

Hannah Jaritz

**Ceramidbildung in humanen Melanomzellen unter dem
Einfluss oxidierter Phospholipide.**

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

an der Fakultät für Technische Chemie, Verfahrenstechnik und Biotechnologie der

Technische Universität Graz

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Albin Hermetter

Institut für Biochemie, Technische Universität Graz

2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Albin Hermetter für seine Unterstützung. Er hat mich während meiner praktischen Arbeit am Institut umsichtig begleitet und mir beim korrekten Verfassen dieser wissenschaftlichen Arbeit sehr geholfen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Mag. Dr. Claudia Ramprecht für ihre Anleitung und Hilfe bei der praktischen Arbeit. Sie war immer sofort zur Stelle wenn ich ihren Rat benötigt habe. Die Zusammenarbeit mit ihr war in fachlicher und persönlicher Hinsicht eine Bereicherung.

Außerdem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Hermetter für ihre Unterstützung und Hilfestellung sowie das gute Arbeitsklima.

Mein Dank gilt auch meiner Familie die mich, in jedweder Hinsicht, während meines gesamten Studiums unterstützt hat.

Zusammenfassung

Oxidierter Phospholipide (oxPL) entstehen aus mehrfach ungesättigten Phospholipiden (PL) unter Einwirkung von oxidativem Stress. Das oxidierte Phospholipid 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (POVPC) ist durch seine Aldehyd-funktion in der Lage kovalente Addukte mit Proteinen und Amino-Phospholipiden zu bilden.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass längeres Einwirken hoher oxPL-Konzentrationen in vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen Apoptose auslöst.

Ceramid spielt im oxPL-vermittelten Zelltod in vaskulären glatten Muskelzellen und Makrophagen als Apoptose-Mediator eine Schlüsselrolle. Zuletzt wurde gezeigt, dass verschiedene oxPL auch in der Lage sind Apoptose in kultivierten Melanomzellen auszulösen.

Ziel dieser Diplomarbeit war es festzustellen, ob die Toxizität von oxPL, speziell von POVPC, in Melanomzellen mit der Bildung von Ceramid assoziiert ist. Zu diesem Zweck wurden Aktivität und/oder Expression der Ceramid-synthetisierenden Enzyme saure Sphingomyelinase (aSMase) und Ceramidsynthase (CerS) in kultivierten Melanom-Zelllinien unterschiedlicher Stadien bestimmt. Zusätzlich wurden im Rahmen einer Lipidomanalyse die durch POVPC induzierten Ceramid- und Sphingolipidmuster in Melanomzellen analysiert. Die Inkubation mit POVPC führte zu einem Anstieg der aSMase-Aktivität und des Ceramidlevels in Melanomzellen. Die Expression der untersuchten CerS wurde durch die Inkubation mit POVPC nicht beeinflusst. In einigen, jedoch nicht in allen Zelllinien korrelierten die Aktivität der aSMase, die Aufnahme von oxPL in die Zelle, das Ausmaß der Apoptose und die Bildung distinkter Ceramid-Spezies positiv. Die Rolle der Ceramidbildung bei der ox-PL induzierten Zelltoxizität ist noch zu klären.

Abstract

Oxidized phospholipids (oxPL) are generated from polyunsaturated phospholipids under conditions of oxidative stress. The oxPL 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POVPC) contains an aldehyde-function at its *sn*-2 position which can undergo covalent reactions with proteins and amino-phospholipids. Former studies showed, that prolonged incubation with high concentrations of oxPL initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells and macrophages. In both cell types, the lipid messenger ceramide played a key role in initiation and mediation of apoptosis. Recently it was shown that oxPL also induce programmed cell death in different cultured melanoma cell lines. It was the aim of this thesis to find out whether the toxic effects of POVPC on melanoma cells are associated with the formation of ceramide in the cells. Therefore, activation/ expression of the ceramide generating enzymes acid sphingomyelinase (aSMase) and ceramide synthase (CerS) were measured in four different melanoma cells lines. Additionally, all melanoma cell lines were subjected to lipidome analysis to determine the POVPC-induced changes of ceramide- and sphingolipid-patterns in the cells. POVPC induced an increase of aSMase activity and ceramide levels. There was no change in the expression levels of the CerS. In some but not all investigated cell lines the activity of aSMase, cellular uptake of oxPL, apoptosis and generation of distinct ceramide species are positively correlated. The role of ceramide formation in POVPC-induced toxicity still remains to be determined.

