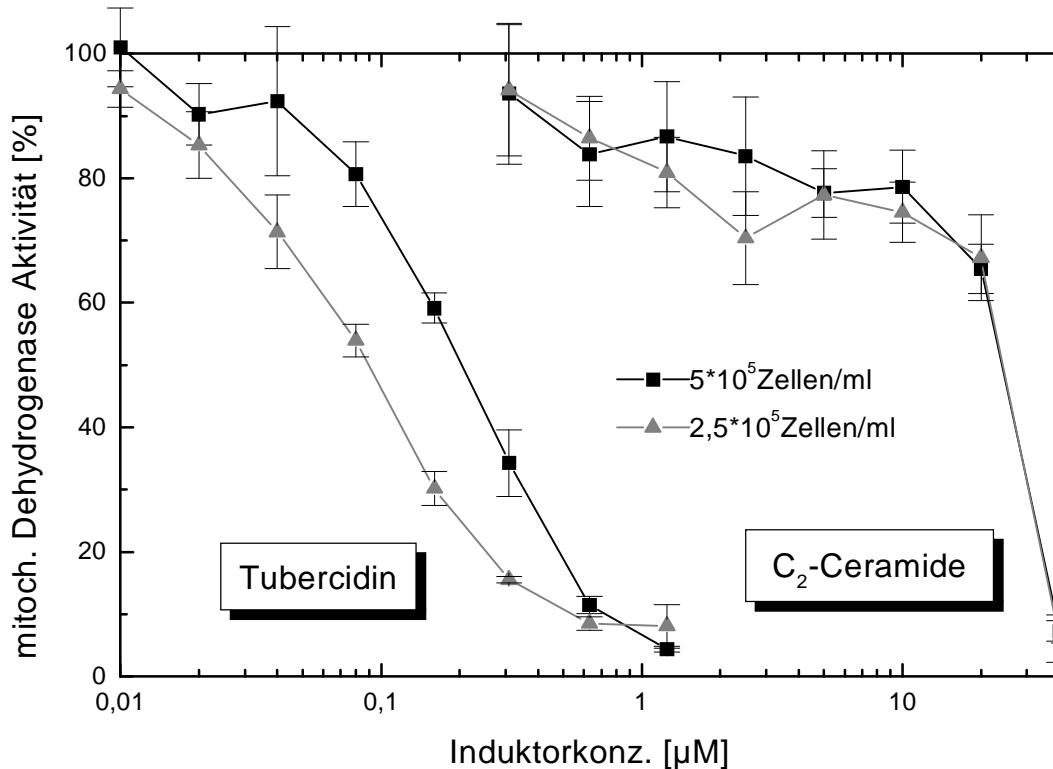


(>  $3 \cdot 10^6$ /ml) setzt vermehrt ein Zellsterben ein. Der Boden der Kulturflaschen ist nicht mehr homogen mit Zellen bewachsen, sondern die Zellen lösen sich ab und bilden im Überstand Zellkluster. Nekrotische Zellen entlassen ihre Zellgifte ins Medium, der pH-Indikator (Phenol-Rot) des Mediums verfärbte sich gelblich, was die pH-Wertänderung des Medium ins Saure anzeigt. Um den Anteil der Nekroserate, der von den Wachstumseigenschaften der Kulturzellen selbst hervorgerufen wird, möglichst gering zu halten, werden die Experimente am Ende der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt.

Die zytotoxischen Eigenschaften der verwendeten Induktoren wurden mit der Trypanblau-Ausschlussfärbung untersucht. Von den zellpermeablen  $C_2$ -Ceramiden ( $C_2$ ) ist bekannt, dass sie zytotoxische Eigenschaften haben (Suzuki et al., 1997). In den EL4-Zellen ließen sich bei einer  $C_2$ -Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  im Medium nach 24h aber keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen. Die Markierungsrate mit Trypanblau lag wie bei der Kontrolle bei 5%. Die mit  $1 \mu\text{M}$  Tubercidin (Tub) induzierten Zellen zeigten nach 24h einen geringen Anstieg der Trypanblau Markierung auf 12%. Um die Experimente mit  $C_2$  und Tubercidin parallel durchführen zu können wurden dieser Anteil nekrotischer Zellen in den Kulturen jedoch akzeptiert. Ein genaueres Bild von den Dosis-Wirkungs-Raten nach 24h der Induktoren auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität lieferte die Analyse der MTT-Assays (Abb. 5.1).

Es wurden zwei unterschiedliche Zelldichten ( $2,5 \cdot 10^5$ /ml und  $5 \cdot 10^5$ /ml) eingesetzt, um in Abhängigkeit vom DNA-Gehalt den Einfluss der Induktoren auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität (MDA) zu untersuchen. Bei den geringeren Zelldichten ließ sich der Einfluss von Tubercidin auf die MDA schon bei niedrigeren Konzentrationen nachweisen. Bei einer Dosis von  $0,04 \mu\text{M}$  war die MDA im Vergleich zu der höheren Zelldichte 20% niedriger. Die Induktorkonzentration, bei der die MDA 50% beträgt, wird als  $EC_{50}$ -Wert bezeichnet. Der  $EC_{50}$ -Wert von Tubercidin lag bei der geringeren Zellkonzentration bei  $0,1 \mu\text{M}$  um die Hälfte niedriger als bei der doppelten Zelldichte, deren  $EC_{50}$ -Wert für Tubercidin bei  $0,2 \mu\text{M}$  lag. Die Dosis-Wirkungskurve ist bei der geringeren Zelldichte zu niedrigeren Konzentrationen verschoben, was ein Hinweis auf direkte zytotoxische DNA-Effekte ist.

Die mit  $C_2$  behandelten Zellen zeigten keinen von der Zelldicht abhängigen Effekt auf die MDA. Die Dosis-Wirkungskurven sind für beide Zelldichten fast deckungsgleich.



**Abb. 5.1** MTT-Test mit Tubercidin und C<sub>2</sub>-Ceramide für verschiedene Zellkonzentrationen (5\*10<sup>6</sup> bzw. 2,5\*10<sup>6</sup> Zellen/ml)

Ab einer Dosis von 20µM wurde in einem schmalen Konzentrationsbereich bis 40µM eine starke Reduzierung der mitochondrialen Dehydrogenase Aktivität von 70% auf unter 10% beobachtet. Der EC<sub>50</sub>-Wert war von der Zelldichte unabhängig und lag bei ca. 25µM.

Aus der Steigung dieser Dosis-Wirkungskurven lassen sich erste Hinweise darauf ableiten, ob der Verminderung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität ein apoptotischer Prozess zugrunde liegt. Das ist dann der Fall, wenn die Steigung in einem engen Konzentrationsbereich sehr groß ist, was für beide Induktoren der Fall ist.

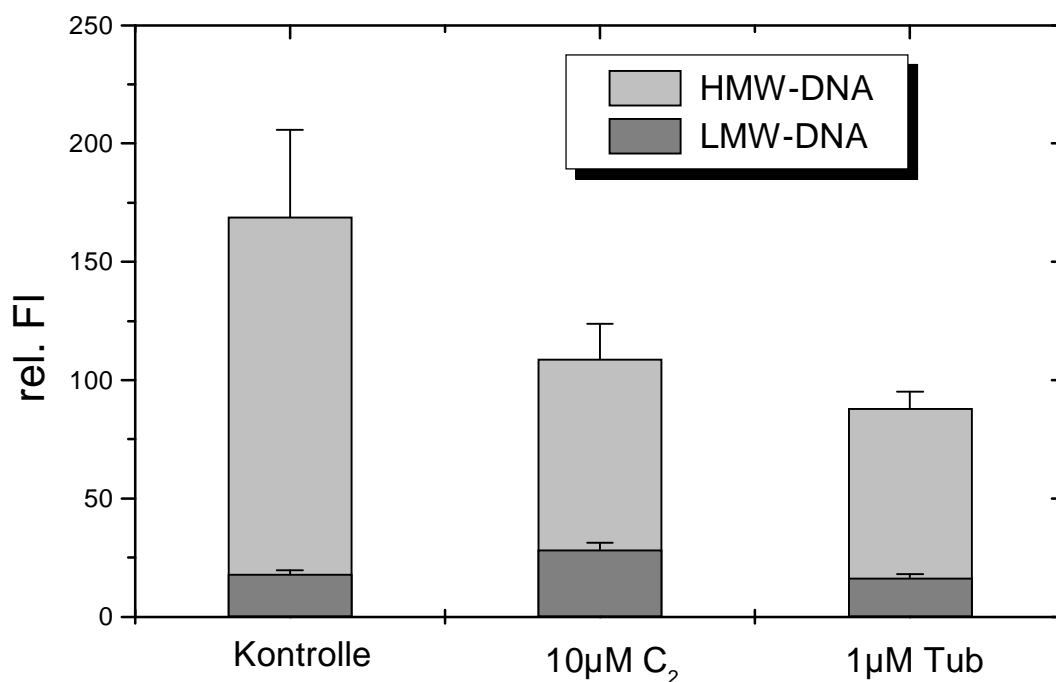
Außerdem konnte beobachtet werden, dass sich die Dosis-Wirkungskurven mit zunehmender Passagierung zu höheren Konzentrationsbereichen verschoben, was auf eine Resistenzbildung in den Zellen zurückzuführen ist. Dieser Effekt war aber bis zur 20. Passage vernachlässigbar.

## 5.2 Untersuchung der Apoptoseraten in EL4-Zellen

### 5.2.1 Nachweis von DNA-Fragmenten

Bei der Apoptose wird die DNA spezifisch in Oligonukleosomeneneinheiten gespalten. Diese kleinen DNA-Bruchstücke können aus dem Zellkern ins Zytoplasma gelangen. Im Kern bleiben die größeren DNA-Bruchstücke zurück. Durch Zentrifugation der Zellen wird die DNA in „high molecular weight“ (HMW)- und „low molecular weight“ (LMW)- DNA aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensität von DAPI ist proportional zur vorhandenen DNA-Menge und kann daher zur Analyse von DNA-Fragmenten und Proliferationsraten genutzt werden.

Nach Anfärbung der DNA-Bruchstücke mit DAPI wurde durch die Analyse der Fluoreszenzintensitäten aus dem Verhältnis LMW-DNA zu HMW-DNA Apoptoseraten bestimmt (Abb. 5.2 und 5.3).



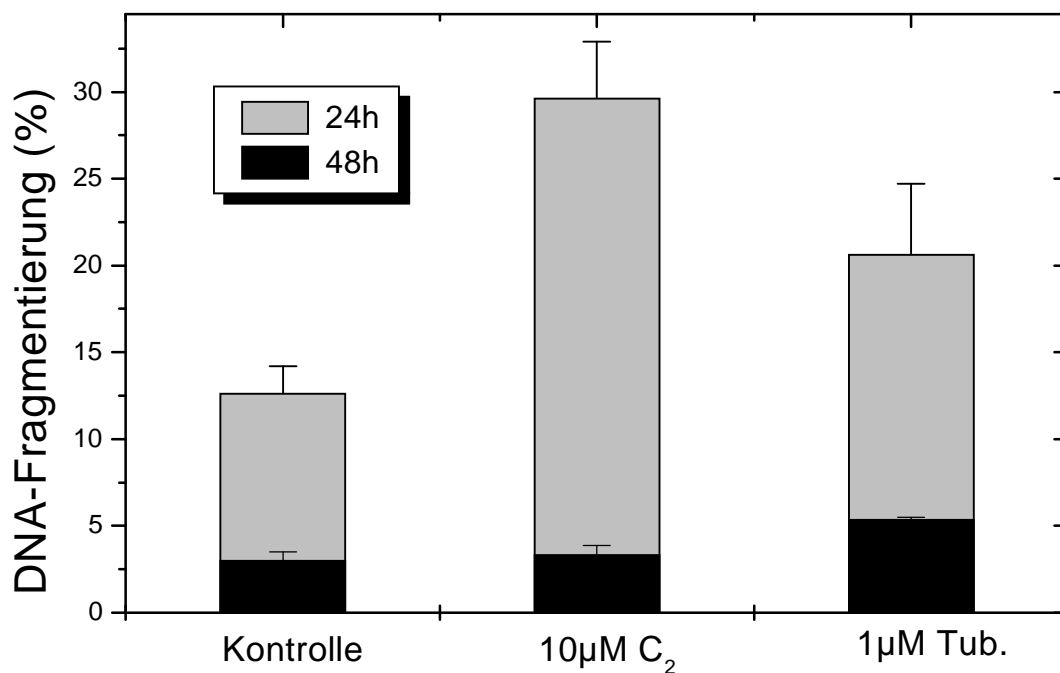
**Abb. 5.2** Fluoreszenzspektroskopische Analyse der DNA-Fragmente mit DAPI nach 24h Inkubation mit 10µM C<sub>2</sub>-Ceramiden und 1µM Tubercidin

In den induzierten EL4-Zellen wurde sowohl für C<sub>2</sub> als auch für Tub nach einer 24-stündigen Inkubation gegenüber der Kontrolle eine Verminderung des gesamten

DNA-Gehalts beobachtet. Im Fall der  $C_2$  betrug die Verringerung des gesamten DNA-Gehalts ca. 25%, während bei Tub behandelten Zellen sogar eine Verminderung des gesamten DNA-Gehalts um ca. 45% beobachtet wurde.

Setzt man die Fluoreszenzintensitätsdifferenzen der LMW-DNA mit der HMW-DNA ins Verhältnis und drückt es in Prozent aus, erhält man eine DNA-Fragmentierung, die auch als Apoptoserate interpretiert werden kann (Abb. 5.3).

Die höchste DNA-Fragmentierung (ca. 30%) wird für die 24 stündige Inkubationszeit mit  $10\mu M C_2$  beobachtet.  $1\mu M$  Tub liegt im Vergleich dazu bei ca. 22% DNA-Fragmentierung, während die Kontrolle bei ca. 13% lag. Die höhere DNA-Fragmentierung ist eine Folge apoptotischer Prozesse, bei denen sich der Anteil an HMW-DNA im Zellkern verringert, während gleichzeitig der Anteil an LMW-DNA Fragmenten ansteigt.



**Abb. 5.3** Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Apoptoseraten mit DAPI nach 24h bzw. 48h mit  $10\mu M C_2$  und  $1\mu M$  Tub

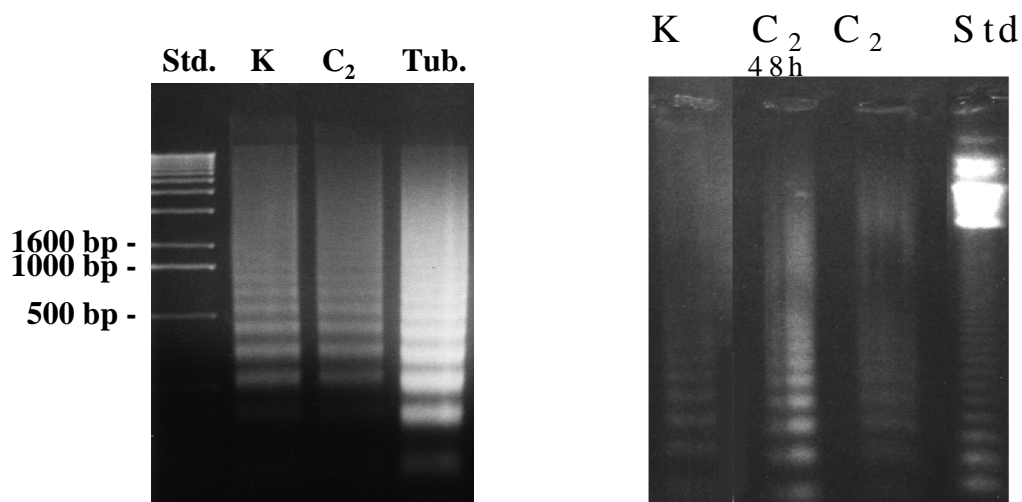
Niedrigere Apoptoseraten, die um 5% liegen, ergeben sich, wenn die Inkubationszeit auf 48h ausgedehnt wird. Zu diesem Zeitpunkt überwiegen die nekrotischen Prozesse, die zu keiner erhöhten DNA-Fragmentierung führen, da die nekrotischen Zel-

len lysieren und ihre DNA-Fragmente vor der Analyse durch die geschädigte Plasmamembran ins Medium gelangen können.

Der Nachweis einer DNA-Fragmentierung allein ist jedoch noch nicht ausreichend für den Beweis, dass es sich um apoptotische Prozesse handelt. Deshalb müssen die Ergebnisse noch durch den DNA-Ladder Test abgesichert werden.

### 5.2.2 DNA-Ladder

Im Agarosegel ließ sich ein DNA-Leitermuster nachweisen mit der DNA, die aus den EL4-Zellen isoliert wurde. Das DNA-Leitermuster und die Intensität der Anfärbung der DNA-Fragmente unterschied sich im Fall der 24h lang mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> behandelten Zellen nicht von den unbehandelten Zellen (Kontrolle). Die Zellen, die 24h lang mit 1 $\mu$ M Tub behandelt wurden, zeigten im Agarosegel eine intensivere Anfärbung und niedermolekulare DNA-Fragmente (Abb. 5.4). Eine qualitative Auswertung der Apoptoserate ist mit diesem Test aber nicht möglich.



**Abb. 5.4** DNA-Ladder Test nach 24h (links) mit Standarden (Std), Kontrolle (K), 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramiden (C<sub>2</sub>), 1 $\mu$ M Tubercidin (Tub) und 48h (rechts) Kontrolle (K), 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramiden (C<sub>2</sub>), 20 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramiden (C<sub>2</sub>), Standarden (Std)

Die apoptose-typischen DNA-Fragmente der Kontrolle wurden aus einer Zellpopulation gewonnen, die bis zu einer hohen Dichte von 2\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml kultiviert

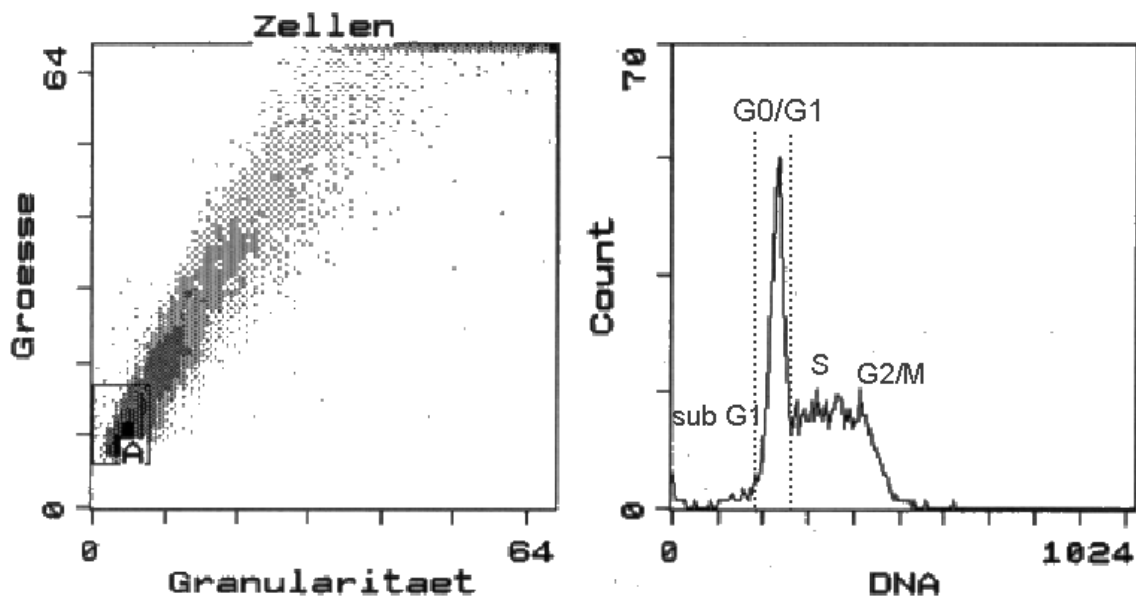
wurden. Das bedeutet, dass sich bei hohen Zelldichten die Effekte, die durch die „natürliche“ Apoptoserate hervorgerufen werden, mit denen, die durch die Induktoren hervorgerufen werden, überlagern. Die Zellen, die einer  $C_2$ -Konzentration von  $40\mu\text{M}$  ausgesetzt waren, bildeten kein DNA-Leitermuster mehr aus. Es zeigte sich nur noch eine Verschmierung im Gel. Das liefert einen Hinweis darauf, dass sich durch eine Erhöhung der  $C_2$ -Konzentration auf  $40\mu\text{M}$  die Apoptoserate nicht mehr steigern lässt, sondern dass zytotoxische Prozesse bei höheren  $C_2$ -Konzentrationen überwiegen. Nach 48h waren die DNA-Leitern der EL4-Zellen nicht mehr so intensiv gefärbt. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich in den Zellen, die mit  $10\mu\text{M}$   $C_2$  behandelt wurden aber noch eine stärkere DNA-Fragmentierung im Agarosegel nachweisen, als in den Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit  $20\mu\text{M}$   $C_2$  behandelt wurden. Dadurch wird deutlich, wie sensibel die optimalen Bedingungen für den Nachweis einer apoptosespezifischen DNA-Fragmentierung von der Induktorkonzentration, Inkubationszeit und der Zelldichte abhängen.

### 5.2.3 Flowcytometrische Analysen

Für eine genauere Quantifizierung der Apoptoseraten wurden flowcytometrische Analysen mit einem FACS-Gerät durchgeführt. Mit den Streulichtparametern „side scatter“ (Größe) und „forward scatter“ (Granularität) wurde das FACS-Gerät mit einer Kontrollzellpopulation kalibriert. Aus den „side scatter“ zu „forward scatter“ Diagramm wurde mit Hilfe des DNA-Markers Propidiumiodid der Bereich als DNA-Histogramm dargestellt, der einem DNA-Gehalt von  $2n-4n$  entspricht. Der Anteil der Ereignisse, die einem DNA-Gehalt entsprechen, der kleiner als  $2n$  ist und dem „sub- $G_1$  peak“ entsprechen, lag unter 5%. Diese Einstellung wurde bei allen Messungen beibehalten. In den so für das DNA-Histogramm ausgewählten Bereich fielen 50-60% aller 10000 registrierten Ereignisse einer Messung. Die Ereignisse, die einen DNA-Gehalt von über  $4n$  anzeigten, stammen von Zellklustern und werden im DNA-Histogramm nicht berücksichtigt. Mit einer im Gerät integrierten Software wurde der Anteil der ausgewählten Ereignisse bestimmt, die zum „sub- $G_1$  peak“ gehören und der  $G_0/G_1$  peak selbst. Da sich der  $G_2/M$ -peak in den Histogrammen nicht eindeutig von der S-Phase abtrennen ließ, wurde auf eine willkürliche Trennung dieser beiden Bereiche verzichtet (Abb. 5.5). Der Anteil der Zellen in der  $G_0/G_1$ -Phase lag in jedem DNA-

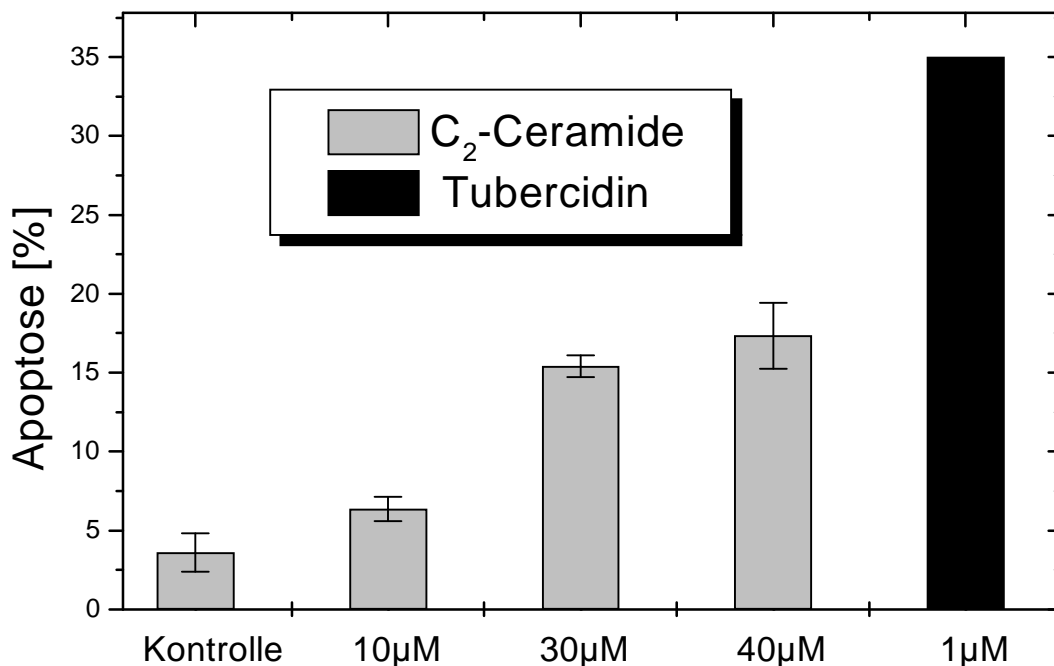
Histogramm bei ca. 30%. Das bedeutet, dass die Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase apoptoresistent sind und erst in die S-Phase eintreten müssen, um apoptotisch zu werden.

Die Analyse der FACS-Daten ergab, dass mit einer Erhöhung der C<sub>2</sub>-Konzentration von 10µM auf 40µM der apoptotische Anteil in den Zellpopulationen von 6-18% zunimmt. Der höchste „sub-G<sub>1</sub> peak“ wurde nach 24h für Tub gemessen und lag bei 38% (Abb. 5.6).



**Abb. 5.5** Flowcytometrische Analyse von EL4-Zellen mit Propidiumiodid: Streulichtparameter (links), DNA-Histogramm (rechts)

Kürzere Inkubationszeiten von 4h mit C<sub>2</sub> ergaben im FACS Apoptoseraten von 3%, die im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht waren. Mit Tub war zu diesem Zeitpunkt die Apoptoserate schon auf 6% angestiegen. Eine Verminderung der Serumkonzentration auf 5% in den Kulturmedien hatte auf die Apoptoseraten unter den Standardversuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluss.



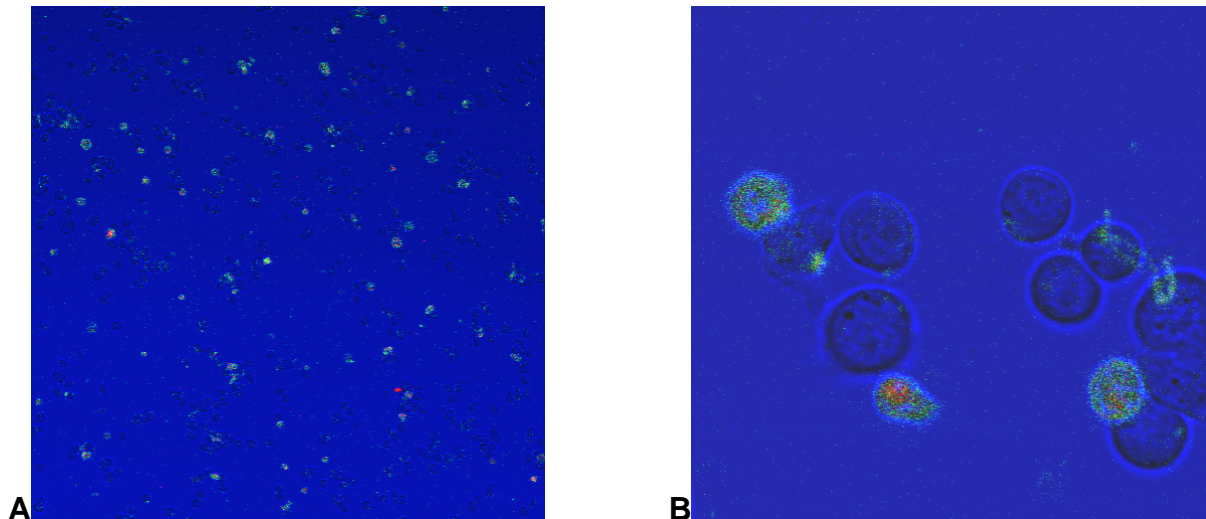
**Abb. 5.6** Flowcytometrische Analyse des sub-G<sub>1</sub> peaks des Propidiumiodid-Histogramms nach 24h mit unterschiedlichen C<sub>2</sub>-Konzentrationen (10µM, 30µM, 40µM) und 1µM Tubercidin

Ein großer Nachteil dieser flowcytometrischen Messmethode ist, dass apoptotische Zellen, die aus der S- und G<sub>2</sub>-Phase einen reduzierten DNA-Gehalt aufweisen, nicht zwangsläufig den DNA-Gehalt einer „sub-G<sub>1</sub> peak“ Population repräsentieren, was zu geringeren Apoptoseraten führt. Außerdem lassen sich nekrotische und apoptotische Zellpopulationen nicht unterscheiden.

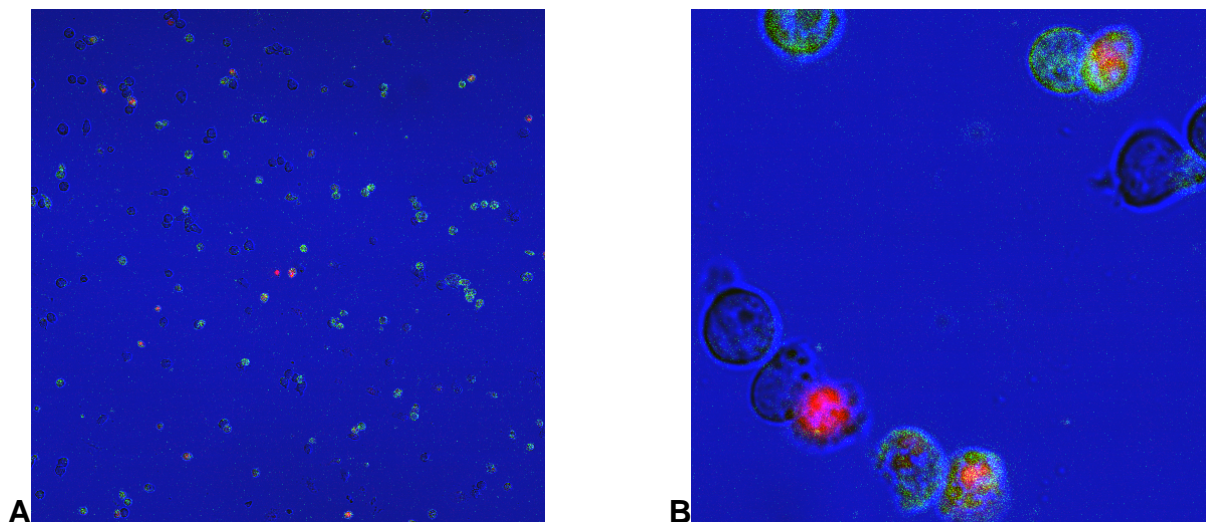
#### 5.2.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die EL4-Zellen wurden nach der Behandlung mit C<sub>2</sub> und Tub mit Annexin V-FITC/Pi markiert und mit Hilfe des Laserscanningmikroskops (LSM) untersucht. Annexin V-FITC (gelb) bindet spezifisch an PS, das in einer frühen Phase der Apoptose auf die Außenseite der Plasmamembran exponiert wird und somit apoptotische Zellen markiert. Gleichzeitig wurde der DNA-Marker Pi (rot) eingesetzt, um die Plasmamembranintegrität der Zellen zu überprüfen (Abb. 5.7, Abb. 5.8).





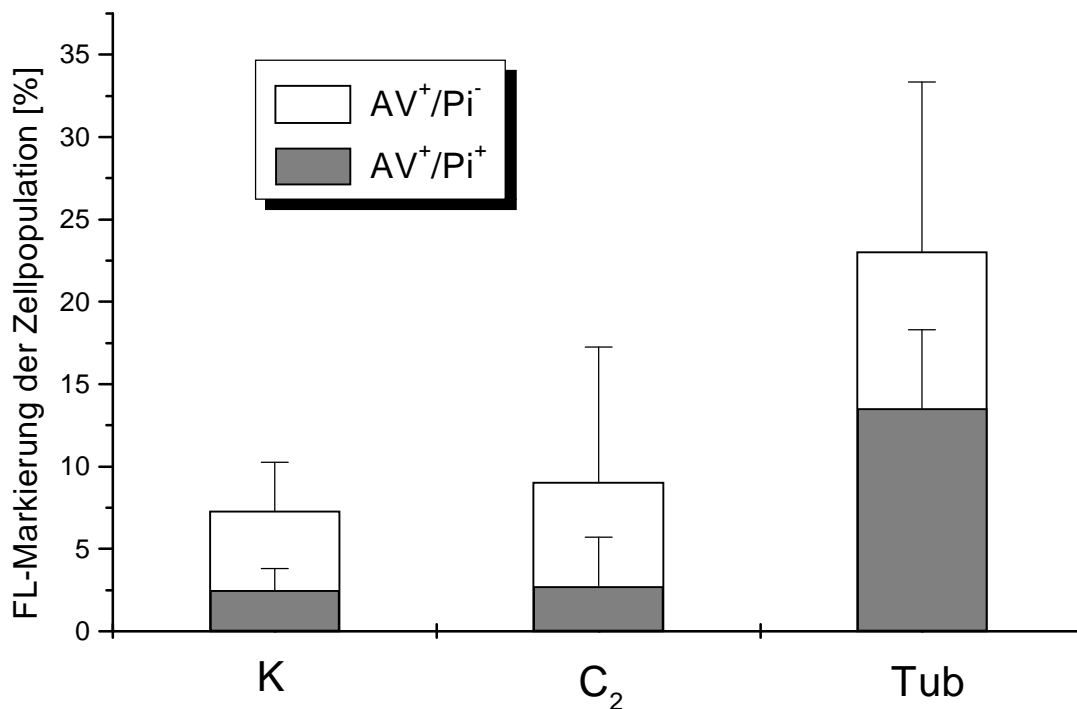
**Abb. 5.7** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer EL4-Zellpopulation mit Annexin V-FITC/Pi Markierung nach 24h Inkubation mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>, (A). Die Vergrößerung (B) zeigt eine schwache Pi Markierung in den geschrumpften Zellen



**Abb. 5.8** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer EL4-Zellpopulation mit Annexin V-FITC/Pi Markierung nach 24h Inkubation mit 1 $\mu$ M Tub (A). Die Vergrößerung (B) zeigt eine intensive Pi Färbung in den geschrumpften Zellen

In den Kulturen, die mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> inkubiert wurden, lag die AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup> Markierung bei ca. 10%. Diese Markierung entspricht einer früh apoptotischen Zellpopulation, die aber gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erhöht war. Die Kulturen hingegen, die mit 1 $\mu$ M Tub inkubiert wurden, hatten eine AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup> Markierung von ca. 27%. Der Anteil der Zellpopulation, der eine AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup> Markierung aufwies, lag bei

15%. Sowohl in den Kontrollzellen als auch in den mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> induzierten Zellen war diese Markierung mit 5% deutlich geringer (Abb. 5.9).



**Abb. 5.9** Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Annexin V-FITC/Pi gefärbter EL4-Zellen nach 24h Inkubation: Kontrolle (K), 10 $\mu$ M Ceramide (C<sub>2</sub>) und 1 $\mu$ M Tubercidin (Tub)

Zwischen den Kontrollzellen und den mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> induzierten Zellen wurde weder eine signifikante Zunahme der Aufhebung der PM-Asymmetrie noch eine Erhöhung der Plasmamembranpermeabilität nachgewiesen.

Bei den Experimenten fiel auf, dass sich die Kontrollzellen immer etwas schwieriger aus den Kulturflaschen gewinnen ließen als die mit einem Apoptoseinduktor behandelten Kulturen. Trennt man die Zellen einer Kulturflasche auf in eine Population, die im Überstand schwimmt, und in eine Zellenpopulation, die am Kulturflaschenboden klebt, findet man im Überstand einen höheren Anteil Annexin V-FITC markierter Zellen, während die quasi adhären Zellen zu einem geringeren Anteil mit Annexin V-FITC markiert waren. Untersucht man diese beiden Populationen mit Trypanblau, zeigen die am Boden haftenden Zellen einen geringeren Anteil nekrotischer Zellen (ca. 13%), der in einer dicht gewachsenen Zellkultur deutlich geringer war als in der aufschwimmenden Population, die eine Trypanblau-Anfärbung von 74% zeigte.

Da bekannt ist, dass bestimmte Lipide für die Adhärens von Zellen verantwortlich sind, könnte neben dem Verlust der PM-Integrität auch ein gestörter Lipid-metabolismus die Ursache für den Verlust der Adhärensfähigkeit und damit charakteristisch für apoptotische Zellen sein. Durch die Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membranen wurde dieser Frage nachgegangen.

### **5.3 Untersuchungen der Membranen von EL4-Zellen**

Bei der Gewinnung der Zellen für die PM-Isolation wurden die Zellen in großen Kulturflaschen ca. 100ml je Flasche herangezüchtet. 24h nach der Induktorzugabe (1 $\mu$ M Tub bzw. 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>) wurden die Zellen in PBS gewaschen, ausgezählt und ein Trypanblau-Test durchgeführt. Es wurden nur Zellkulturen für die Membranisolation verwendet, die eine Nekroserate von unter 20% aufwiesen. Danach wurden die Zellen bis zur weiteren Behandlung bei -80° C eingefroren (s. Material u. Methoden).

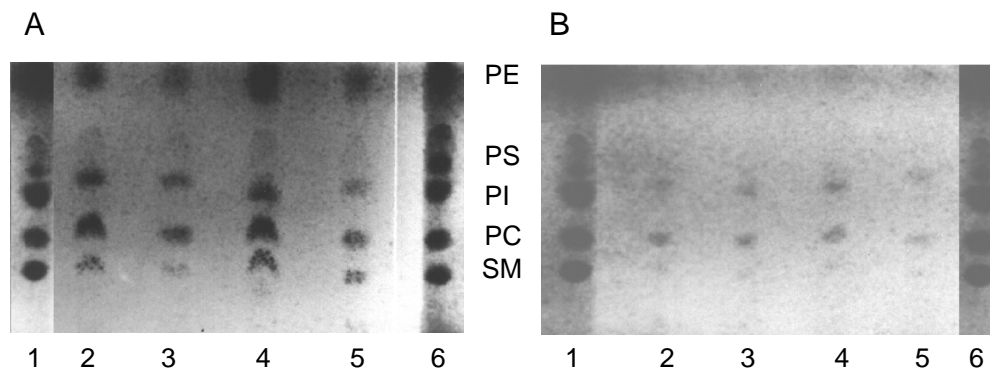
#### **5.3.1 Proteingehalt**

Die bei der PM-Isolierung gewonnenen Membranfraktionen wurden mit Hilfe ihres Proteingehaltes charakterisiert. Die Proteinbestimmung ergab, dass im Homogenat von 2,5\*10<sup>9</sup> Zellen etwa 200mg Proteine enthalten waren. Ca. 10% des Gesamtproteingehaltes ließen sich in der Mikrosomenfraktion nachweisen, während der Proteingehalt in der Plasmamembranfraktion mit 1-2mg nur noch 0,5-1% am Gesamtproteingehalt entsprach. Wenn nicht anders erwähnt, werden für die Experimente jeweils der gleiche Proteingehalt eingesetzt und die Ergebnisse auf mg Protein bezogen.

#### **5.3.2 Lipidzusammensetzung**

Die Lipidextrakte der isolierten PM wurden dünnschichtchromatografisch untersucht, um die Lipidveränderungen während der Apoptose nachzuweisen. Es konnten die

Hauptlipidkomponenten (PC, PE, PI, SM, PS) durch deutliche Abfärbung in allen Membranisolaten auf dem Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden (Abb. 5.10).