Inhalt

Abkürzungen	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Hautkrebs und Malignes Melanom	8
1.2 Apoptose	14
1.3 Ceramid	17
1.4 Oxidativer Stress.....	22
1.5 LDL und oxLDL	23
1.5 Oxidierte Phospholipide	25
2 Materialien und Methoden	28
2.1.Zellkultur	28
2.2 Aufnahme von Mikroskopbildern der verschiedenen Zelllinien	30
2.3 Expressionsanalyse von Ceramid Synthasen nach Stimulation mit POVPC	32
2.4 Bestimmung der aSMase Aktivität	38
2.5 Bestimmung des Ceramid- und Sphingomyelin- Musters.....	40
3 Resultate.....	44
3.1 Effekte oxidierter Phospholipide auf die Zellmorphologie	45
3.2 Effekte oxidierter Phospholipide auf die Ceramid Synthese.....	50
3.3 Lipidomanalyse.....	63
4 Diskussion	72
5 Referenzen	77
Eidesstattliche Erklärung.....	83

Abkürzungen

4ABA	4- Aminobenzamidin	PAF	Platelet activating factor
aSMase	Acid Sphingomyelinase (saure Sphingomyelinase)	PBS	Phosphate buffered saline
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	PC	Phosphatidylcholin
BID	BH3 interacting-domain death agonist (BID)	PGPC	1-plamitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
Cer	Ceramid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
CerS	Ceramid synthase	PGPC	1-plamitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DD	Death domain	POVPC	1-plamitoyl-2-(5-oxoaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholin
DED	Death effector domain	PS	Phosphatidylserine
DISC	Death Inducing Signalling Complex	PUFA	Polyunsaturated fatty acid
DTT	1,4- Dithiothreitol	RGP	Radial growth phase
EtOH	Ethanol	RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium
FADD	Fas associated death domain	Medium	
FACS	Fluorescence activated cell sorting	SM	Sphingomyelin
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kalbsserum)	STS	Staurosporin
FITC	Fluorescein isothiocyanate	TAG	Triacylglycerol
FS	Fettsäure	VGP	Vertical growth phase
HPLC	High-performance liquid chromatography	VSMC	Vascular smooth muscle cells
HPO	Horse Radish Peroxidase		
LDL	Low density lipoprotein		
MAPK	Mitogen-activated protein kinase		
mmLDL	Minimally modified LDL		
NBD	N-7-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol		
NBD-SM	N-7-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol-sphingomyelin		
oxLDL	Oxidized low density lipoprotein		
oxPL	Oxidized phospholipid		

1 Einleitung

Oxydierte Phospholipide (oxPL) entstehen aus mehrfachungesättigten Phospholipiden (PL) unter oxidativem Stress. OxPL sind zytotoxische Verbindungen und Bestandteile von oxidiertem low-density Lipoprotein (oxLDL) und Membranen. Infolge ihrer toxischen Wirkung auf die Zellen der Arterienwand (Endothelzellen, Makrophagen) tragen oxPL zu den atherogenen Eigenschaften von oxLDL bei. (Fruhwirth *et al.*, 2007) Durch längere Einwirkung hoher oxPL-Konzentrationen wird in VSMC (vascular smooth muscle cells) (Loidl *et al.*, 2004) und Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) Apoptose ausgelöst.

Mittlerweile wurde gefunden, dass oxydierte Phospholipide auch einen cytotoxischen Effekt auf Krebszellen haben. Ramprecht *et al.* (Dissertation, TU Graz, 2013) haben gezeigt, dass verschiedene oxPL in der Lage sind, Apoptose in kultivierten Melanomzellen auszulösen. Für die durch oxPL vermittelte Apoptose in VSMC (Loidl *et al.*, 2004) und Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) spielt Ceramid als Apoptose-Mediator eine wichtige kausale Rolle.

Ziel dieser Diplomarbeit war es festzustellen, ob die Toxizität von oxPL, speziell von POVPC, in Melanomzellen mit der Bildung von Ceramid assoziiert ist. In VSMC (Loidl *et al.*, 2004) und Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) hängt der Apoptose-stimulierende Anstieg von Ceramid mit der oxPL-induzierten Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (aSMase) zusammen. Um abzuklären ob dies auch bei Melanomzellen der Fall ist, wurde eine Bestimmung von Aktivität und/oder Expression der Ceramid-synthetisierenden Enzyme aSMase und CerS durchgeführt. Zusätzlich wurden im Rahmen einer Lipidomanalyse die durch POVPC induzierten Ceramid- und Sphingolipidmuster in Melanomzellen analysiert. Verschiedene Ceramid-Species (mit unterschiedlichen Fettsäureresten) haben verschiedene Membraneigenschaften und somit unterschiedlichen biologische (toxische) Effekte. (Christie, 2012)