**Abb. 5.10:** Dünnschichtchromatogramme der Membranisolate A) Plasmamembranen, B) Mikrosomen<sup>3</sup> aus EL4-Zellen: Kontrollzellen (2,4); 1 $\mu$ M Tubercidin (3); 10 $\mu$ M C2-Ceramide (5) induzierte Zellen (24h) und Lipidstandards (1,6)

Die beiden Hauptmembranlipide PE und PC zeigen in allen Proben die intensivsten Abfärbungen und waren somit am häufigsten vertreten. Der Gesamtlipidgehalt pro mg Protein ist in den PM der induzierten Zellen aber deutlich geringer, was die insgesamt schwächere Abfärbung anzeigt bei gleicher eingesetzter Proteinmenge.

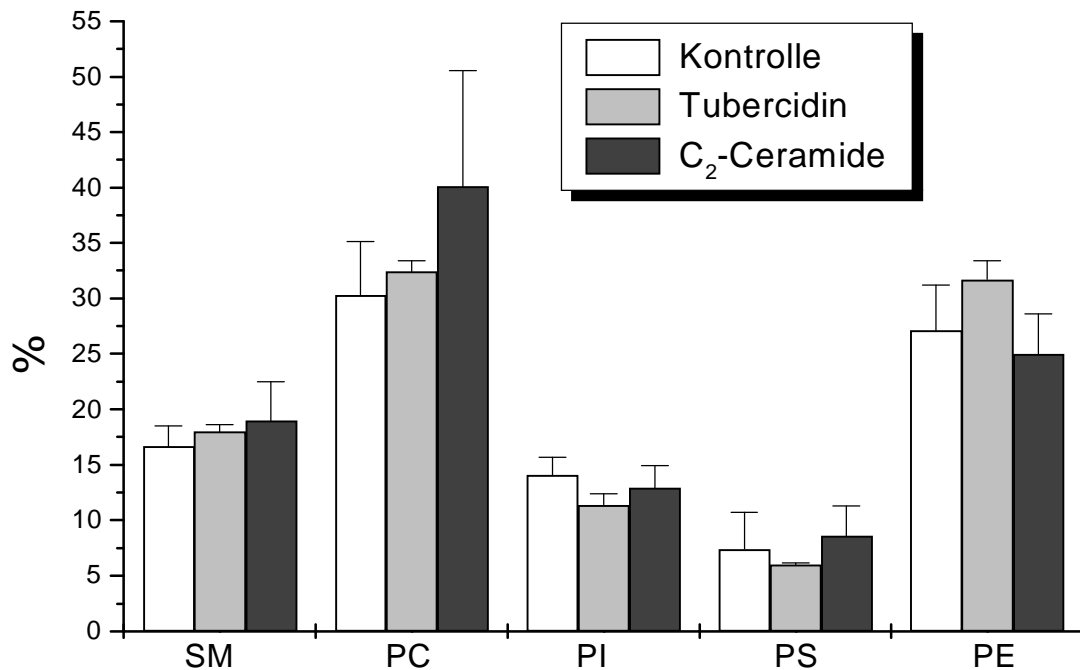
Das Dünnschichtchromatogramm der mikrosomalen Fraktion zeigt für alle Lipide deutlich schwächere Abfärbungen im Vergleich zum Dünnschichtchromatogramm der PM, obwohl eine zehn mal höhere Proteinkonzentration eingesetzt wurde.

Das bedeutet, dass das PL/Protein-Verhältnis in der PM-Fraktion über 10 mal größer war als in der Mikrosomenfraktion. In dieser Fraktion waren aber auch die Abfärbungen von PE und PC am intensivsten, die den Hauptanteil am Gesamtlipidgehalt ausmachen.

Densitometrische Auswertungen von Dünnschichtchromatogrammen sind nicht sehr genau, da durch den Sprayprozess für die Abfärbung der Lipide sich der Chromatogramm hintergrund nicht gleichmäßig verfärbt. Zur Quantifizierung des Lipidgehaltes in den Membranfraktionen wurden von Dr. S. Tichonowa colorimetrische Untersuchungen des Phosphors an den Lipiden durchgeführt, sowie eine gaschromatografische Bestimmung von Cholesterin.

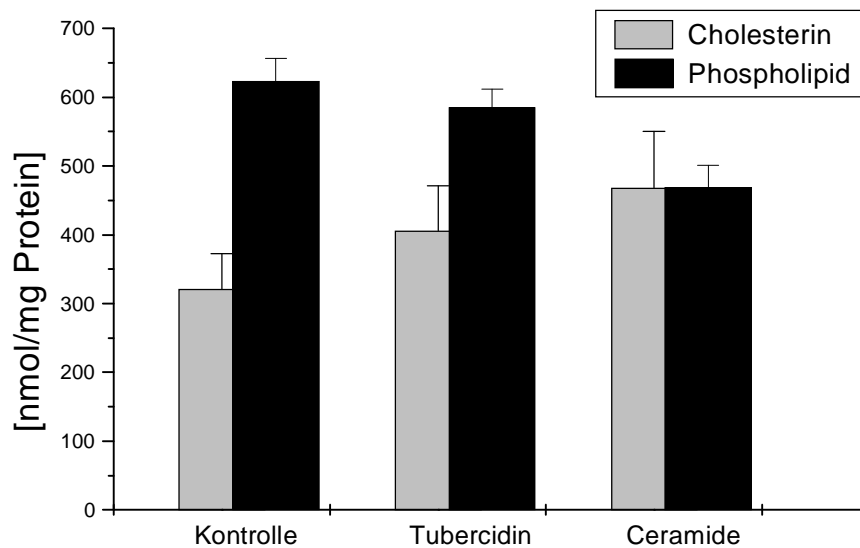
Die spektrometrische Bestimmung des Phosphors der dünnschichtchromatografisch aufgetrennten Lipide aus den Plasmamembranen ergab, dass sich das Phospho-

lipidspektrum und der SM-Gehalt in den behandelten Zellen nicht signifikant von der Kontrolle unterscheiden. Die prozentuale Verteilung vom Gesamtlipidgehalt ist in Abbildung 5.11 dargestellt. Der PC Gehalt liegt bei 30%, dicht gefolgt vom PE Gehalt. Danach ist mit ca. 15% SM das am dritthäufigsten auftretende Lipid gefolgt von PI. Der Gehalt von PS ist mit unter 10% am niedrigsten.



**Abb. 5.11** Prozentuale Verteilung der Phospholipide (PC, PI, PS, PE) und Sphingomyelin (SM) in der PM von EL4-Zellen nach 24h Inkubation mit 1µM Tub, 10µM C<sub>2</sub> und unbehandelten Zellen (Kontrolle)

Die Gesamtmenge der Phospholipide auf den Proteingehalt bezogen nimmt in den PM der behandelten Zellen ab und ist für die mit C<sub>2</sub> behandelten Zellen am geringsten (Abb. 5.12). Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung des Cholesteringehalts, so dass das Chol/PL-Verhältnis in den mit C<sub>2</sub> behandelten Zellen mit 1/1 am größten ist. Im Vergleich zur Kontrolle steigt die Cholesterinkonzentration um ca. die Hälfte an. In den mit Tubercidin behandelten Zellen ist dieser Anstieg mit ca. 25% nicht ganz so groß. Es ergibt sich ein Chol/PL-Verhältnis von ca. 2/3. In der Kontrolle mit dem niedrigsten Cholesteringehalt und dem größten PL-Gehalt liegt das Chol/PL-Verhältnis bei ca. 1/2 (Abb. 5.12).



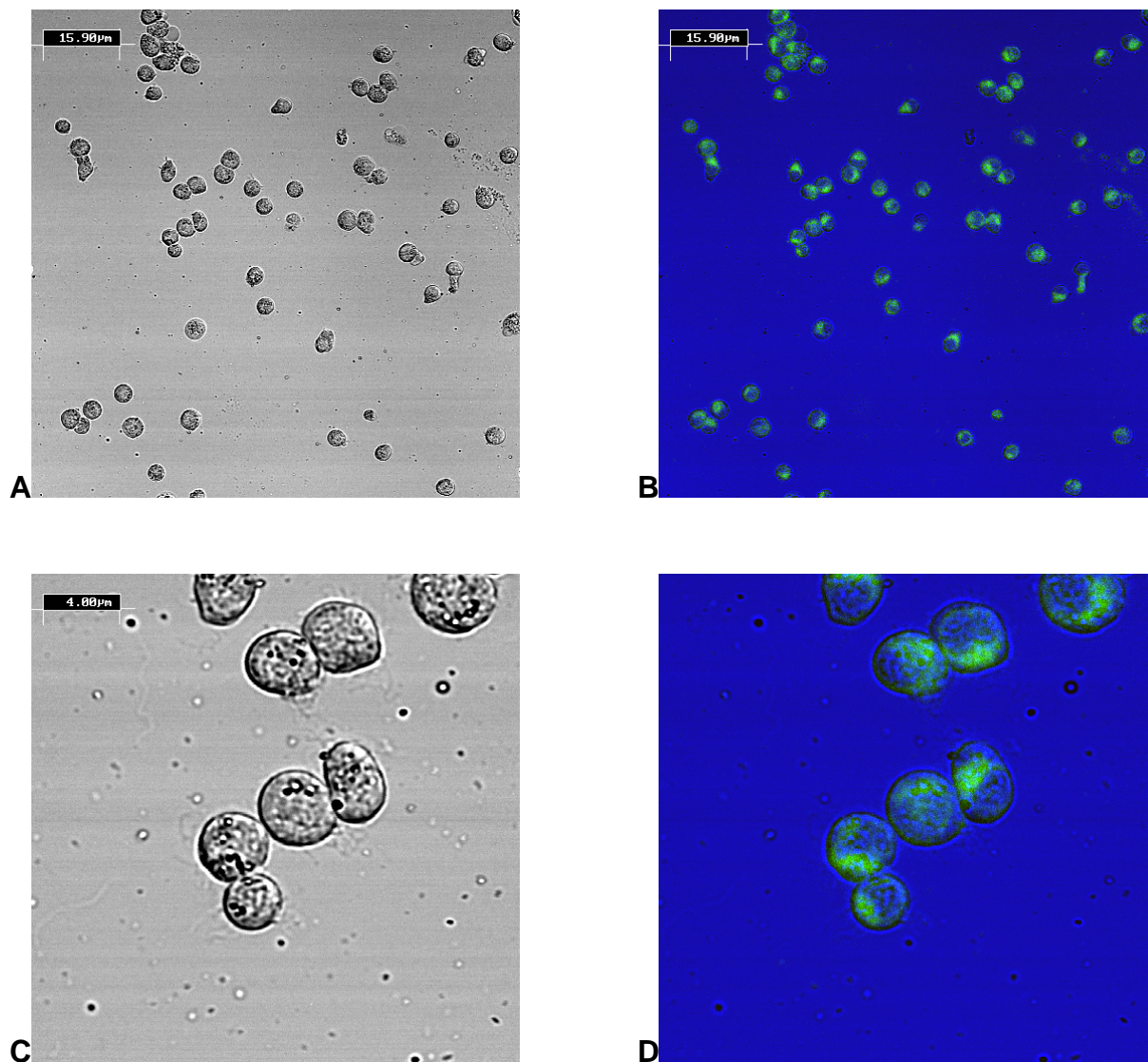
**Abb. 5.12** Phospholipid- und Cholesteringehalt der PM der EL4-Zellen nach 24h Inkubation mit  $1\mu\text{M}$  Tub,  $10\mu\text{M}$   $\text{C}_2$  und unbehandelten Zellen (Kontrolle)

Für eine genauere Analyse der Phospholipiden wäre der Einsatz eines massenspektrometrischen Verfahrens nötig gewesen, insbesondere um auch den Ceramid-Gehalt in den EL4-Zellen bestimmen zu können (Watts et al., 1999). Ein Quadrupol-Elektronenspray-Massenspektrometer (Tandem-Ionenspray-MS) ist für eine qualitative Auswertung der Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen am besten geeignet, weil diese Geräte Probenmengen im pg-Bereich noch nachweisen können (Mano et al., 1997). Leider konnte kein Kooperationspartner für diese Analysen gewonnen werden. Daher können die Ergebnisse von der Lipidanalyse der Membranen nur quantitativ dargestellt werden.

### 5.3.3 Lipidmetabolismus

Mit Hilfe des fluoreszierenden Ceramidanalogs (NBD- $\text{C}_6$ ) wurden die Lokalisation und die metabolischen Komponenten des SM-Kreislaufes untersucht.

Mit dem LSM wurde fluoreszenzmikroskopisch die Lokalisation des Farbstoffes begutachtet. Es wurde festgestellt, dass zwar alle Zellen den Farbstoff aufnehmen, dass er sich aber in den Zellen unterschiedlich stark konzentriert. Diese Konzentrierung findet in den kernnahen Zellorganellen (Golgi-Apparat, ER) schon nach kurzer Inkubationszeit (10min) statt (Abb. 5.13).

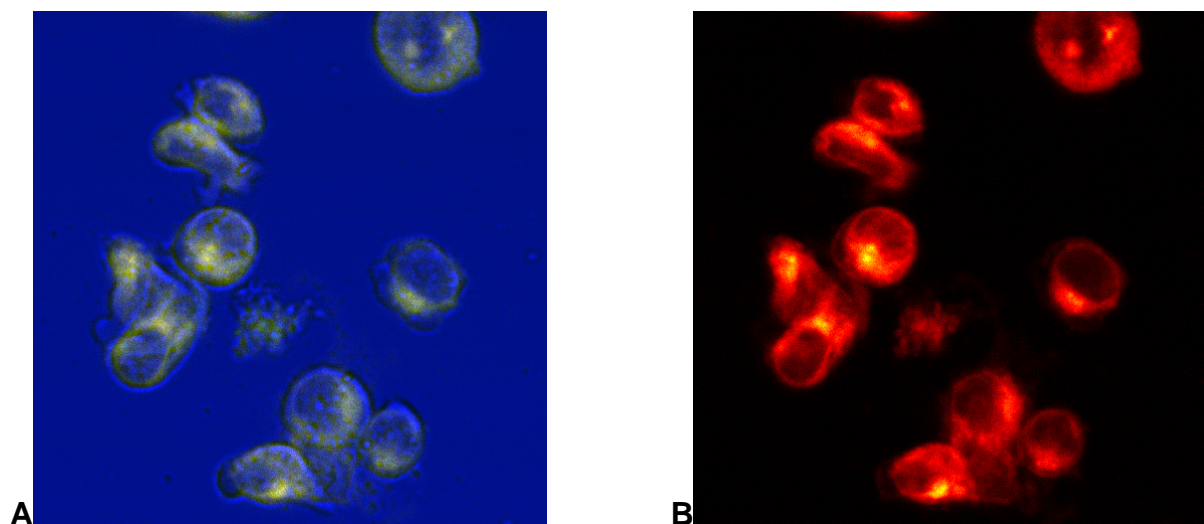


**Abb. 5.13** EL4-Zellpopulation mit NBD- $C_6$  Markierung an den peripheren nuklearen Bereichen A) Durchlichtbild, B) Durchlichtbild und überlagertes Fluoreszenzbild in Falschfarbendarstellung, C und D) ausgewählte Ausschnittsvergrößerung von A bzw. B

Der Golgi-Apparat und das ER sind die Bereiche der Zellen, wo die Lipidsynthese stattfindet. Speziell im Golgi-Apparat werden komplexere Lipide wie die Glycolipide synthetisiert, die sich in der extrazellulären Seite der PM anreichern. Der Transport dieser Lipide ist hauptsächlich vesikulärer Natur. Selbst nach längeren Inkubationszeiten (3h) konnte keine vollständige Lokalisation der fluoreszierenden Lipide auf der PM beobachtet werden. Dadurch wird deutlich, dass die Ceramide und ihre Metaboliten in EL4-Zellen Aufgaben erfüllen, die sich innerhalb der Zelle abspielen.

Die Farbstoffkonzentration in den Zellen scheint von der Morphologie abzuhängen. Es bilden sich lokal stärkere Fluoreszenzintensitäten in den Zellen aus, die zu schrumpfen beginnen und Ausstülpungen gebildet haben (Abb. 5.14). Das wird besonders deutlich, bei der Betrachtung des Fluoreszenzbildes ohne Überlagerung des Durchlichtbildes.

Die Ursache könnte ein gestörter vesikulärer Lipidtransport sein, der bei der morphologischen Veränderung der Zelle inhibiert sein könnte. Da NBD-C<sub>6</sub> eine hohe Affinität für cholesterinreiche Regionen aufweist, könnte außerdem eine Akkumulierung von Cholesterin in den morphologisch gestörten Zellen der Grund für diese Beobachtung sein. Zur eindeutigen Klärung dieses Phänomens sind systematischere biochemische Untersuchungen, unter anderem mit spezifischen Lipidtransportinhibitoren, nötig.



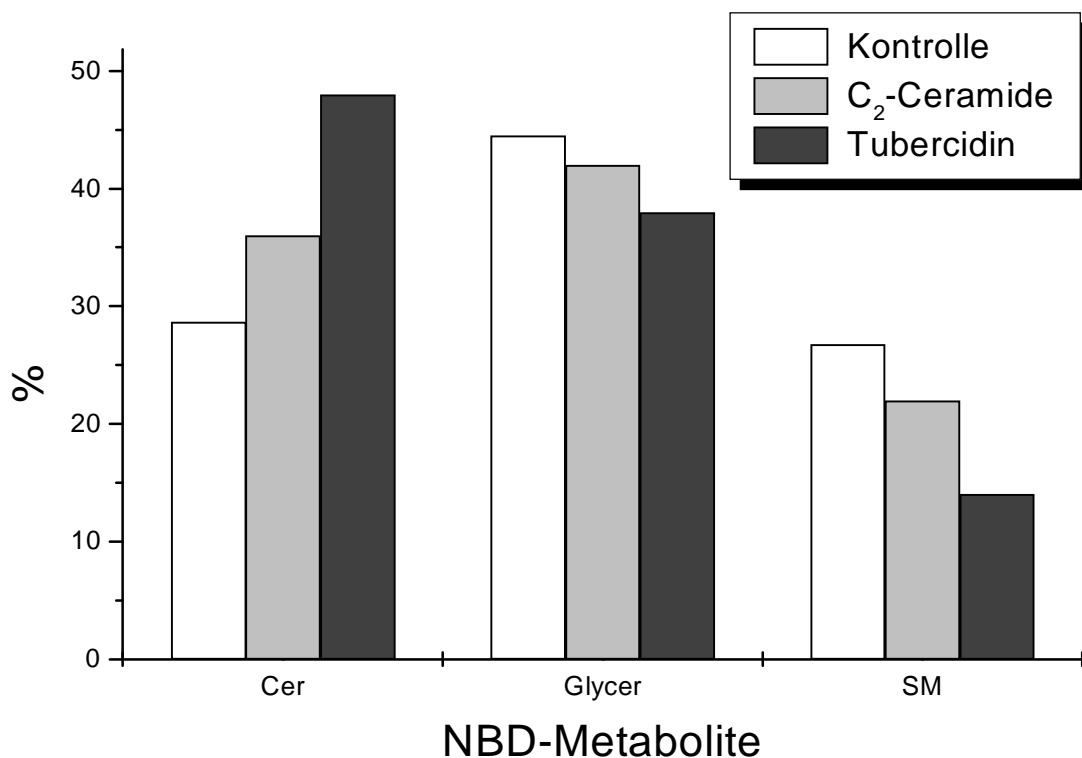
**Abb. 5.14** EL4-Zellpopulation mit NBD-C<sub>6</sub> Markierung nach 10min A) Durchlichtbild + Fluoreszenzbild, B) Fluoreszenzbild

Sind Zellen in einem schlechten Zustand, kommt es außerdem zu einer Inhibition der Lipidbiosynthese. Mit Hilfe einer fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung von NBD-C<sub>6</sub> in seine Metabolite in apoptotischen Zellen inhibiert war. Dazu wurden die Lipide aus  $2,5 \cdot 10^7$  Zellen isoliert und mit Hilfe eines Dünnschichtchromatogramms aufgetrennt. Das NBD-C<sub>6</sub> Ceramid läuft dicht hinter der Lösungsmittelfront. Aufgrund der gelben Abfärbung vom NBD-Farbstoff waren auf dem Chromatogramm sowohl im Lipidextrakt der Kontrollzellen als auch bei den induzierten Zellen jeweils deutlich zwei weitere Flecken zu erkennen. Durch den Vergleich der relativen RF-Werte mit Literaturwerten (M. Obradors et al.,



1997) konnte die schnellere Komponente (RF=0,7) als Glycosylceramide (NBD-GlyCer) und die langsamere Komponente (RF=0,2) als Sphingomyelin (NBD-SM) identifiziert werden.