1.1 Hautkrebs und Malignes Melanom

Unter Hautkrebs werden verschiedene bösartige Wucherungen des Epithelgewebes (Epidermis, Basalzellschicht, Dermis,) zusammengefasst. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Formen in ihrem zugrunde liegendem Zelltyp und Aggressivität. Der Tumorentstehung gehen unterschiedliche DNA-Mutationen in den verschiedenen Zelltypen der Haut voraus. Sowohl für weißen (Basalzellenkarzinom, Plattenepithelkarzinom) als auch schwarzen (malignes Melanom) Hautkrebs gilt übermäßige UV-Strahlung als Hauptrisikofaktor. Auch radioaktive Strahlung und Viren erhöhen die Mutationsrate der in den unterschiedlichen Hautzelltypen enthaltenen DNA. Das Basalzellenkarzinom ist ein semi-maligner Tumor, der aus Basalzellen entsteht und kaum dazu neigt Metastasen auszubilden. Das Plattenepithelkarzinom entwickelt sich aus den Zellen der Stachelzellschicht der Haut und wird vor allem bei älteren Menschen durch chronische Hautschädigung (UV-Strahlen) ausgelöst. Die aggressivste Form des Hautkrebses ist das maligne Melanom oder auch schwarzer Hautkrebs. Das maligne Melanom besteht aus entarteten Melanozyten und kann entweder *de novo*, aus nicht mutierten Melanozyten, oder durch maligne Transformation aus einem gutartigen Hauttumor (Nävus=Muttermal) entstehen. (Szeimis *et al.*, 2010)

Mit Hilfe der „ABCD-Regel“ kann man ein malignes Melanom optisch von einem gewöhnlichen Nävus unterscheiden. Wobei „ABCD“ für Asymmetrie, Begrenzung, Color und Durchmesser steht. Ist ein Muttermal asymmetrisch (nicht wie gewöhnlich rund oder oval) aufgebaut, gibt es keine klare Abgrenzung zum umliegenden Gewebe oder liegt eine unregelmäßige Färbung des Nävus vor kann das auf eine bösartige Veränderung hinweisen. Weiter sollten Muttermale, die eine Größe von 5 mm überschreiten grundsätzlich beobachtet werden. (Friedman *et al.*, 1985)

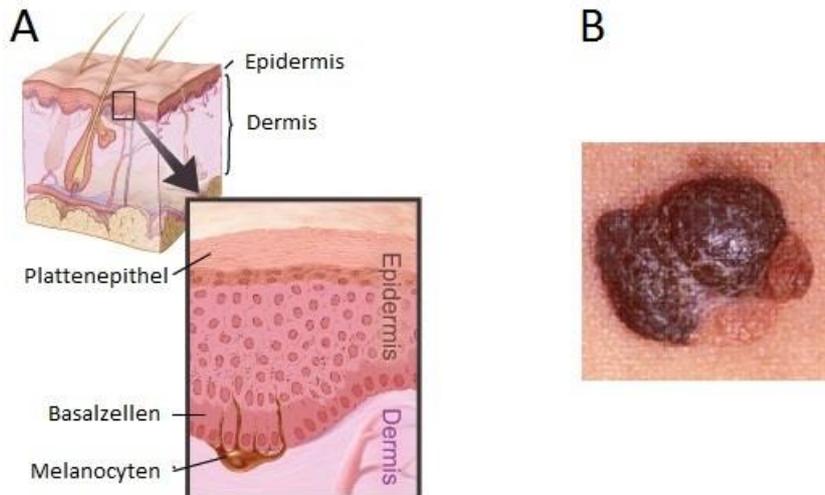


Abbildung 1: **A, Aufbau der menschlichen Haut.** Die Epidermis bildet die oberste Schicht der menschlichen Haut und fungiert als wasserdichte Barriere. Eingebettet in die Basalschicht der Epidermis liegen die Melanocyten, die Pigmentzellen der Haut. Die Dermis hat eine stützende Funktion (Kollagen, Fibroblasten,...). Die darunter liegende Subkutis besteht aus Bindegewebe, Adipocyten, Lymphgefäßen, Blutgefäßen. **B, Malignes Melanom.** Charakteristisch für ein malignes Melanom sind eine asymmetrische Form, fehlende klare Abgrenzung zum umliegenden Gewebe und eine unregelmäßige Färbung der entarteten Zellen. (Bild A von Don Bliss/ National Cancer Institute) (Bild B von Krebsgesellschaft.de, Klinik für Dermatologie und Dermatologische Allergologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Ein malignes Melanom durchläuft mehrere Entwicklungsstufen: vom Stufe 1 Nävus über eine intermediäre Stufe 2, bei der sich das Melanom auf die Epidermis beschränkt („in situ“-Melanom) oder es bereits zu einer Mikroinvasion der Dermis (invasive RGP-Phase) kommt, bis zur Stufe 3, dem metastasierendem Melanom. Dabei unterscheidet man zwischen der radiären Wachstumsphase (RGP), bei der sich das Melanom horizontal in der Epidermis ausbreitet und der vertikale Wachstumsphase (VGP). Im Zuge der vertikalen Wachstumsphase dringt das Melanom in tiefere Hautschichten (subkutanes Gewebe) ein und es kommt zu einer Ausbildung von Metastasen. (Meier *et al.*, 1998)

Metastasierende Melanomzellen unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil und den daraus resultierenden Eigenschaften von differenzierten Melanozyten. Sie sind in der Lage die umliegenden Gewebstrukturen durch verschiedene Proteasen proteolytisch abzubauen, um aus dem Primärtumor in die Lymphbahnen und weiter über den Blutkreislauf in Lunge, Leber und Hirn gelangen zu können. Weiter sorgen verschiedene Adhäsionsmoleküle dafür,

dass Metastasen an anderen Zellen und Matrixproteine binden können. (Szeimies *et al.*, 2010)

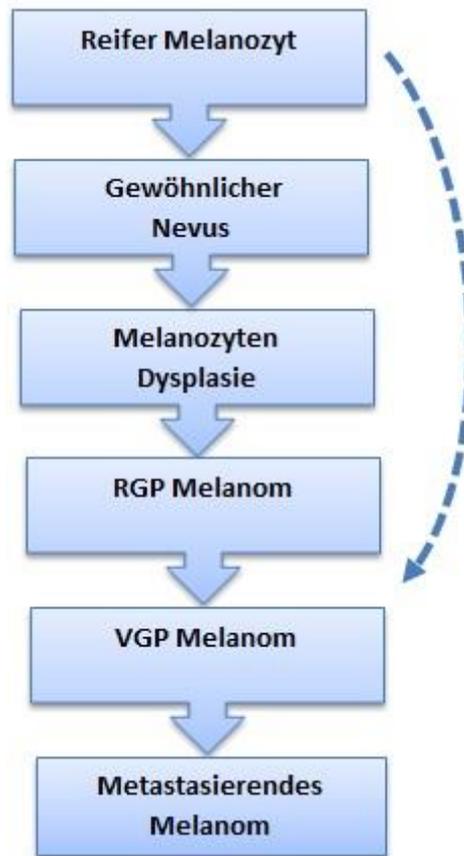


Abbildung 2: **Melanom-Entwicklung.** In vielen Fällen entwickelt sich ein Melanom schrittweise aus einem gewöhnlichen Nävus. Dabei kann man in 35% der Fälle den zugrunde liegenden Nävus histologisch identifizieren. Melanome können aber auch direkt aus erwachsenen Melanozyten entstehen. (Meier *et al.*, 1998)

Melanom Signalwege

Die Heilungsaussichten bei einem malignen Melanom sind abhängig von der Entwicklungsstufe des Tumors. Bei radial wachsenden Melanomen mit geringer Dicke, die noch nicht die Basalmembran durchbrochen haben („in situ“-Melanom) sind die Heilungschancen sehr hoch und liegen bei circa 95%. Hat der Tumor jedoch bereits angefangen Metastasen freizusetzen, sinkt die Überlebensrate rapide ab. Bis dato gibt es noch keine effektiven Behandlungsmethoden für metastasierende maligne Melanome. (Hocker *et al.*, 2008)

In entarteten Melanomzellen ist das in gesunden Melanocyten agierende Signalling-Netzwerk gestört. Durch Mutationen an verschiedenen Stellen dieser zellulären Kommunikation werden Proliferation, Überleben, Zellwachstum und Immortalisierung des Tumors gesichert. Es wurden drei zusammenhängende Signalkaskaden identifiziert die hauptsächlich an der Melanomentwicklung beteiligt sind (siehe Abb. 3) (Hocker *et al.*, 2008).