Die fluoreszenzspektroskopische Auswertung der aus dem TLC herausgelösten NBD-Ceramidmetabolite ergab, dass NBD-C<sub>6</sub> hauptsächlich in NBD-GlyCer metabolisiert wird. Ihr Anteil lag in den untersuchten Lipidextrakten bei ca. 40%. Der prozentuale Anteil von NBD-SM an den NBD-Metaboliten war in allen untersuchten Lipidextrakten am geringsten (Abb. 5.15).



**Abb. 5.15** Prozentuale Verteilung der Ceramidmetabolite (NBD-Cer, NBD-Glycer und NBD-SM) in EL4-Zellen bei verschiedenen Kulturbedingungen (24h mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramide, 1 $\mu$ M Tubercidin und einer Kontrolle)

Die metabolische Aktivität der Zellen ist um so größer, je mehr NBD-C<sub>6</sub> umgewandelt wird. Die Fähigkeit NBD-C<sub>6</sub> in seine Metabolite NBD-Glycer und NBD-SM umzuwandeln ist abhängig den Kulturbedingungen. In den Kontrollzellen wird NBD-C<sub>6</sub> zu über 70% metabolisiert, in den mit C<sub>2</sub>-Ceramiden behandelten Zellkulturen noch zu ca. 65%, während in den mit Tub behandelten Zellen die Metabolisierungsrate sogar auf 52% absinkt (Abb. 5.15).

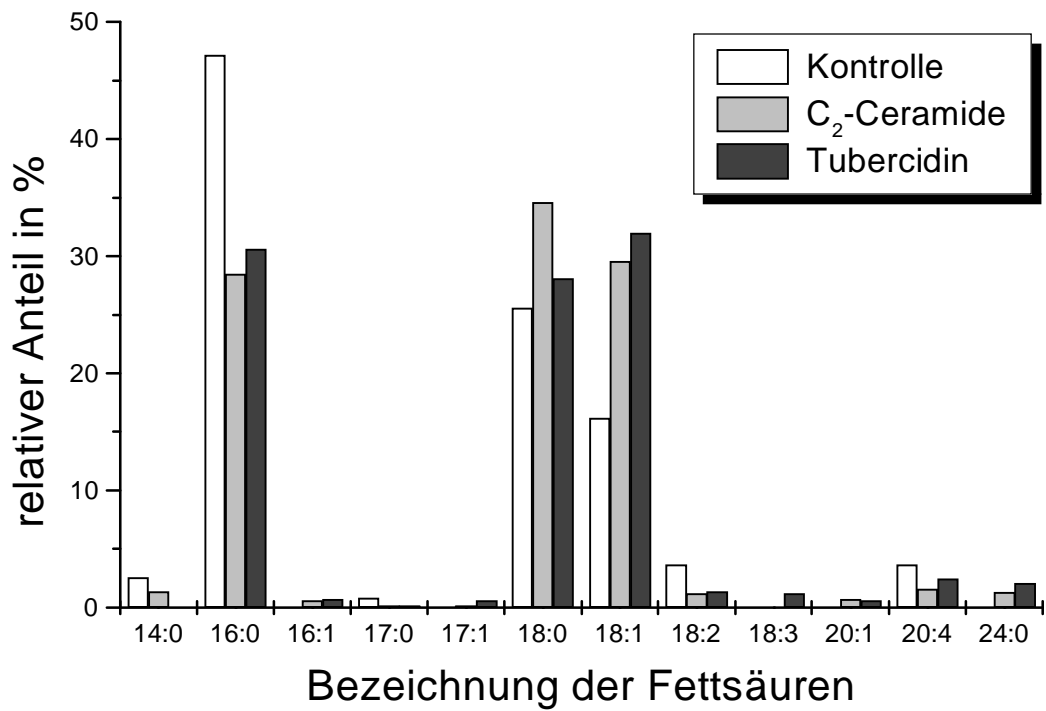
Der Rückgang der Metabolisierungsrate führt zu einer Verminderung von NBD-Glycer und NBD-SM, wobei sich die Inhibierung des Ceramidmetabolismus deutlicher auf NBD-SM auswirkt. In den mit Tubercidin behandelten Zellen halbiert sich im Vergleich zur Kontrolle der Anteil an NBD-SM.

#### **5.3.4 Fettsäuremuster**

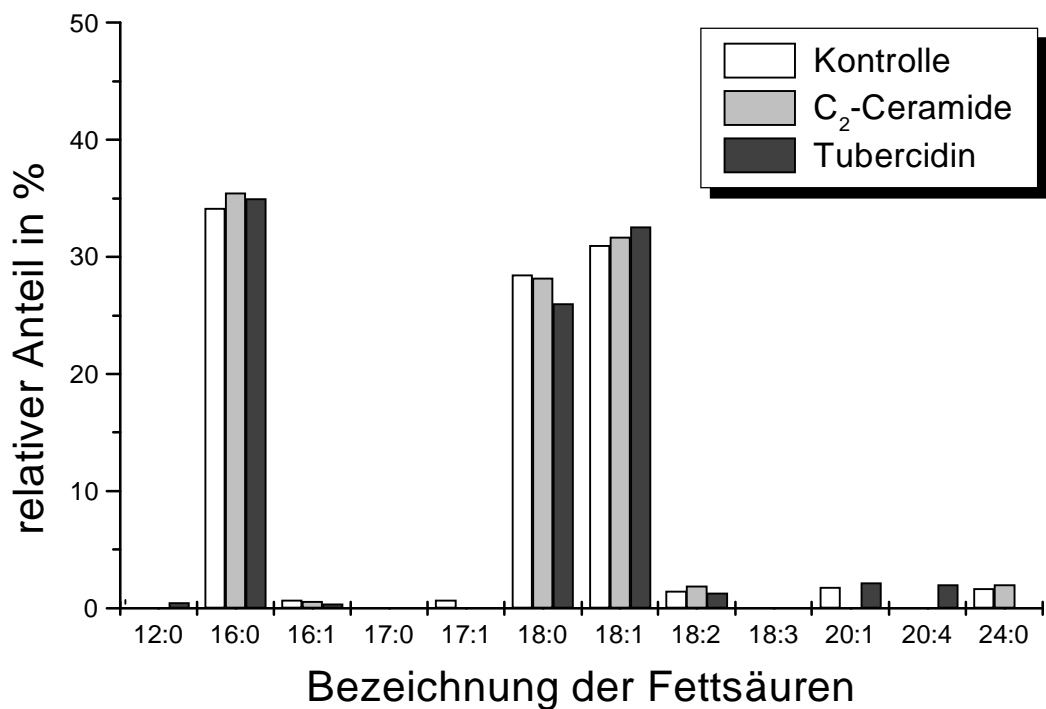
Die Bestimmung der Fettsäureverteilung wurde an den isolierten PM und den Mikrosomen gaschromatografisch am Honigforschungsinstitut in Bremen untersucht. Dort wurden die einzelnen Fettsäuren auf Grund ihrer Retentionszeiten den definierten Standards zugeordnet. Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt in den Proben bezogen und sind im einzelnen in den Tabelle 5.1 und 5.3 im Anhang dargestellt. Für die Fettsäureanalyse mussten die Proben zuvor hydrolysiert, methyliert und die methylierten Fettsäuren extrahiert werden. Der absolute Fettsäuregehalt nach dieser Analyse zwischen zwei unabhängigen Membranpräparationen schwankte um 25%. Es zeichnete sich aber ein deutlicher Trend ab, dass das FS/Proteinverhältnis in den behandelten Zellen ca. 6 mal höher war. Zwischen den einzelnen Membranfraktionen der Kontrollzellen war das FS/Proteinverhältnis der PM etwa doppelt so hoch wie in den Mikrosomen. Der Fehler bei der prozentualen Fettsäureverteilung zwischen zwei unabhängigen Membranpräparationen lag für die Hauptfettsäuren bei 5%. Es ist daher sinnvoll, die Zu- bzw. Abnahme einzelner Fettsäuren relativ zueinander in den Isolaten zu erfassen (Abb. 5.16 und Abb. 5.17).

Die Fettsäurezusammensetzung der PM der Kontrollzellen unterscheidet sich von den behandelten Zellen (Abb. 5.16). In der Kontrolle ist Fettsäure C16:0 mit 47% am häufigsten vertreten, gefolgt von C18:0 mit 26% und C18:1 mit 16%. Bei den behandelten Zellen nimmt der Anteil der längerkettigen Fettsäuren zu. Der C18:1 Gehalt wurde für beide Induktoren auf ca. 30% verdoppelt und lag damit in dem Bereich der beiden anderen Hauptfettsäuren (C16:0 und C18:0).

Im Fall der Mikrosomen ändert sich unter dem Einfluss von Ceramiden und Tubercidin das Fettsäurespektrum nicht (Abb. 5.17). Die drei Hauptfettsäuren C16:0, C18:0 und C18:1 sind jeweils zu ca. 30% vertreten.



**Abb. 5.16** Einfluss von C<sub>2</sub>-Ceramiden und Tubercidin auf die prozentuale Verteilung der Fettsäuren in den PM von EL4-Zellen

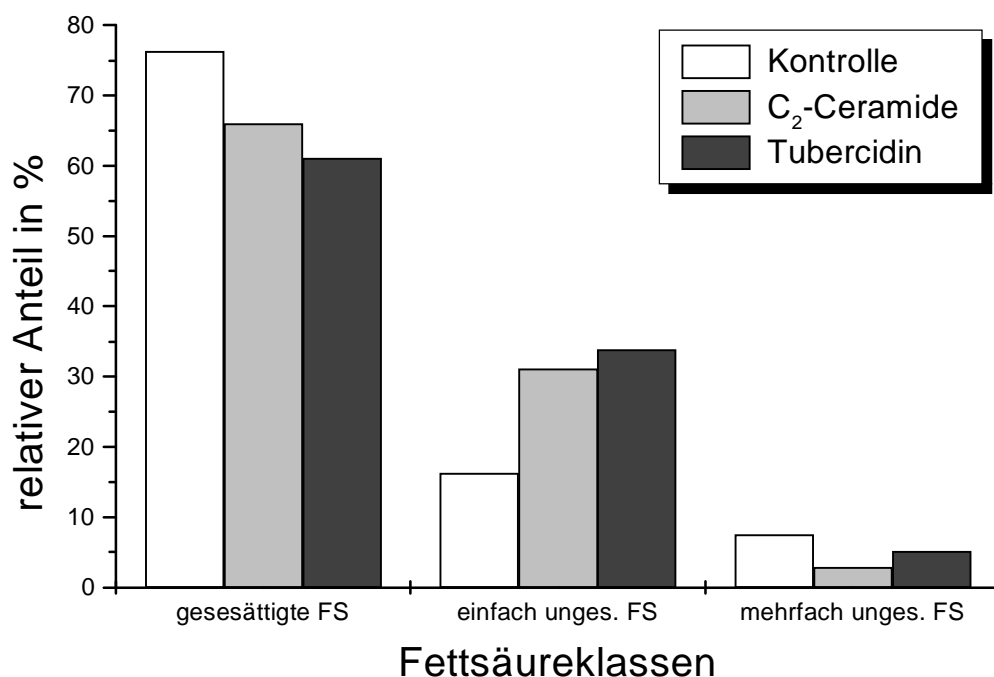


**Abb. 5.17** Einfluss von C<sub>2</sub>-Ceramiden und Tubercidin auf die prozentuale Verteilung der Fettsäuren in den Mikrosomen von EL4-Zellen

Lediglich am unteren Rand der Nachweisgrenze gibt es kleiner Abweichungen in der Fettsäurekomposition. Um deren Signifikanz jedoch besser beurteilen zu können, wären der Einsatz größerer Probenmengen erforderlich gewesen.

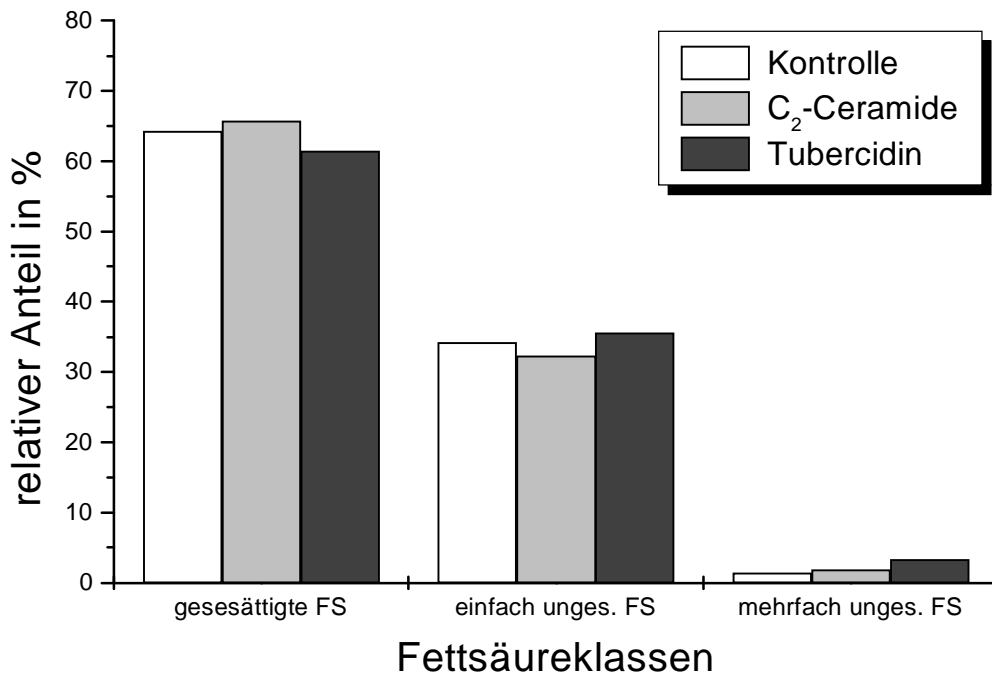
Die identifizierten Fettsäuren in den Membranisolaten wurden in 3 Fettsäureklassen eingeteilt: gesättigte Fettsäuren, einfach ungesättigte Fettsäuren und mehrfach ungesättigte Fettsäuren. In Abbildung 5.18 und 5.19 ist ihre prozentuale Verteilung bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der PM und der Mikrosomen dargestellt.

Die PM der Kontrollzellen enthält mit 76% den höchsten Anteil an gesättigten Fettsäuren, während die behandelten Zellen nur einen Anteil von ca. 65% aufweisen. Der Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren in der Kontrolle liegt bei 16% und damit deutlich unter dem Anteil von 30%, den die behandelten Zellen aufweisen. Der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren liegt in allen Proben unter 8%.



**Abb. 5.18** Verteilung der in Klassen eingeteilten Fettsäuren (FS) aus den PM der EL4-Zellen

Die Einteilung in die Fettsäureklassen ergibt für die Isolate der Mikrosomen ein einheitliches Bild mit einem doppelt so hohem Anteil an gesättigten Fettsäuren (ca. 60%) im Vergleich zu den einfach ungesättigten Fettsäuren (ca. 30%). Der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren liegt in den Mikrosomen ebenfalls unter 10%.



**Abb. 5.19** Verteilung der in Klassen eingeteilten Fettsäuren (FS) aus den Mikrosomen der EL4-Zellen

### 5.3.5 Membranfluidität

Einige Membranrezeptoren und membranassoziierte Moleküle (z. B. Interleukine), die das Überleben der Zellen sichern, sind in ihrer Funktionalität stark von den Lipiden in ihrer näheren Umgebung abhängig. Dabei wird dem physikalischen Zustand (oder auch Ordnungsparameter) der Membran eine besondere Bedeutung zugemessen. Daher wird und wurde mit besonderem Interesse daran gearbeitet, den Einfluss der Lipidkomposition auf den physikalischen Zustand der Membran zu untersuchen, um z.B. die PM als biophysikalischen Sensor für bestimmte physiologische Prozesse zu benutzen. Für die Untersuchung des physikalischen Zustandes der Membran eignen sich besonders gut fluoreszenzspektroskopische Methoden. Von dem Verhalten der Fluorophore schließt man dann auf seine Umgebungsbedingungen.

Bei der Untersuchung der Apoptose in EL4-Zellen konnte die Exposition von PS auf die äußere Seite des Bilayers der PM mit einer Zunahme der Membranfluidität korreliert werden (R. Jessel, 1999).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Umstrukturierung der PM bei apoptotischen Prozessen auch auf den Ordnungszustand im Kopfgruppenbereich direkt an der hydrophilen-hydrophoben Grenzschicht der Membran auswirkt. Mit der Fluoreszenzsonde Laurdan lässt sich die dynamische Organisation (Dipolrelaxationseigenschaften) von Wassermolekülen, die an der wässrigen Grenzschicht lokalisiert sind, untersuchen.

Die Dipolrelaxationseigenschaften von Wasser können in reinen Modellmembransystemen gut mit den physikalischen Phasenzuständen der Lipide korreliert werden. Die aus den Laurdanspektren gewonnenen generalisierten Polarisationswerte werden deshalb auch als Fluiditätsparameter interpretiert.

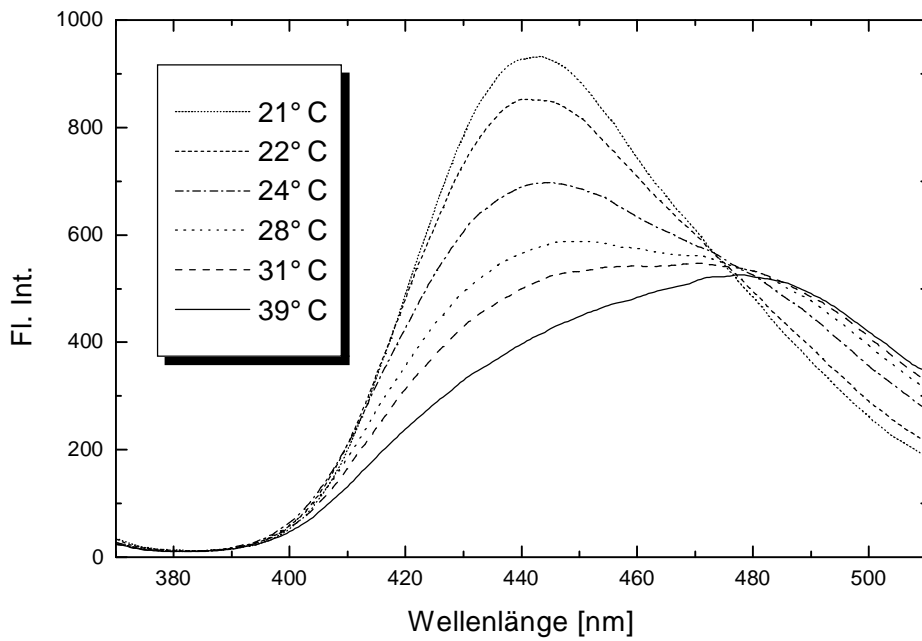
Als Referenz für die natürlichen Membranen dienten DMPC-Liposomen, ein Modellmembransystem, das schon gut definiert ist. Mit unterschiedlichen Membranmodellsystemen und mit verschiedenen Methoden wurde nachgewiesen, dass DMPC einen Phasenübergang von der gel Phase in die flüssig-kristalline Phase bei einer Phasenübergangstemperatur von 23° C besitzt. An den mit dem Extruder hergestellten Liposomen konnte mit Laurdan ebenfalls diese Phasenübergangstemperatur nachgewiesen werden, so dass diese DMPC-Liposomen mit den aus den Laurdanspektren ermittelten GP-Werten als Referenz zur Beurteilung des Phasenzustandes der natürlichen Membranen benutzt wurden.

Laurdan wurde bei 360nm angeregt und die Emissionsspektren in einem Temperaturbereich von 21-39° C aufgenommen (Abb. 5.17). Mit steigender Temperatur ist eine deutliche Rotverschiebung in den Emissionsspektren zu beobachten, was auf eine durch die Temperatur erhöhte Dipolrelaxation der Wassermoleküle in der Laurdanumgebung zurückzuführen ist.

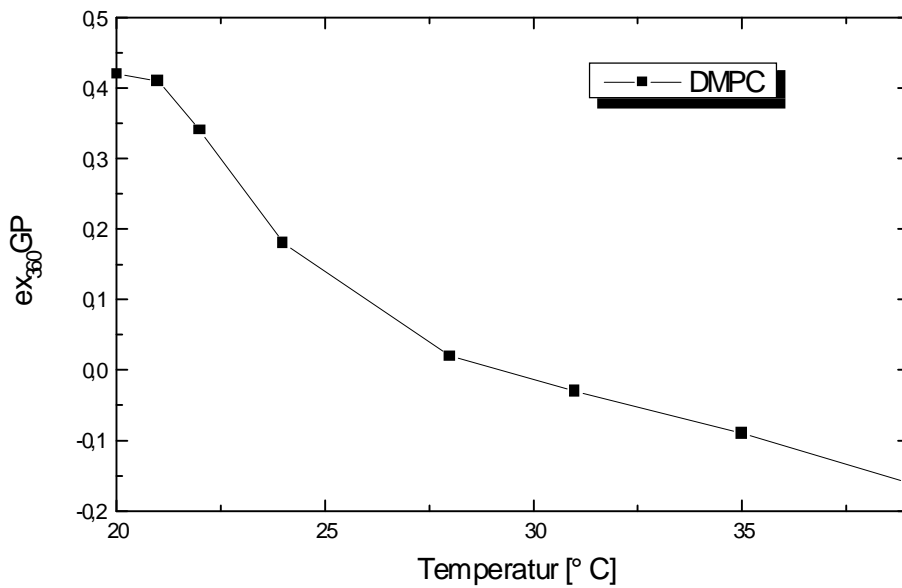
Die aus den Intensitätsmaxima, bei 434nm für die gel Phase und bei 490nm für die flüssig-kristalline Phase, der beiden Phasenzuständen berechneten  $em_{360}GP$ -Werte, wurden in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt (Abb. 5.18).

Die ermittelten  $ex_{360}GP$ -Werte betragen  $-0,16$  in der flüssig-kristallinen Phase bei 39° C und in der gel Phase  $0,42$  bei 20° C. Der Phasenübergangsbereich wird durch das Maximum der Steigung charakterisiert und lag im Bereich um 23° C. Diese

Ergebnisse decken sich mit denen, die mit Laurdan an DMPC-LUVs bestimmt wurden (Antollini et al. 1996).

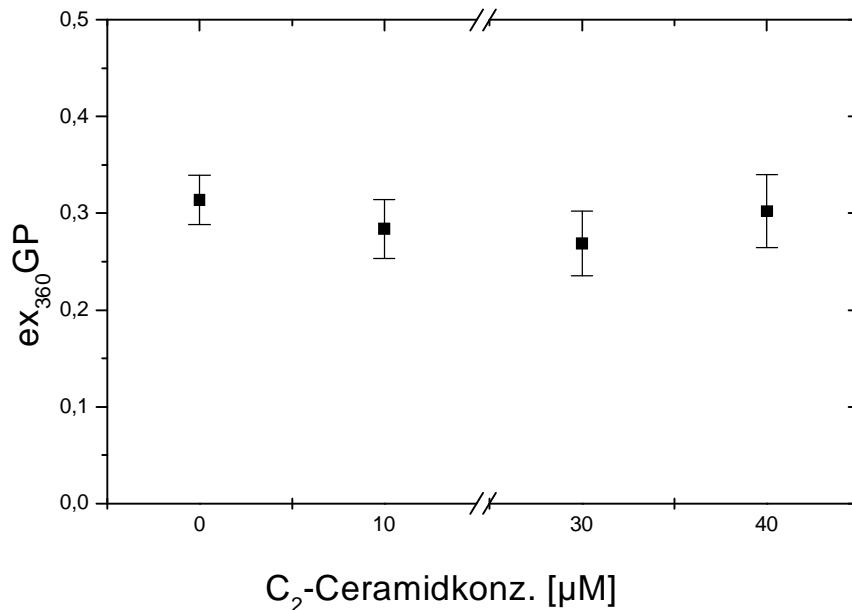


**Abb. 5.17** Emissionsspektren von Laurdan in DMPC-Liposomen in Abhängigkeit von der Temperatur



**Abb. 5.18** ex<sub>360</sub>GP-Werte in Abhängigkeit von der Temperatur in DMPC-Liposomen

Für die Beurteilung des physikalischen Zustandes der isolierten Membranen und den Membranen der ganzen Zellen wurden deshalb die  $ex_{360}GP$ -Werte herangezogen. Mit Laurdan wurde zunächst die Membranfluidität an intakten EL4-Zellen untersucht, die 24h mit unterschiedlicher  $C_2$ -Ceramidkonzentration inkubiert wurden. Die  $ex_{360}GP$ -Werte, die aus den Spektren ermittelt wurden, sind in Abbildung 5.19 dargestellt.



**Abb. 5.19**  $ex_{360}GP$ -Werte von Laurdan aus ganzen EL4-Zellen ( $T=22^\circ C$ ) in Abhängigkeit von der  $C_2$ -Konzentration

Die  $ex_{360}GP$ -Werte lagen unabhängig von der Ceramidkonzentration bei 0,3. Dieser Wert liegt dicht bei dem Wert, der für die Phasenübergangstemperatur von DMPC ermittelt wurde. Yu et al. (1996) hatten an Mäusefibroblasten, die mit einer Zwei-Photonenanregung fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden, ebenfalls diesen Wert ermittelt. Sie konnten außerdem zeigen, dass die Fluoreszenzverteilung in den Zellen nicht gleichmäßig war, sondern dass es intensiver fluoreszierende Bereiche in der Nähe der Kernregion gab.

Das bedeutet, dass der Farbstoff nicht nur in der Plasmamembran lokalisiert ist, sondern auch in das Zellinnere diffundiert und dort intrazelluläre Membranen markiert. Die Aufnahme des Fluorophors in das Zellinnere ist ein schneller Prozess und wurde an EL4-Zellen auch mit anderen Fluoreszenzsonden wie Perylen nach 2min und mit DPH nach 5min beobachtet (E. McVey et al. 1981). Die Fluoreszenz setzt sich dann aus den Fluoreszenzspektren der gesamten Fluorophore zusammen,



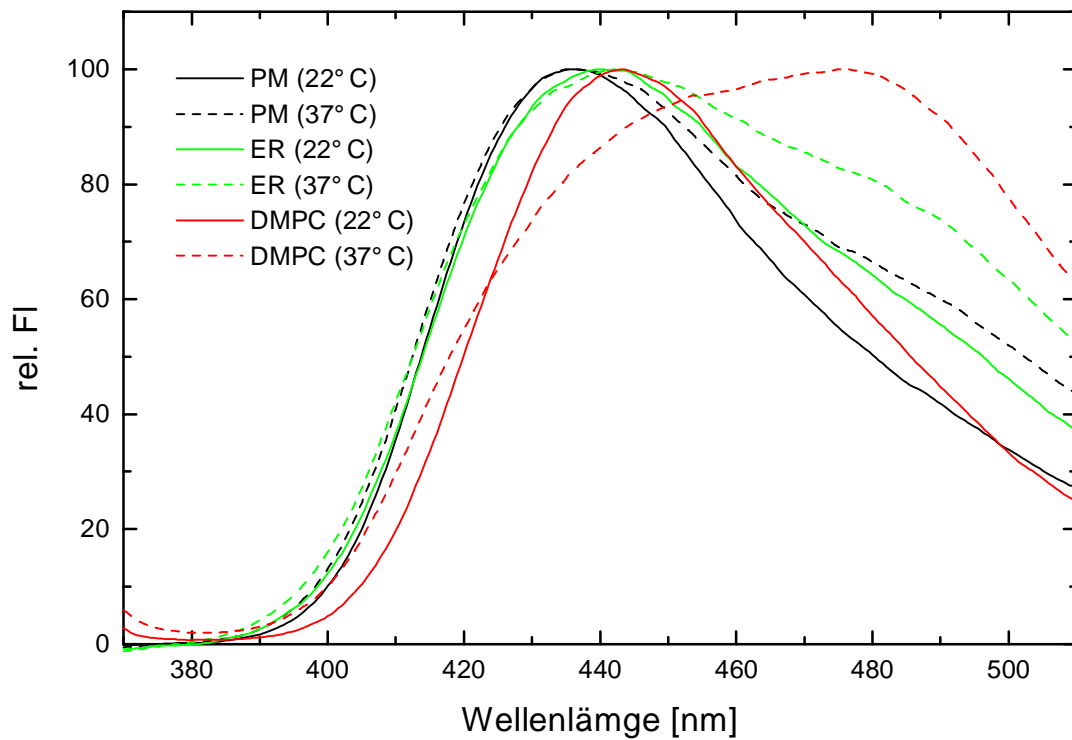
die in den verschiedenen Zellmembranen lokalisiert sind. Es ist daher schwierig, fluoreszenzspektroskopische Daten, die mit plasmamembranpermeablen Farbstoffen von ganzen Zellen gewonnen wurden, hinsichtlich Änderungen der Plasmamembran zu interpretieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Fluiditätsuntersuchungen an den isolierten Membranen durchgeführt.

Die Laurdanspektren, die an den isolierten Membranen der EL4-Zellen, die mit den exogenen Stimuli  $10\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -Ceramid und  $1\mu\text{M}$  Tubercidin 24h lang kultiviert wurden, bestimmt wurden, waren in jeder Fraktion unabhängig von den Kulturbedingungen. Die Kontrollen werden daher repräsentativ zusammen mit den Laurdanspektren, die für die DMPC-Liposomen ermittelt wurden, bei  $22^\circ\text{C}$  und  $37^\circ\text{C}$  dargestellt (Abb. 5.20). Die aus den Emissionsspektren berechneten  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte sind in Abbildung 5.21 dargestellt.

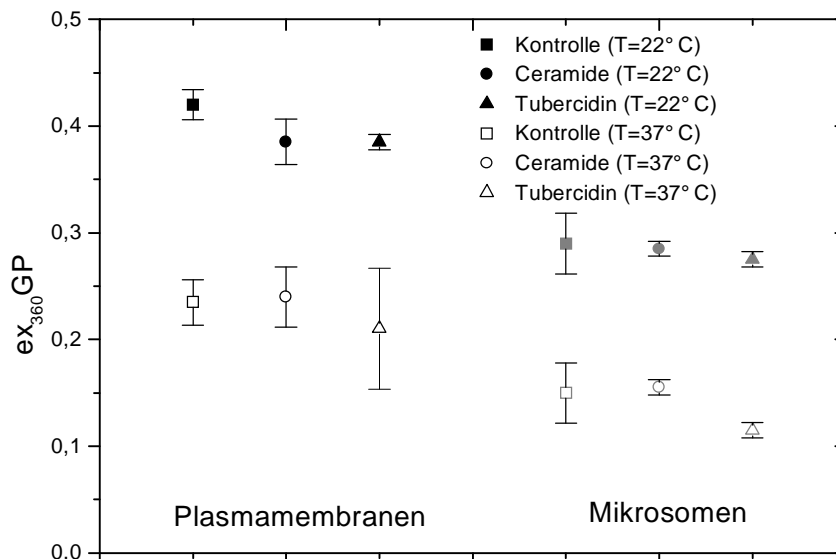
Bei der Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  ist deutlich das Auftreten des längerwelligen Peaks bei  $490\text{nm}$  in allen Proben zu beobachten. Der Effekt ist für die DMPC-Liposomen am größten, was im Vergleich zu den anderen Membranen den stärksten Dipolrelaxationsprozess anzeigt (Abb. 5.20). Zwischen den PM-Fractionen und der mikrosomalen Fraktion lässt sich ein Fluiditätsunterschied auf Grund des Dipolrelaxationsprozesses erkennen, dies ist auf das unterschiedliche Protein/Lipidverhältnis der beiden Fraktionen zurückzuführen.

Die Untersuchung an den Membranisolaten ergab, dass bei  $22^\circ\text{C}$  die mikrosomale Fraktion mit einem  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte von  $0,28$  unter dem der DMPC-Liposomen von  $0,35$  lag, womit sie flüider sind als die PM, die  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte von  $0,38$  aufwiesen. Damit ist die PM in etwa so rigide wie die DMPC-Liposomen gerade oberhalb des Phasenübergangs. Eine Temperaturerhöhung auf  $37^\circ\text{C}$  wirkt sich fluidisierend auf alle Membranen aus, wie die Verringerung der  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte anzeigt.

Die  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte liegen für die mikrosomalen Membranen bei  $0,15$ , die damit flüider sind als die PM, deren  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Werte bei  $0,25$  liegen. Bei der gleichen Temperatur sind die DMPC-Liposomen in einem flüssig-kristallinen Zustand bei einem  $\text{ex}_{360}\text{GP}$ -Wert von  $-0,15$ .



**Abb. 5.20** Laurdanemissionsspektren (ex. 360nm) bei 22° C (durchgezogene Linien) und 37° C (gestrichelte Linien) der Plasmamembranen (PM), Mikrosomen (ER) und DMPC-Liposomen

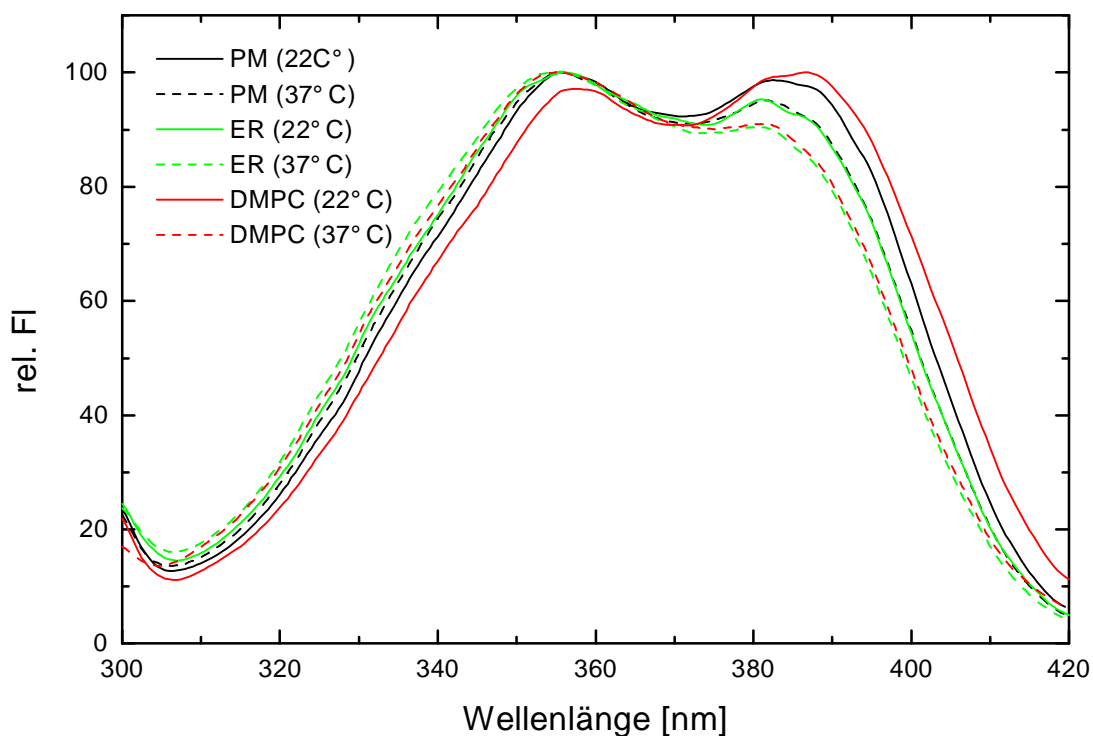


**Abb. 5.21**  $ex_{360GP}$ -Werte der PM und der Mikrosomen bei 22° C, 37° C und den Induktoren 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramide, 1 $\mu$ M Tubercidin und der Kontrolle

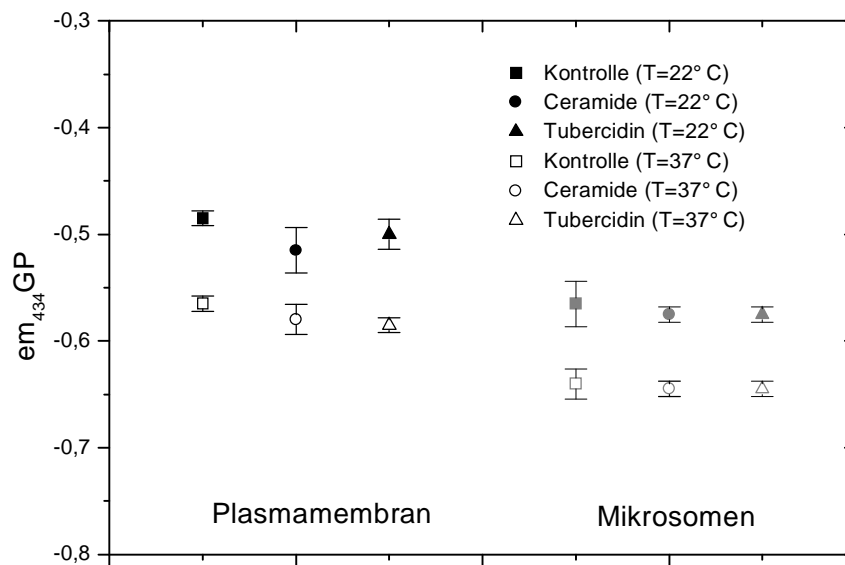
Zur Absicherung der Ergebnisse wurden zusätzlich die Excitationsspektren von Laurdan bei der Emissionswellenlänge von 434nm bestimmt (Abb. 5.22). Die berechneten  $em_{434}GP$ -Werte für die Membranen bei 22° C und 37° C sind in Abbildung (5.23) dargestellt.

Die Excitationsspektren von Laurdan in den Membranen sind durch zwei Banden charakterisiert. Die blaue Bande hat ihr Maximum bei 356nm. In Abhängigkeit von der Temperatur und der Membranumgebung variiert aber die rote Bande im Laurdanspektrum stärker. Die Spektren von den Membranisolaten liegen zwischen den von DMPC im Temperaturbereich von 22-37° C.

Das Excitationsspektrum der Mikrosomen bei 37° C ist mit dem von DMPC bei 37° C nahezu deckungsgleich. Die  $emGP = -0,64$  ( $\Gamma 0,02$ ) hat den niedrigsten Wert, was einen flüssig-kristallinen Zustand dieser Membran anzeigt. Die Laurdanmoleküle befinden sich in einer unpolaren Umgebung, die als hohe Fluidität interpretiert werden kann.