Das RAS Signalling-Netzwerk inkludiert die MAPK und PI3 Kinase/AKT Signalkaskaden und ist für Proliferation, Überleben und Progression der Zelle verantwortlich (siehe Abb. 3). In 90% der Melanome sind eines oder beide der zwei Schlüsselgene des MAPK-Signalpfads, NRAS und BRAF, mutiert. NRAS, gehört zur RAS-Familie, und fungiert als Onkogen. In circa 20% der Melanome finden sich onkogene NRAS-Mutationen (Hocker *et al.*, 2008). Es wurde festgestellt, dass Körperareale, die UV-Strahlen (Sonne) oft bis ständig ausgesetzt sind, auch eine höhere Mutationsrate des NRAS Gens aufweisen (Jiveskog *et al.*, 1998). Häufige NRAS Mutationen kommen aber auch in angeborenen Muttermalzellen vor und sind somit unabhängig von Sonnenexposition (Bauer *et al.*, 2007). BRAF ist mit einer Mutationsrate von circa 60%, das am häufigsten mutierte Gen in Melanomen. (Hocker *et al.*, 2008)

NRAS steht am Anfang der PI3 Kinase/AKT Signalkaskade. Die Expression von PI3 Kinase und AKT steigt in Melanomzellen während der Entwicklung vom gutartigen Nävus zum metastasierenden Melanom. (Hocker *et al.*, 2008) PTEN reguliert den PI3K Signalweg und ist eines der Schlüssel-Tumorsuppressorgene (TSGs) in Melanomen. PTEN blockiert das PI3K-Signalling, verlängert den Arrest des Zellzyklus und erhöht die Expression pro-apoptotischer Proteine beziehungsweise verringert die Expression anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie. Es wurde gezeigt, dass inaktivierende Mutation in PTEN und aktivierende Mutationen in NRAS miteinander korrelieren und vermutlich funktionell zusammenhängen. (Hocker *et al.*, 2008)(Tsao *et al.*, 2000)