**Abb. 5.22** Laurdanexcitationsspektren ( $em_{434}GP$ ) bei 22° C (durchgezogene Linien) und 37° C (gestrichelte Linien) der Plasmamembranen (PM), Mikrosomen (ER) und DMPC-Liposomen



**Abb. 5.23**  $em_{434}GP$ -Werte der PM und der Mikrosomen bei 22° C, 37° C und den Induktoren 10 $\mu$ M C<sub>2</sub>-Ceramide, 1 $\mu$ M Tubercidin und der Kontrolle

Eine niedrigere Fluidität und damit die Erhöhung der  $em_{434}GP$ -Werte auf -0,57 ließ sich bei den PM-Isolaten beobachten. Ebenso wurde eine Rigidisierung durch die Erhöhung der  $em_{434}GP$ -Werte bei der Temperatur von 22° C angezeigt.

Die höchste  $emGP = -0,32$  ( $\Gamma 0,02$ ) wurde für DMPC Liposomen in der gel Phase bei 22° C festgestellt, damit zeigen die DMPC Liposomen die geringste Fluidität an. Laurdan befindet sich in einer hoch polaren, rigiden Umgebung.

Es konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mikropolaritäten und damit der Fluidität unter den einzelnen Isolaten derselben Fraktion aufgelöst werden, während der Fluiditätsunterschied zwischen der PM Fraktion und den Mikrosomen wieder nachgewiesen werden konnte.

Ein Vorteil der Fluoreszenzspektroskopie mit Laurdan liegt darin, dass mit Messungen unter „steady-state“-Bedingungen dynamische Informationen aus der Umgebung des Fluorophors gewonnen werden können, ohne dass Polarisatoren verwendet werden müssen, was eine Reduzierung der Emissions- und Excitationsintensitäten zur Folge hätte.

## 6 Diskussion

*In vivo* ist Apoptose ein physiologischer Prozess, bei dem unerwünschte Zellen durch Phagozytose eliminiert werden, ohne Entzündungsreaktionen zu verursachen (Savill, 1997). Sie kann durch physikalische und toxische Stimuli ausgelöst werden und wird durch eine Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen charakterisiert. Dass bei der Apoptose entzündliche Reaktionen vermieden werden, hängt letztendlich von zwei Voraussetzungen ab: Die Plasmamembran der Zellen bleibt im Gegensatz zur Nekrose lange intakt, so dass keine zytotoxischen Substanzen in die Umgebung gelangen. Andererseits müssen apoptotische Zellen ihre Zelloberfläche so verändern, dass sie schnell erkannt und durch Aufnahme von anderen Zellen eingeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden als Wirkstoff für die Auslösung des programmierten Zelltods in EL4-Zellen Tubercidin (7-Deaza-Adenosin), ein Strukturanalog von Adenosin und synthetische kurzkettige Ceramide (D-erythro-C<sub>2</sub>-Ceramid), eingesetzt und deren Einfluß auf physikochemische Parameter, insbesondere der PM, untersucht.

### 6.1 Apoptosewege

Die EL4-Zellen stammen vom Thymus einer Maus ab und werden besonders von Immunologen verwendet, da sie T-Zell-spezifische Rezeptoren besitzen. Bei der Entwicklung im Immunsystem spielen Adenosine bei der richtigen Auswahl von T-Zellen eine bedeutende Rolle. Die Grundlagen apoptotischer Prozesse aufzuklären ist wichtig für das Verständnis von vielen Krankheiten, z.B. Autoimmunerkrankungen, AIDS oder Krebs.

Ceramide (Cer) sind die Hydrolyseprodukte von Sphingomyelin (SM) und gelten in vielen Zellsystemen als „second messenger“ der rezeptor-vermittelten Aktivierung einer SMase. Der SM-Kreislauf ist bei der Regulierung der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Bedeutung (Okazaki et al., 1998).

Welche Bedeutung der SM-Kreislauf bei der Apoptose in EL4-Zellen spielt, und ob es einen durch das kurzkettige Ceramidanalogue ( $C_2$ ) vermittelten Apoptosepfad gibt, wurde mit verschiedenen Apoptosetests untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit der Tubercidin induzierten Apoptose verglichen und mit physikochemischen Parametern der Plasmamembran korreliert.

### 6.1.1 Sphingomyelinkreislauf

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der EL4-Zellen mit dem fluoreszierenden Ceramidanalogue  $C_6$ -NBD ergab, dass sich der Farbstoff schon nach kurzer Zeit in der peripheren nuklearen Region der Zellen (s. Abb. 5.13) anreichert. Ohne Bildverarbeitung sind die Fluoreszenzintensitätsunterschiede schwer zu quantifizieren. Es scheint aber, als hätten die Zellen, die mit  $C_2$  und Tub behandelt wurden, lokal stärkere Fluoreszenzmaxima. Die Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs NBD könnte auf eine Störung der Lipidtransportprozesse oder auf eine Störung der Sphingolipidbiosynthese hindeuten. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Daher scheint der Transport der Lipide, die am SM-Kreislauf beteiligt sind, vesikulärer Natur zu sein, weil dieser im Gegensatz zum nicht vesikulären Transport bei Temperaturen unter  $20^\circ\text{C}$  blockiert ist (Van Meer et al., 1987). Für genauere Untersuchungen der Transportprozesse bei der Apoptose ist es jedoch notwendig, die Experimente unter physiologischeren Bedingungen durchzuführen, z.B. mit temperierbaren Objektträgern.

SM und Glycosylceramide (GlyCer) gelten als Hauptmetabolite, die aus Ceramiden im Golgi-Apparat weiter aufgebaut werden. Die Extraktion der Lipide aus den Zellen und die nachfolgende Auftrennung der fluoreszierenden neutralen Lipide ergab, dass nach einer Stunde schon über die Hälfte der  $C_6$ -NBD-Cer in  $C_6$ -NBD-SM und  $C_6$ -NBD-GlyCer metabolisiert wurden (s. Abb. 5.15). Die mit den Wirkstoffen behandelten Zellen wiesen jedoch im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Metabolisierungsrate auf. Die Inhibierung der Biosynthesewege in den EL4-Zellen durch  $C_2$  und Tub verursacht einen Anstieg des intrazellulären Ceramidgehalts. Schon in anderen Zellsystemen wurde ein Ceramidanstieg bei apoptotischen Prozessen beobachtet und als Folge einer PM-gebundenen SMase-Aktivierung interpretiert (Cabot et al., 1999). Die Untersuchung mit fluoreszierenden Ceramidmetaboliten ist eine geeignete

Methode, um quantitative Aussagen über Metabolisierungsraten zu treffen. Zudem zeigte sich, dass in EL4-Zellen neben SMasen auch GlyCer- und SM-Synthasen, den Ceramidgehalt in den Zellen regulierend beeinflussen. Diese scheinen aber nicht an der PM lokalisiert zu sein, wie aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht. Dieses wurde bereits von Sillenca et al. (1998) an einem anderen Zellsystem (BHK) postuliert. Den „second messenger“ Ceramid in seine Metabolite umzusetzen, könnte ein generelles Wirkungsprinzip bei der Apoptose sein und korreliert mit der Vorstellung, dass über den intrazellulären Ceramidgehalt spezifische Targetmoleküle (CAPP, CAPK) aktiviert werden, die für den initialen Schritt zur Apoptose verantwortlich gemacht werden (Cifone et al., 1999).

## **6.2 Apoptosestadien**

Die verwendeten Apoptosetests sind für bestimmte Apoptosestadien besonders sensitiv, da sie unterschiedliche apoptotische Phänomene detektieren. Der Trypanblau Test detektiert spät apoptotische / nekrotische Zellen, deren PM nicht mehr intakt ist. Dieser zytotoxische Assay eignet sich für die Untersuchung des späten Stadiums der Apoptose, das auch als „secondary necrosis“ bezeichnet wird. Die Beobachtung, dass nukleare Veränderungen erst zu einem späten Zeitpunkt bei der Apoptose detektierbar sind, ist der Anlass, frühe apoptotische Stadien mit anderen Methoden, z.B. dem Annexin-FITC/Pi Test, nachzuweisen. Dieser Test bietet den Vorteil, dass simultan frühe und späte apoptotische Stadien nachweisbar sind. Durch die Untersuchung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität wurde die mitochondriale Aktivität als weiterer Parameter in den Apoptosestadien bestimmt.

### **6.2.1 Mitochondriale Aktivität**

Mit dem MTT-Test wurde die konzentrationsabhängige Wirkung der verwendeten Induktoren in den EL4-Zellen untersucht (s. Abb.5.1). Es zeigte sich, dass Tub schon bei deutlich geringeren Konzentrationen als C<sub>2</sub> einen Einfluss auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität (MDA) besass. Ein für apoptotische Prozesse typischer

Rückgang der MDA innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches wurde für beide Induktoren beobachtet. Die Verringerung der MAD resultiert nicht nur aus einer direkten Schädigung der mitochondrialen Funktion, sondern ist auch abhängig von den proliferationsinhibierenden Eigenschaften der Induktoren. So korrelierte die aus der MDA abgeleitete Vitalität der Zellen für Tub nicht mit den Vitalitätsbestimmungen, die mit der Trypanblau-Ausschlussfärbung gewonnen wurden. Nach 24h lag die MDA bei der Inkubation mit 1 $\mu$ M Tubercidin nur noch bei 10%, was einer Nekroserate von 90% entsprechen würde. Tatsächlich wurde mikroskopisch eine Proliferationsinhibierung beobachtet und mit Trypanblau eine Nekroserate von ca. 12% ermittelt. Diese Diskrepanz zwischen ermittelter Nekroserate und Vitalitätsbestimmung mit MTT wurde auch schon mit anderen cytotoxischen Reagenzien an SW620 Zellen beobachtet (Basha et al., 1996).

Bei den über den selben Zeitraum mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> behandelten Zellen war die MDA noch fast vollständig vorhanden und lag bei 90%, was einer Nekroserate von 10% entsprechen würde. Die Zellzahlen und die mit Trypanblau ermittelte Nekroserate von 5% waren bei dieser C<sub>2</sub>-Konzentration gegenüber der Kontrolle nicht verändert. Bei der Interpretation der MTT-Daten als direkte Fehlfunktion der Mitochondrien müssen Proliferationsraten mit berücksichtigt werden. Die Mitochondrien in den mit 10 $\mu$ M C<sub>2</sub> behandelten Zellen sind noch weitestgehend intakt. Ob es bei dem Rückgang der MDA bei höheren C<sub>2</sub>-Konzentration oder im Fall von Tub neben einer Proliferationsinhibierung auch zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) und/oder dem Ausstrom von Cyt c und anderen apoptose-induzierenden Faktoren (AIF) ins Zytoplasma kommt, wie es in Zusammenhang mit frühen apoptotischen Prozessen von anderen Zellsystemen berichtet wurde, ist Gegenstand laufender Forschungsarbeiten.

## **6.2.2 Plasmamembranasymmetrie**

Mit dem Annexin V-FITC/Pi Test wurden die EL4-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht und in frühe und späte apoptotische Populationen eingeteilt. In frühen Apoptosestadien verlieren apoptotische Zellen ihre Phospholipidasymmetrie und exponieren PS auf die Außenseite ihrer Plasmamembran (s. Abb. 5.7). Eine erhöhte PS-Exponierung (30%) konnte nach 24h



durch die Bindung von AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup> an den Zellen nachgewiesen werden, die mit 1µM Tubercidin behandelt wurden (s. Abb. 5.9). Zu diesem Zeitpunkt war auch schon ein erhöhter Anteil der Zellen vorhanden, die den Farbstoff Pi aufgenommen hatten und mit einer AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup>-Markierung (15%) den Anteil einer spät apoptotischen Zellpopulation repräsentieren. Diese Zellen verfügen über keine intakte PM mehr, sie erscheinen schrumpeliger und geschrumpft gegenüber den unmarkierten Zellen (s. Abb. 5.8). In den Kulturen, die über den gleichen Zeitraum mit 10µM C<sub>2</sub>-Ceramiden behandelt wurden, waren insgesamt deutlich weniger Zellen markiert. Sie hatten eine geringere AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>-</sup>-Markierung (10%) und eine nicht von der Kontrolle abweichende AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup>-Färbung (5%). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab, dass vorwiegend kleine schrumpelige Zellen mit dem Farbstoff markiert sind (s. Abb. 5.7). Die spät apoptotische Zellpopulation mit AV-FITC<sup>+</sup>/Pi<sup>+</sup>-Färbung liegt im Bereich der mit Trypanblau ermittelten Nekroserate. Der Anteil der früh apoptotischen Zellen ist in allen Fällen ca. doppelt so hoch und zeigt im Falle der Kontrolle den Anteil der natürlichen Apoptoserate an. Die mit den Ceramiden behandelten Zellen zeigten mit dem Annexin V-FITC/Pi Test im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Erhöhung der Apoptoseraten in den einzelnen Stadien an, während Tub sowohl in der frühen als auch in der späten apoptotischen Phase Zellen anreichert. Das bedeutet, dass die Apoptose in diesen Zellkulturen schon weiter vorangeschritten war. Wahrscheinlich sind die Mitochondrien an dem Umbau und der Degradierung der PM mit beteiligt, da in diesen Zellpopulationen die MDA schon dramatisch zurückgegangen war.

Den Zellen wird von den Mitochondrien ihre Energie in Form von ATP zur Verfügung gestellt. Bei einer Fehlfunktion der Mitochondrien könnte es zu einem Energiemangel in den Zellen kommen, so dass die ATP-abhängigen Flippasen (outside-inside PS-Translokase), die für die Aufrechterhaltung der PM-Asymmetrie verantwortlich gemacht werden, nicht mehr funktionieren. Während der frühen Phasen der Apoptose ist die PM-Integrität noch erhalten, was der Ausschluss von Pi anzeigt. Erst bei Induktorkonzentrationen, die zu einem starken Abfall der MDA führen, steigt der Anteil der Zellen, die den Farbstoffe Pi aufnehmen und ein spätes Apoptosestadium anzeigen. Diese Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang der mitochondrialen Aktivität mit den Apoptosestadien und sind ein Hinweis darauf, dass der nuklearen Apoptose eine Veränderung an den Mitochondrien vorausgehen muss.

### 6.2.3 Nukleare Zellkernveränderungen

Späte Apoptosestadien werden durch biochemische Veränderungen in der Kernstruktur charakterisiert, wie die Aufspaltung der DNA in Oligonukleosomeneinheiten, die durch den DNA-Ladder Test nachgewiesen wurden. Nach 24h zeigten die Zellen, die mit 1µM Tubercidin behandelt wurden Apoptose-typische DNA-Fragmente im Agarosegel (s. Abb. 5.4) . EL4-Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit 10µM C<sub>2</sub>-Ceramiden inkubiert wurden, zeigten keine Zunahme einer DNA-Fragmentierung. Erst nach 48h konnte ebenfalls eine Zunahme der DNA-Fragmentierung für die mit 10µM C<sub>2</sub>-Ceramide inkubierten Zellen nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Ceramidkonzentration auf 40µM in den Zellkulturen führte nach 24h Stunden dazu, dass sich kein Leitemuster im Agarosegel ausbildete, was eine unspezifische Spaltung der DNA anzeigt und eher für einen nekrotischen Zelltod spricht. Dieser von der Ceramidkonzentration abhängige Effekt auf die Zellantwort verdeutlicht, wie sensibel der Regulierungsmechanismus der Ceramide bei der Apoptose ist.

Eine Möglichkeit, die DNA-Mengen zu quantifizieren und in „low molecular weight“ (LMW)- DNA und „high molecular weight“ (HMW)- DNA einzuteilen, bietet der DAPI-Test. Es zeigte sich bei den mit Tubercidin und Ceramiden inkubierten Zellen eine Proliferationsinhibierung auf Grund der insgesamt verminderten DNA-Menge (s Abb. 5.2). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Bestimmung des Proteingehalts, der in den apoptotischen Zellen reduziert war und ebenfalls auf eine Wachstumsinhibierung hinweist. Der Anteil der LMW-DNA war, bezogen auf den gesamten DNA-Gehalt in den behandelten Zellen, erhöht, was sich als Zunahme der Apoptose ausdrücken lässt (s. Abb 5.3). Diese DNA-Fragmente sind im Fall der Zellen, die 24h lang mit 10µM Ceramiden inkubiert wurden, jedoch noch größer als die DNA-Bruchstücke, die die Größe geringer Vielfache von Oligonukleosomeneinheiten aufweisen und mit dem DNA-Ladder Test nachgewiesen wurden. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Degradierung der DNA in größere Bruchstücke schon früher einsetzt als der Mechanismus, der für die Ausbildung von DNA-Bruchstücke der Größenordnung von Oligonukleosomeneinheiten verantwortlich ist.

Die Variation in der zeitlichen Kinetik beim Apoptoseverlauf von Ceramiden und Tubercidin ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Apoptosepfade in den EL4-Zellen zurückzuführen. Das Primärtarget der Ceramide ist im Vergleich zu Tubercidin nicht der Zellkern direkt, sondern erst über vermittelnde Zwischenschritte (CAPK,

Caspasen) gelangt das Apoptosesignal in den Kern, wo es zu apoptotischen Kernveränderungen umgesetzt wird. Die zytotoxische Wirkung von Tubercidin beruht hingegen eher auf einer direkten Inkorporation in die DNA und einer dadurch gestörten DNA-Replikation (Brdar et al.; 1999).

#### **6.2.4 Zellzyklusuntersuchungen**

Zellen sind beim Durchlaufen ihres Zellzyklusses in der Lage, DNA-Schäden zu bemerken und zu reparieren, oder sie „entscheiden“ sich, apoptotisch zu werden, bevor der DNA-Schaden auf spätere Zellgenerationen übertragen werden kann.

Es gibt Biomoleküle wie das Onkogen (p53) und das Zellzyklusregulierungsgen (c-myc), die zeigen, wie eng Mitose und Apoptose miteinander verbunden sind. So ist bei der DNA-Replikation z.B. das Protein p53 für die Reparatur von DNA-Schäden mitverantwortlich.

Die flowcytometrische Bestimmung des DNA-Gehalts mit Propidiumiodid liefert Informationen über die Zellzyklusposition der Zellen (s. Abb. 5.5) und lässt damit Aussagen über die Zellzyklusspezifität der Apoptose zu. Die Zellzyklusuntersuchungen an den EL4-Zellen und die Quantifizierung der Apoptose zeigten, dass die Ceramide genau wie Tubercidin bevorzugt in der S-Phase Apoptose induzieren. Bei den 24h lang mit Ceramiden induzierten Zellen nimmt der Anteil der Zellen des sub-G<sub>1</sub> Peak und damit die apoptotische Zellpopulation bei gleichzeitiger Verringerung des S-Peaks mit steigender Konzentration von 10µM bis 40µM zu (s. Abb. 5.6). Beim Tubercidin konnte eine Erhöhung der apoptotischen Zellpopulation schon nach vier Stunden beobachtet werden.

Auch in anderen Zellsystemen konnte mit Adenosineanalogen (3-deazaadenosine) eine frühe Wachstumshemmung nachgewiesen werden (Enderson et al., 1993), bei gleichzeitiger Reduzierung des Zellzyklusregulierungsgens c-myc (Loennechen et al.; 1997). Das zeigt, wie eng die Regulierung der Mitose mit apoptotischen Prozessen verbunden ist und könnte auch in den EL4-Zellen eine Erklärung für die beobachtete Wachstumsinhibierung sein.

Mit den Ceramiden ließen sich in den EL4-Zellen keine schnellen apoptotischen Effekte nachweisen, wie sie von anderen Zellsystemen berichtet wurden und wes-

halb den Ceramiden bei der Apoptose „second messenger“-Funktionen zugeschrieben wurden (Farschon et al., 1997). Bei den mit Ceramiden behandelten EL4-Zellen läuft das „Apoptoseprogramm“ im Vergleich zu den mit Tubercidin behandelten Zellen langsamer ab, was auf einen anderen Apoptosemechanismus oder auf die Möglichkeit, durch intrazelluläre Regulierung die Apoptose zu verlangsamen oder gar zu verhindern, hinweist.

### **6.3 Membranveränderungen**

Die morphologischen Veränderungen bei der Apoptose wie „cell shrinking“, „blebbing“ und „apoptotic body formation“ sind in einer Vielzahl von Zellsystemen schon beschrieben und beobachtet worden. Es ist jedoch noch wenig darüber bekannt, was die Ursachen dieser Membranveränderungen sind. Als Grundlage dieser Zellformveränderung wird der Zusammenbruch des Zytoskeletts und die Auflösung spezieller Zytoskelettproteine diskutiert. Es wird aber auch der Mechanismus einer sich ändernden Lipidzusammensetzung in den apoptotischen Zellen diskutiert (Cohen et al., 1993). Dieser Frage wurde durch Untersuchungen der isolierten Membranen aus den EL4-Zellen nachgegangen.

In dieser Arbeit wurden die PM-Änderungen nach der Behandlung mit den Apoptosestimuli untersucht. Neben den Fettsäure- und Lipidveränderungen sollte der Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie aufgeklärt werden. Quantitative Analysen der Phospholipidzusammensetzung, des Cholesteringehalts und der Fettsäurezusammensetzung wurden durchgeführt und mit apoptotischen Prozessen verglichen.

#### **6.3.1 Lipid- und Fettsäurezusammensetzung**

Lipide und Fettsäuren sind die Quellen verschiedener intra- und interzellulärer Messenger, die Proliferation, Zelltod und andere zelluläre Antworten steuern.

In den EL4-Zellen konnten in allen Membranen die Hauptlipide (PC, PE, PI, SM und PS) nachgewiesen werden (s. Abb. 5.10). PC und PE machen ca. 60% des Gesamt-

lipidgehalts der PM aus (s. Abb. 5.11). Densitometrische Untersuchungen von Poon et al. (1982) zeigten für EL4-Zellen, dass PC und PE 80% des Gesamtlipidgehalts ausmachten. Dieser höhere Wert lässt sich neben der unterschiedlichen Methode zur Bestimmung des PL-Gehalts auch mit anderen Isolierungsmethoden der PM erklären, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeitsgruppen erschwert. Die PM der apoptotischen EL4-Zellen enthielten insgesamt einen verminderten Phospholipidgehalt gegenüber der Kontrolle. Ob dafür PL-spezifische Transportinhibitoren verantwortlich sind, wie im Fall der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose von Bogin et al. (1992) vermutet oder unspezifische Phänomene für diesen Effekt verantwortlich sind konnte nicht geklärt werden. In den Zellen, die mit Ceramiden inkubiert wurden, war die PL-Verminderung am deutlichsten, während es zu keiner signifikanten Veränderung im Phospholipidspektrum kam. Das spricht dafür, dass unspezifische Prozesse schon in einer frühen Phase der Apoptose Phospholipide abbauen. Eine andere Erklärung für den verminderten Phospholipidgehalt in apoptotischen Zellen wäre der Verlust von Membranmaterial, der durch „membrane blebbing“ und die Abstoßung von „apoptotic bodies“ hervorgerufen werden könnte. Neben dem Phospholipidgehalt wurde auch die Fettsäurezusammensetzung in den EL4-Zellen untersucht. Von Pizer et al. (1998) konnte in anderen Tumorzellen ein veränderter Fettsäuremetabolismus bei der Apoptose nachgewiesen werden. Die Ergebnisse an den EL4-Zellen ergaben, dass es unabhängig vom Apoptoseinduktor zu einem Anstieg des Fettsäuregehaltes und ihrem Sättigungsgrad in der PM kommt (s. Abb. 5.18). Das Fettsäurespektrum und der Fettsäuregehalt in der mikrosomalen Fraktion änderte sich hingegen kaum (s. Abb. 5.19). Diese Effekte ließen sich im Fall der Ceramide noch deutlich vor der Aufhebung der Lipidasymmetrie detektieren. Der Anstieg von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) ist von besonderem Interesse, da von ihnen berichtet wird, dass sie in mikromolaren Konzentrationen schon zytotoxisch auf Krebszellen reagieren. Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Doppelbindungen und dem Anteil der apoptotischen Zellpopulation aufgezeigt (Hawkins et al., 1998).

Als grundlegender Mechanismus bei der Apoptose wird die Aktivierung von PLasen diskutiert. Das führt nicht nur zu einem PL-Abbau sondern auch zu einem Anstieg der Hydrolyseprodukte und der Fettsäuren. Dabei ist insbesondere die Aktivierung von Phospholipase A2 (PLA2) ins Blickfeld der Wissenschaftler gerückt, die als Abbauprodukt AA generiert, der eine Reihe von Signaleigenschaften zugeschrieben

werden. Exogene AA ist in der Lage, im Gehirngewebe von Tumorzellen Apoptose auszulösen. Dabei wurde eine bis zu dreifach erhöhte Aktivität von Endonukleasen in den Tumorzellen nachgewiesen (Williams et al., 1998). Der Gehalt dieser Fettsäure war in den PM der EL4 Zellen, die mit Tubercidin behandelten waren, gegenüber der Kontrolle vierfach erhöht. Bei den mit Ceramiden behandelten Zellen fand sich eine dreifache Erhöhung des AA Gehaltes in der PM. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass auch in den EL4-Zellen ein durch AA aktivierter Apoptosepfad existiert.

Die Untersuchungen der PM der EL4-Zellen wurden auf die Bestimmung des Cholesteringehalts ausgedehnt, da diesem Molekül entscheidende membranstabilisierende Eigenschaften zugeschrieben werden. So wurde ein Anstieg in der Cholesterinkonzentration in den mit Ceramiden behandelten Zellen um ca. 50% detektiert. Die Cholesterinkonzentration war hingegen in den mit Tubercidin behandelten Zellen nur um ca. 25% erhöht (s. Abb. 5.12). Neben Apoptose induzierenden Effekten wurden an Rattenthymozyten auch Apoptose inhibierende Eigenschaften von Cholesterin diskutiert (Härtel et al., 1999). Über die Rolle von Cholesterin bei der Apoptose kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Aufgrund seiner besonderen chemischen Struktur ist das Cholesterinmolekül aber wahrscheinlich an der Umbildung der PM beteiligt und für die morphologischen Phänomene bei der Apoptose mitverantwortlich.

Die umfangreichen Umgestaltungen im Fettsäure- und Lipidhaushalt der PM sind ein frühes Phänomen im Apoptosepfad und werden noch vor der Asymmetrieaufhebung der PM beobachtet. Sie könnten die Grundlage für die typischen morphologischen Membranveränderungen bei der Apoptose sein. Es fehlen aber noch grundlegende Untersuchungen, die auch physikalische Membranparameter mit einbeziehen und zu einer einheitlichen Theorie führen.

### **6.3.2 Physikalische Membranveränderungen**

Die Lipid- und Fettsäurezusammensetzung reguliert die Fluidität des Bilayers und damit auch die Funktionalität von Membranproteinen. Bei der Apoptose gehen eine

Reihe von Signalkaskaden von der PM aus, was ihre aktive Rolle im Apoptoseweg verdeutlicht.

Die in den EL4-Zellen beobachteten Veränderungen des Phospholipid-, Fettsäure- und Cholesteringehalts wirken sich aber nicht auf die Mikropolarität und die Relaxationseigenschaften der Membranen aus. Diese Parameter wurden fluoreszenzspektroskopisch mit der Fluoreszenzsonde Laurdan bestimmt und können als Membranfluidität interpretiert werden. Aus den Laurdanspektren wurden generalisierte Polarisationen (GP) bestimmt, die entscheidend von der lokalen Lipidpackungsdichte der Membranen abhängen.

Die Fluoreszenzeigenschaften von Laurdan, die an ganzen Zellen ermittelt wurden, ergaben exGP-Werte, die bei 0,3 lagen (s. Abb. 5.19). Dieser Wert wurde auch an anderen Zellsystemen ermittelt, die fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden (Yu et al., 1996). Aus dieser Untersuchung geht hervor, dass die Fluoreszenzintensität in den Zellen nicht gleichmäßig verteilt ist. Die an ganzen Zellen gemessenen Fluoreszenzspektren und daraus abgeleiteten Fluoreszenzparameter liefern deshalb eine Verteilung der Fluiditätseigenschaften über unterschiedliche Membranen der gesamten Zellpopulation. Um dennoch zu Fluiditätsparametern zu kommen, die für die PM spezifisch sind, wurden die Fluoreszenzuntersuchungen an den einzelnen Membranisolaten durchgeführt und die bestimmten GP-Werte mit denen, die an DMPC Liposomen gemessen wurden, verglichen. Die absoluten GP-Werte liegen relativ hoch, dicht an den Werten, die für die PL in der Gel-Phase ermittelt wurden. DMPC Liposomen liegen bei 22° C in der gel-Phase vor und haben exGP-Werte von 0,4 (s. Abb. 5.18). Die PM weist bei dieser Temperatur den selben exGP-Wert auf (s. Abb. 5.21). Im Vergleich dazu haben die Mikrosomen geringere exGP-Werte, was auf eine niedrigere lokale Lipidpackungsdichte zurückzuführen ist. Die Lipidpackungsdichte verringert sich auch bei einem Temperaturanstieg. Bei höheren Temperaturen (37° C), oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC, können sowohl die Mikrosomen als auch die PM mehr Wasser einlagern, was eine Verminderung der Lipidpackungsdichte zur Folge hat. Die exGP-Werte der Mikrosomen liegen unter 0,2 und damit unterhalb des Wertes, bei dem 80% aller Lipide in dem Modellmembransystem in der flüssig-kristallinen Phase vorliegen (Parasassi, 1993b). Die exGP-Werte der PM liegen bei 37° C oberhalb von 0,2 in einem Fluiditätsbereich, in dem die DMPC-Liposomen ihren Phasenübergang

besitzen. Zwischen den Membranisolaten, die aus apoptotischen Zellen gewonnen wurden, und der Kontrolle ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede detektieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Veränderungen der Lipidkomponenten nicht auf lokale Lipidpackungsdichte und dem daraus abgeleiteten Fluiditätsbegriff auswirken, und dass das Fluiditätsgefälle zwischen den PM und den Mikrosomen auf den höheren Proteingehalt der Mikrosomen zurückzuführen ist, was eine erhöhte Wasserpenetration in die Membranen ermöglicht (Antonellini et al., 1996).

Cholesterin ist dafür bekannt, dass es die lokale Lipidpackungsdichte insbesondere in der flüssig-kristallinen Phase erhöht (Spector et al., 1985). Eine bei der Apoptose erhöhte Cholesterineinlagerung in der PM könnte deshalb der Mechanismus sein, der dem fluidisierenden Effekt - dem Anstieg des Fettsäuregehaltes und des Sättigungsgrades - entgegen wirkt, damit die PM weiter als Permeabilitätsbarriere funktioniert und keine zytotoxischen Moleküle in die Umgebung entlassen werden können.

## **6.4 Ausblick**

Ein Problem bei der Krebstherapie ist das Auftreten von zytotoxischen Resistenzen. Das gen-aktivierende Apoptoseprogramm in den Zellen ist dann gestört. Es gibt erste vielversprechende Therapieansätze, die regulierend auf dieser Ebene in das Apoptoseprogramm eingreifen. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint es lohnenswert, auch die Bemühungen zu verstärken, die Rolle der PM bei der Apoptose weiter zu untersuchen und für Therapieansätze zu nutzen. Auch die Frage nach den Lipidtransportprozessen (Simons, 1988) und ob durch aktives „lipid sorting“ die apoptotischen Prozesse regulierend beeinflusst werden können, ist weiterhin von großem Interesse.



## 7 Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod wird in einer Reihe von Zellen beobachtet und ist ein physiologischer Prozess, bei dem sich die Zellen *in vivo* aus ihrem Zellverband lösen und von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden, ohne dass es zu Entzündungsreaktionen kommt. Eine Störung des apoptotischen Programms ist die Grundlage für viele Krankheiten z.B. Krebs, AIDS oder Autoimmunreaktionen.

An einem Zellkultursystem (EL4) aus Mäuse thymuszellen, das T-Zell-spezifische Rezeptoren (FAS) aufweist, wurden physikalische und biochemische Parameter insbesondere der Plasmamembran ermittelt und mit apoptotischen Veränderungen verglichen. Während die Apoptose für gewöhnlich von physiologischen Stimuli ausgelöst wird, können auch chronische subtoxische Stimuli unter bestimmten Umständen Apoptose auslösen. In dieser Arbeit wurden kurzkettige Ceramide und das Adenosin analog Tubercidin als Apoptosestimuli eingesetzt.

Ceramide sind die Hydrolyseprodukte einer SMase-Aktivierung und gelten als „second messenger“ in einigen Rezeptor (FAS, TNF $\nabla$ )-aktivierten Apoptosepfaden (Verheij et al., 1996).

Mittels der Laser Scanning Mikroskopie wurde beobachtet, dass fluoreszierende exogene Ceramide (NBD-C<sub>6</sub>) schnell über die PM in die periphere Kernregion der EL4-Zellen gelangen. In dieser Region werden die Ceramide zu Sphingomyelin und Glycosylceramiden metabolisiert. In den Zellen, die mit C<sub>2</sub>-Ceramiden und Tubercidin vorbehandelt wurden, kam es zu einer Akkumulation von NBD-C<sub>6</sub>. Die Inhibition der Sphingolipidbiosynthese korrelierte mit morphologischen und biochemischen Änderungen in den EL4-Zellen.

Die Viabilität der Zellen wurde durch die Untersuchung der Membranintegrität mit Trypanblau bestimmt. Die Induzierung des Zelltods mit Ceramiden korrelierte mit einer Schädigung der mitochondrialen Funktion. Bei geringeren Dosen wurde für Tubercidin eine frühere Schädigung der Mitochondrien nachgewiesen, die aber nicht zum nekrotischen Zelltod führte. Mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurden nach der Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid und Annexin V-FITC morphologische Veränderungen wie Kondensation des Chromatins und Exposition von Phosphatidylserin (PS) beobachtet, wie sie für apoptotische Prozesse charakteristisch sind. Der Anteil der apoptotischen Zellen und die Zellzyklus-Charakteristiken

wurden mit der Flowcytometrie bestimmt. Nach 24h war der Anteil der apoptotischen Zellen in den Kulturen, die mit 1µM Tubercidin behandelt wurden, mit 37% am größten. Fluoreszenzspektroskopisch wurde mit DAPI die DNA-Fragmentierung analysiert und Apoptose-spezifische DNA-Fragmente in der Größenordnung von Oligonukleosomeneinheiten durch Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei zeigte sich zwischen Tubercidin und Ceramiden unterschiedliche Fragmentierungsmuster. Das spricht dafür, dass die Aktivierung der Endonukleasen unabhängig von den Membranveränderungen ist (Reno et al. 1998).

Die Lipidkomposition der PM von apoptotischen EL4-Zellen ist ein frühes Target von Veränderungen, die durch Ceramide und Tubercidin hervorgerufen werden. PM wurden durch Differentielle- und Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Phospholipide (PL) wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt und photospektrometrisch quantifiziert. Es konnten keine Änderungen in der PL Komposition detektiert werden. Allerdings kam es zu einer Verminderung des gesamten PL-Gehalts bei gleichzeitiger Erhöhung des Cholesteringehalts, so dass die Cholesterin/PL Rate in den apoptotischen Zellen erhöht war. Diese Membranveränderungen finden zu einem frühen Zeitpunkt der Apoptose statt, noch bevor sich mit unterschiedlichen Apoptosetests finale nukleare Veränderungen detektieren lassen. In den PM der apoptotischen Zellen konnte speziell in den mit Ceramiden behandelten Zellen eine dramatische Zunahme des Fettsäuregehaltes nachgewiesen werden. Außerdem nahm der Sättigungsgrad der Fettsäuren zu. Diese Veränderungen der PM bei der Apoptose können zu ihrer Destabilisierung beitragen und Ursache für die morphologischen Veränderungen wie „membrane blebbing“ und „apoptotic body formation“ sein.

Die Lipid- und Fettsäurekomposition sind wichtige Regulatoren für die Zellfunktion und Membranfluidität. Die Fluoreszenzsonde Laurdan wurde für die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Fluidität von isolierten Membranen und ganzen Zellen benutzt durch die Bestimmung der Generalisierten Polarisation (GP). Während sich durch Temperatureffekte und durch das Protein/Lipid Verhältnis der Membranen Unterschiede in der Membranfluidität detektieren ließen, führten die apoptotischen Veränderungen zu keiner Fluiditätsänderung. Das könnte eine wichtige Voraussetzung für die Erhaltung der Membranintegrität bei apoptotischen Prozessen sein.

Die Untersuchung der Apoptose in EL4-Zellen zeigte, dass die Lipidkomposition, der Ceramidmetabolismus und die Variation der Fettsäurespektren schon in frühen apoptotischen Phasen stattfindet und dass Ceramide im Vergleich zu Tubercidin nicht direkt die DNA-Fragmentierung beim programmierten Zelltod ansteuert.

## Literaturliste:

- Andrieu-Abadie N., Carpentier S., Salvayre R., Levade T.:  
*The tumor necrosis factor-sensitive pool of sphingomyelin is resynthesized in a distinct compartment of plasma membrane*  
Biochem. J. 333: 91-97, 1998
- Asch A. S., Barnwell J., Silverstein R. L., Nachman R. L.:  
*Isolation of the thrombospondin membrane receptor*  
J. Clin. Invest. 79: 1054-1061, 1987
- Basha G., Yap P., Penninckx F.:  
*Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining methods for the assessment of tumor cell viability*  
Tumor Biol 17: 354-361, 1996
- Bettaieb A., Pol I., Mansat-De Mas V., Quillet-Mary A., Levande T., Laurent G., Jaffrezou J. P.:  
*Daunorubicin- and mitoxantrone-triggered phosphatidylcholine hydrolysis: implication in drug-induced ceramide generation and apoptosis*  
Mol Pharmacol 55: 118-125, 1999
- Bevers E. M., Comfurius P., Dekkers D. W., Harmsma M., Zwaal R. F.:  
*Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling*  
Lupus 7 Suppl 2: 126-131, 1998
- Bevers E. M., Comfurius P., Dekkers D. W., Harmsma M., Zwaal R. F.:  
*Transmembrane phospholipid distribution in blood cells: control mechanisms and pathophysiological significance*  
Biol. Chem. 379: 973-986, 1998
- Boehringer Mannheim: <http://biochem.roche.com/apoptosis/prod07.htm>
- Boersma A. W. M., Nooter K., Oostrum R. G., Stoter G.:  
*Quantification of apoptotic cells with fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V in chinese hamster ovary cell cultures treated with cisplatin*  
Cytometry 24: 123-130, 1996
- Boesen-de Cock J. G. R., Tepper A. D., de Vries E., van Blitterswijk W. J., Borst J.:  
*CD95 (FAS/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase*  
Journal of Biological Chemistry Vol 273: No 13, 7560-7565, 1998
- Bogin L., Papa M. Z., Polak-Charcon S., Degani H.:  
*TNF-induced modulations of phospholipid metabolism in human breast cancer cells*  
Biochimica et Biophysica Acta 1392: 217-232, 1998
- Cabot M. C., Giuliano A. E., Han T. Y., Liu Y. Y.:  
*SDZ PSC 833, the cyclosporine A analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells*  
Cancer Res 59: 880-885, 1999
- Cifone M. G., Migliorati G., Parroni R., Marchetti C., Millimaggi D., Santoni A., Riccardi C.:  
*Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases*  
Blood 93: 2282-2296, 1999
- Demel R. A., De Kruffy B.:  
*The function of sterols in membranes*  
Biochim. Biophys. Acta 26: 109-132, 1976

- Duvall E., Wyllie A. H., Morris R.G.:  
*Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)*  
Immunology 56, 351-358, 1985
- Endresen P. C., Eide T. J., Aarbakke J.:  
*Cell death initiated by 3-deazaadenosine in HL-60 cells is apoptosis and is partially inhibited by homocysteine*  
Biochem Pharmacol 46 (11): 1893-1901, 1993
- Emoto K., Toyama-Sorimachi N., Karasuyama H., Inoue K., Umeda M.:  
*Exposure of phosphatidylethanolamine on surface of apoptotic cells*  
Exp. Cell Res. 232: 430-434, 1997
- Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L. Henson P. M.:  
*Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*  
J. Immunol. 148: 2207-2216, 1992
- Farschon D. M., Couture C., Mustelin T., Newmeyer D. D.:  
*Temporal phases in apoptosis defined by the actions of Src homology 2 domains, ceramide, Bcl-2, interleukin-1 $\beta$  converting enzyme family proteases, and dense membrane fraction*  
J Cell Biol. 137: 1117-1125, 1997
- Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E. S.:  
*CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*  
J. Biol. Chem. 269: 30761-30764, 1994
- Floch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.:  
*A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues*  
Journal of Biological Chemistry 226: 497-509, 1957
- Gamen S., Anel A., Pineiro A., Naval J.:  
*Caspases are the main executioners of FAS-mediated apoptosis, irrespective of the ceramide signalling pathway*  
Cell Death Differ. 5 (3): 241-249, 1998
- Genestier L., Prigent A. F., Paillot R., Quemeneur L., Durand I., Banchereau J, Revillard J. P., Bonnefoy-Berard N.:  
*Caspase-dependent ceramide production in FAS- and HLA class I-mediated peripheral T cell apoptosis*  
Journal of Biological Chemistry, Vol. 273, No. 9: 5060-5066, 1998
- Goldstein P.:  
*Controlling cell death*  
Science 275: 1081 1997
- Hawkins R. A., Sangster K., Arends M. J.:  
*Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves an oxidative mechanism*  
J. Pathol. 185 (1): 61-70, 1998
- Haimovitz-Friedman A., Kann C., Ehleiter D., Persaud R. S., McLoughlin M., Fuks Z., Kolesnick R.N.:  
*Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis*  
J. Exp. Med. 180: 525-535, 1994
- Hannun Y. A.:  
*Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress*  
Science 274: 1855-1859, 1996
- Hannun Y. A., Bell R. M.:  
*Funktions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation*

Science 243: 500-507, 1989

Härtel S., Ojeda F., Diehl H.:

*Cholesterol induced variations of membrane dynamics related to the induction of apoptosis in mouse thymocytes*

Int. J. Radiat. Biol. 74 (5): 607-615, 1998

Hope M. J., Rodriguez W. V.:

*Membrane Lipids and Model Membrane Systems in Rapid Freeze Fracture and deep etching*

Eds. Severs N. J. und Shotton D. M., Wiley-Liss, Inc., 1995, 235

Jarvis W. D., Fornari F. A. Jr, Browning J. L., Gewirtz D. A., Kolesnick R. N., Grant S.:

*Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diglyceride in human myeloid leukemia cells*

J. Biol. Chem. 269: 31685-31692, 1994

Jarvis W. D., Fornari F. A., Traylor R. S., Martin H. A., Kramer L. B., Erukulla R. K., Bittman R., Grant S.:

*Induktion of apoptosis and potentiation of ceramide-mediated cytotoxicity by sphingoid bases in human myeloid leukemia cells*

J. Biol. Chem. 271: 8275-8284, 1996

Jarvis W. D., Kolesnick R. N., Fornari F. A., Traylor R. S., Gewirtz D. A., Grant S.:

*Induction of apoptotic DNA degradation and cell death by activation of sphingomyelin pathway*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 73-77, 1994

Jessel R.:

*Plasmamembranveränderungen und ihre Korrelation zum Auftreten apoptotischer Merkmale bei der induzierten Apoptose von EL4-Zellen*

Dissertation, Universität Bremen, Januar 1999

Kantrow S. P., Piantadosi C.A.:

*Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition*

Bioch. Bioph. Res. Com. 232: 669, 1997

Karasavvas N., Zakeri Z.:

*Relationships of apoptotic signaling mediated by ceramide and TNF-alpha in U937 cells*

Cell Death Differ 6 (2): 115-123, 1999

Kluck R. M., Bossey-Wetzel E., Green D. R., Newmeyer D. D.:

*The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*

Science 275: 1132-1136, 1997

Kolesnick R. N., Krönke M.:

*Regulation of ceramide production and apoptosis*

Annu. Rev. Physiol. 60: 643-665, 1998

Kovacs P., Hegyesi H., Kohidai L., Nemes P., Csaba G.:

*Effect of C2 ceramide on the inositol phospholipid metabolism (uptake of <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H-serine and <sup>3</sup>H-palmitic acid) and apoptosis-related morphological changes in Tetrahymena*

Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 122: 215-224, 1999

Krippner A., Matsuno-Yagi A., Gottlieb R. A., Babior B. M.:

*Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing Fas-mediated apoptosis*

J. Biol. Chem. 271: 21629-21636, 1996

Lawler J. F., Yin M., Diehl A. M., Roberts E., Chatterjee S.:

*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  stimulates the maturation of sterol regulatory element binding protein-1 in human hepatocytes through the action of neutral sphingomyelinase*

J. Biol. Chem. 273: 5053-5059, 1998

Ledeer R. W., Chakraborty G.:

*Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis*  
Neurochem Res 23 (3): 277-289, 1998

Loennechen T., Moens U., Kildalsen H., Andersen A., Pekvig O.P., Aarbakke J.:  
*Effects of 3-deazaadenosine on apoptosis-related gene transcripts in HL-60 cells*  
Pharmacol Toxicol 81 (5) 199-204, 1997

Mathias S., Kolesnick R.:  
*Ceramide: a novel second messenger*  
Adv. Lipid Res. 25: 65-90, 1993

Mathias S., Younes A., Kann C., Orlow I., Joseph C., Kolesnick R. N.:  
*Activation of the Sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cell-free system by IL-1 $\beta$*   
Science 259: 519, 1993

McVey E., Yguerabide J., Hanson D. C., Clark W. R.:  
*The relationship between plasma membrane lipid composition and physikal-chemical properties I. Fluorescence polarisation studies of fatty acid-altered EL4 tumor cell membranes*  
Biochimica et Biophysica Acta 642: 106-118, 1981

Messam C. A., Pittman R. N.:  
*Asynchrony and commitment to die during apoptosis*  
Exp. Cell Res. 238: 389-398, 1998

Mosmann T.:  
*Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*  
Journal of Immunological Methods 65: 55-63, 1983

Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A.:  
*Programmed cell death induced by ceramide*  
Science 259: 1769-1771, 1993

Obradors M. J. M., Sillence D., Howitt S., Allan D.:  
*The subcellular sites of sphingomyelin synthesis in BHK cells*  
Biochimica et Biophysica Acta 1359: 1-12, 1997

Okazaki T., Kondo T., Kitano T., Tashima M.:  
*Diversity and complexity of ceramide signalling in apoptosis*  
Cell Signal 10: 685-692, 1998

Peterson G. L.:  
*Asimplification of the protein assay of Lowry et al. which is more generally applicable*  
Analytical Biochemistry 83: 346-356, 1977

Pizer E. S., Chrest F. J., DiGiuseppe J. A., Han W. F.:  
*Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines*  
Cancer Res. 58 (20): 4611-4615, 1998

Poon R., Clark W. R.:  
*The Relationship between Plasma Membrane Lipid Composition and Physikal-Chemical Properties III. Detailed Physikal and Biochemical analysis of fatty acid-substituted EL4 Plasma membranes*  
Biochimica et Biophysica Acta 689: 230-240, 1982

Pushkareva M., Obeid L. M., Hannun Y. A.:  
*Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression*  
Immunol. Today 294-297, 1995

Reno F., Burattini S., Rossi S., Luchetti F., Columbaro M., Santi S., Papa S., Falcieri E.:  
*Phospholipid rearrangement of apoptotic membrane does not depend on nuclear activity*  
Histochem Cell Biol 110 (5) 467-476, 1998

- Savill, J. S. et al.:  
*Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis*  
Immunol. Today 14: 131-136, 1993
- Separovic D., Mann K. J., Oleinick N. L.:  
*Association of ceramide accumulation with photodynamic treatment-induced cell death*  
Photochemistry and Photobiology 68(1): 101-109, 1998
- Shirahama T., Sakakura C., Sweeney E. A., Ozawa M., Takemoto M., Nishiyama K., Ohi Y., Igarashi Y.:  
*Sphingosine induces apoptosis in androgen-independent human prostatic carcinoma DU-145 cells by suppression of bcl-X<sub>L</sub> gene expression*  
FEBS 407: 97-100, 1997
- Sillence D. J., Allan D.:  
*Evidence against an early signalling role for ceramide in Fas-mediated apoptosis*  
Biochem. J. 324: 29-32, 1997
- Simon K., Van Meer G.:  
*Lipid sorting in epithelial cells*  
Biochemistry 27: 17, 6197-6202, 1988
- Singer S. A., Nicolson G. L.:  
*The fluid mosaik model of the structure of the cell membranes*  
Science 173: 720-731, 1972
- Spinedi A., Bartolomeo S. D., Piacentini M.:  
*Apoptosis induced by N-hexanoylsphingosine in CHP-100 cells associates with accumulation of endogenous ceramide and is potentiated by inhibition of glucocerebroside synthesis*  
Cell Death Differ 5 (9): 785-791, 1998
- Suzuki A., Iwasaki M., Kato M., Wagai N.:  
*Sequential operation of ceramide synthesis and ICE cascade in CPT-11-initiated apoptotic death signalling*  
Exp. Cell Res.233:41-47, 1997
- Tewari M., Telford W. G., Miller R. A., Dixit V. M.:  
*CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis*  
J. Biol. Chem. 270: 22705-22708, 1995
- Verheij M., Bose R., Lin X. H., Yao B., Szabo E., Zon L. I., Kyriakis J. M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Kolesnick R. N.:  
*Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis*  
Nature 380: 75-79, 1996
- Van Meer G., Stelzer E. H. K., Wijnaendts-van-Resandt R. W., Simons K.:  
*Sorting of sphingolipids in epithelia (Madin-Darby Canine Kidney) cells*  
J of Cell Biology 105: 1623-1635, 1987
- Wakade T. D., Palmer K. C., Mc Cauley R., Przywara D. A., Wakade A. R.:  
*Adenosine-induced apoptosis in chick embryonic synthetic neurons: a new physiological role for adenosine*  
Physiol (Lond) 488 (Pt 1):123-138, 1995
- Watts J. D., Gu M., Patterson S. D., Aebersold R., Polverino A. J.:  
*On the complexities of ceramide changes in cells undergoing apoptosis: lack of evidence for a second messenger function in apoptotic induction*  
Cell Death Differ. 6 (2): 105-114, 1999
- Williams J. R., Leaver H. A., Ironside J. W., Miller E. P., Whittle I. R., Gregor A.:



*Apoptosis in human primary brain tumors: actions of arachidonic acid*  
Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 58 (3): 193-200, 1998

Williamson P., Schlegel R. A.:

*Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells*  
Mol. Membr. Biol. 11: 199-216, 1994

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T. I., Jones D. P., Wang X.:

*Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*  
Science 275: 1129-1132, 1997

Yen C. L., Mar M. H., Zeisel S. H.:

*Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of caspase*

FASEB J 13: 135-142, 1999

Zah X., Pierini L. M., Leopold P. L., Skiba P. J., Tabas I., Maxfield F. R.: *Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent Endocytosis*

Journal of Cell Biology, Vol. 140, No. 1: 39-47, 1998

Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudi D., Macho A., Hirsch T., Susin S. A., Petit P. X., Mignotte B., Kroemer G.:

*Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*

J. Exp. Med. 182: 367-377, 1995

# Anhang A

## Fettsäurespektren

Für die Auswertung der Fettsäurespektren wurden die einzelnen Fettsäuren in 4 Fettsäureklassen unterteilt:

### Hauptfettsäuren:

C16:0, C18:0, C18:1

### Gesättigte Fettsäuren:

C12:0, C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C24:0

### Einfach ungesättigte Fettsäuren:

C16:1, C17:1, C18:1, C20:1

### Mehrfach ungesättigte Fettsäuren:

C18:2, C18:3, C20:4

SYMBOL	Kontrolle µg/mg	Tubercidin µg/mg	Ceramid µg/mg
C14:0	1,84	*	6,59
C16:0	32,9	121,86	135,82
C16:1, cis/trans	*	2,62	2,94
C17:0	0,55	0,7	0,83
C17:1, cis-10	*	2,38	1
C18:0	17,85	112	164,87
C18:1, cis-9	9,36	106,33	121,21
C18:1, trans-9	1,97	21,08	19,88
C18:2, cis-9, 12	2,61	5,66	5,89
C18:3, cis-6, 9, 12	*	4,94	*
C20:1, cis-11	*	2,33	3,56
C20:4, cis-5, 8, 11,14	2,6	9,77	7,7
C24:0	*	8,43	6,39
Summe	69,68	398,1	476,68

Tabelle 5.1: Fettsäuren aus der PM-Fraktion pro mg Protein (\*= unterhalb der Nachweisgrenze)

KETTENLÄNGE	Kontrolle [%]	Tubercidin [%]	Ceramid[%]
C 14	2,64	*	1,38
C 16	47,22	31,27	29,11
C 17	0,79	0,77	0,38
C 18	45,62	62,8	65,42
C 20	3,73	3,04	2,36
C 24	*	2,12	1,34
Hauptfettsäuren	86,27	83,45	88,51
gesättigte FS	76,26	61,04	65,98
einfach ungesättigte FS	16,26	33,85	31,17
mehrfach ungesättigte FS	7,48	5,11	2,85

Tabelle 5.2: Kettenlänge und Sättigungsgrad der Fettsäuren aus der PM-Fraktion in Prozent auf den Gesamtfettsäuregehalt bezogen (\*= unterhalb der Nachweisgrenze)

SYMBOL	Kontrolle µg/mg	Tubercidin µg/mg	Ceramid µg/mg
C12:0	*	0,08	*
C16:0	10,54	5,65	6,43
C16:1, cis/trans	0,23	0,07	0,1
C17:1, cis-10	0,22	*	*
C18:0	8,79	4,21	5,1
C18:1, cis-9	8,17	4,52	4,98
C18:1, trans-9	1,39	0,74	0,77
C18:2, cis-9, 12	0,45	0,21	0,35
C20:1, cis-11	0,54	0,36	*
C20:4, cis-5, 8, 11,14	*	0,33	*
C24:0	0,52	*	0,37
Summe	30,85	16,16	18,1

Tabelle 5.3: Fettsäuren aus der Mikrosomen-Fraktion pro mg Protein (\*= unterhalb der Nachweisgrenze)

KETTENLÄNGE	Kontrolle [%]	Tubercidin [%]	Ceramid [%]
C 12	*	0,5	*
C 16	34,91	35,4	36,08
C 17	0,75	*	*
C 18	60,94	59,9	61,88
C 20	1,75	4,27	*
C 24	1,69	*	2,04
Hauptfettsäuren	89,14	88,99	91,22
gesättigte FS	64,34	61,5	65,75
einfach ungesättigte FS	34,2	35,62	32,32
mehrfach ungesättigte FS	1,46	3,3	1,93

Tabelle 5.4: Kettenlänge und Sättigungsgrad der Fettsäuren aus der Mikrosomen-Fraktion in Prozent auf den Gesamtfettsäuregehalt bezogen (\*= unterhalb der Nachweisgrenze)

## Anhang B

### Chemikalien und Bezugsquellen

Agarose	Serva
Annexin V-FITC	Boeringer Mannheim
Bromphenolblau	ICN Biomedicals
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merk
C <sub>2</sub> -Ceramid	Alexis
C <sub>6</sub> -NBD-Ceramide	Molecular Probes
DAPI	MoBiTec
DMEM	Gibco
Dimethylsulfoxid	Janssen
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol	Riedel-de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum	Biochrom
Glucose	Janssen
Glutamin	Sigma
Hepes	Janssen
Hydrazine Dehydrochlorid	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Riedel-de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Laurdan	Molecular Probes
Methanol	Fluka
Molybdatblau	Sigma
MTT	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumcitrat	Merck
Natriummolybdat	Riedel
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin	Boeringer Mannheim
Phenol	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
RNAse	Boeringer Mannheim
Streptomycin	Boeringer Mannheim
Sucrose	Janssen
Tris	Sigma
Triton X-100	Serva
Trypanblau	Flow Laboratories
Tubercidin	Sigma

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst A. Diehl für die Überlassung des Themas und die Freizügigkeit bei der Bearbeitung. Durch seine wissenschaftlichen Kontakte und sein Interesse an interdisziplinären Fragestellungen wurde unsere Arbeitsgruppe stets von nationalen und internationalen Gastwissenschaftlern besucht. Durch diese interessante und offene Arbeitsatmosphäre wird mir meine Zeit in Bremen stets in angenehmer Erinnerung bleiben.

Herrn PD Dr. Klaus Brandenburg vom Forschungszentrum Borstel danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Dr. Swetlana Tichonwa verpflichtet. Die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit ihr hat mir sehr viel Spaß gemacht. Mit unermüdlichem Einsatz hat sie mir viele zellbiologische und biochemische Fragen und Probleme nähergebracht und war maßgeblich bei der Entwicklung, Durchführung und Optimierung der Experimente beteiligt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Christina Kenst und Frau Renate Matzullo, die durch ihren Einsatz für einen reibungslosen Laborbetrieb sorgten, die Zellkulturen pflegten und auch bei vielen Experimenten wichtige Teilergebnisse bereitstellten.

Für zahlreiche wertvolle Diskussionen und kreative Unterstützung bedanke ich mich bei meinen Weggefährten Herrn Dr. Robert Jessel und Dr. Steffen Härtel.

Auch bei allen anderen Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe Biophysik möchte ich mich für das gute Arbeitsklima bedanken. Neben den bereits genannten Personen geht mein Dank an Frau Dr. Maria Engelke, Frau Dr. Michaela Zorn-Kruppa, Frau Bärbel Bödeker und Herr Jürgen Gating.

Frau Dr. Anja Nenninger vom Zentrum für Umweltforschung und Umwelttechnologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft am Laser Scan Mikroskop.

Frau Dr. Kirstin Brack vom Institut für Virologie danke ich für die Unterstützung bei der Untersuchung der DNA-Ladder und den FACS-Messungen.

## Publikation und Tagungsbeiträge

K. Popp; H. A. Diehl:

*Fluorescence label partition in doped phospholipid monolayers*

XXIIth International Biophysik Congress

11.-16. August 1996, Amsterdam

K. Popp; H. A. Diehl:

*Interaction of cytochrom c with phospholipids*

Second Conference of Fluorescence Microscopy and Fluorescence Probes

9.-12. April 1997, Prag

K. Popp; S. Tichonowa; H. A. Diehl:

*Untersuchungen von Ceramid- und Adenosinanloga im Apoptosispfad von T-Zellen*

1.Symposium Bremer Kliniken / Universität Bremen: Medizinische Forschung und  
Gesundheitswissenschaften in Bremen

3.-4. Juli 1998, Universität Bremen

# Lebenslauf und Bildungsgang

von Katja Popp

Geburt	22.02.1969		Bremerhaven
Schulbildung	1975 – 1979	Grundschule	Langen
	1979 – 1981	Orientierungsstufe	Langen
	1981 – 1985	Gymnasium	Langen
	1985 – 1988 Abitur	Fachgymnasium –Technik–	Cuxhaven
Studium	1988 – 1994	Christian-Albrechts-Universität	Kiel
	Diplom-Physikerin ■ Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel „Untersuchung amphiphiler Moleküle an der Grenzfläche Wasser-Luft“		
	1994 – 1998	Institut für experimentelle Physik	Bremen
	Wissenschaftliche Mitarbeiterin ■ Dissertationsthema: „ <b>Untersuchung von Ceramid- und Adenosinanalogen bei der Apoptose von EL4-Zellen</b> “		
Fernstudium	1996 – 1998	Medizinische Physik und Technik	Kaiserslautern
	„Med. Strahlenphysik“ ■ Strahlenschutzkurs		
Berufserfahrung	1998 – 2000	Strahlentherapie und Nuklearmedizin	Lübeck
	Medizinphysikerin ■ Strahlenschutzkurs (spezial Kurs für Beschleuniger)		