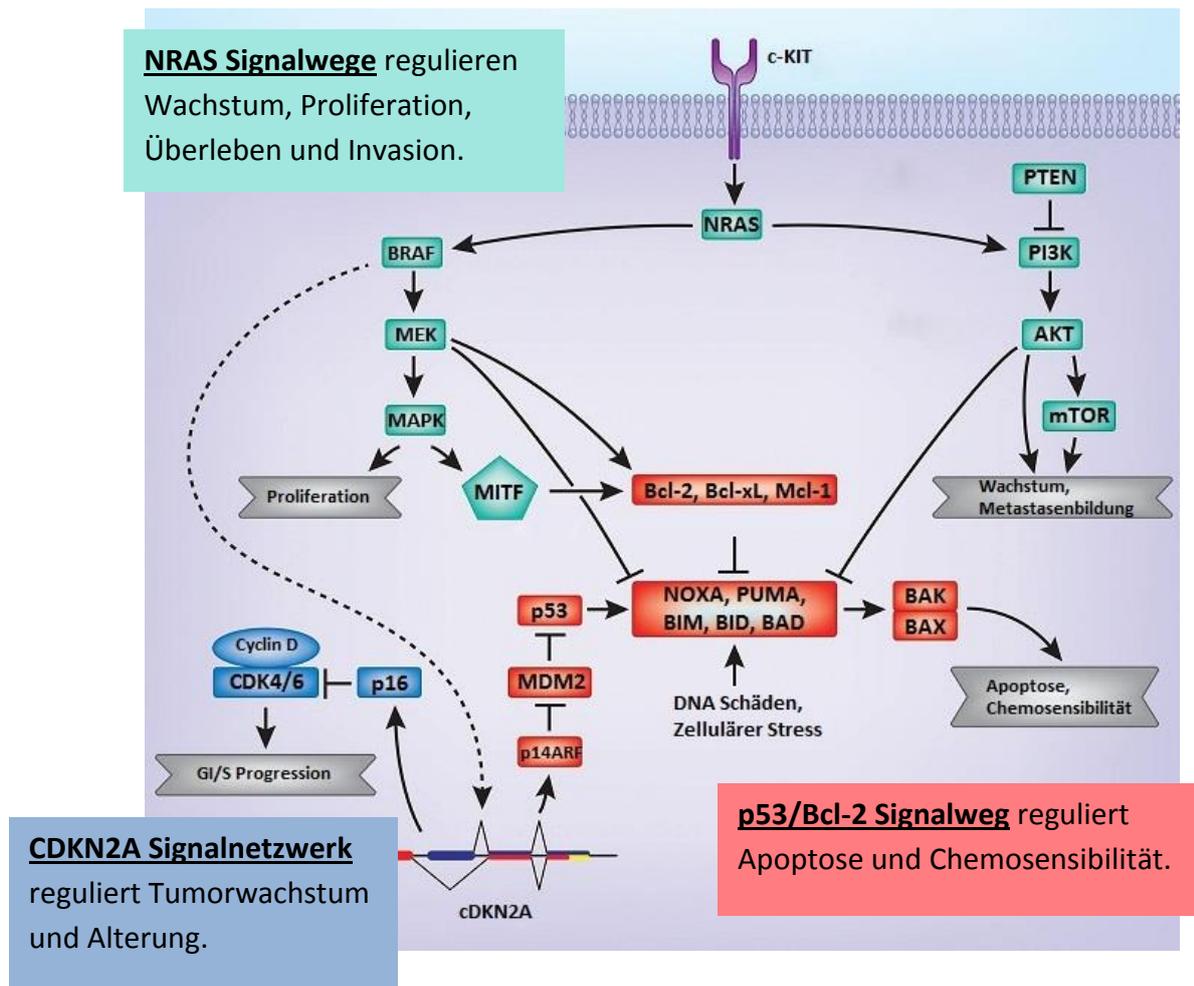


Abbildung 3: **NRAS Signal-Wege**. Eine vereinfachte Darstellung der verschiedenen Signalwege die an Melanom-Entwicklung, Überleben und Alterung beteiligt sind. (Bild von Hocker TL, Singh MK, und Tsao H. (2008) Melanoma Genetics and Therapeutics Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *Journal of Investigative Dermatology*. 128, 2575-2595.)

Im nicht-mutierten Zustand beschränkt das CDKN2A/CDK4 Netzwerk das Zell- bzw. Tumorwachstum und fördert die Zellalterung. CDKN2A fungiert als Tumorsuppressoren in Melanom-Zellen. In vielen Krebsarten ist das CDKN2A Gen durch Mutationen in seinen Funktionen eingeschränkt. CDKN2A codiert für zwei Proteine die in Melanom-Wachstum und Überleben eingreifen: p16 und p14. P16 verhindert die Phosphorylierung des Rb-Proteins. RB-P bindet dann an den Transkriptionsfaktor E2F und verhindert so das Weiterwandern im Zellzyklus von G₁ zu S (Wachstumsphase zu Synthesephase). Das Protein p14 verhindert den Abbau von p53. Eine Akkumulation von p53 hat zur Folge, dass der Zellzyklus stoppt und proapoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie aktiviert werden. Ist CDKN2A, so wie häufig in

Melanomen der Fall, mutiert fehlen p16 und p14. Die Zellen teilen sich unkontrolliert weiter (kein Verbleiben im G₁-Stadium) und der durch p53 vermittelte pro-apoptotische Effekt bleibt aus. (Hocker *et al.*, 2008)

Mutationen im Bcl-2/TP53(p53)-Signalnetzwerk verhindern Apoptose und bewirken eine Resistenz gegen Chemotherapie. TP53 initiiert das DNA-Reparatursystem oder Apoptose in Gegenwart von zellulärem Stress. Zwar ist p53 in Melanomen, im Gegensatz zu anderen Krebsformen, eher selten direkt mutiert, jedoch ist es oft indirekt durch andere Mutationen (CDKN2A->p14) in seiner Funktion gehemmt. Aktiviertes p53 induziert die Expression verschiedener pro-apoptotischer Gene der Bcl-2 Familie (BAD, NOXA, PUMA,...). (Hocker *et al.*, 2008) (Henry *et al.*, 2002)

Viele Signalwege, auch die MAPK und PI3K-Signalkaskade, werden durch die Aktivierung von c-Kit (=stem cell factor receptor tyrosine kinase) initiiert. Es wird diskutiert ob KIT als seltenes, unabhängiges Onkogen in Melanomen fungiert, da KIT-Mutationen eher selten sind. (Hocker *et al.*, 2008)

Therapeutische Targets und Apoptose

Die zuvor beschriebenen Melanom-Signalwege stellen aufgrund ihrer Funktion in Überleben, Wachstum und Proliferation des Tumors auf genetischer Ebene potentielle therapeutische Targets dar. NRAS ist beispielsweise ein idealer Angriffspunkt für Target-gesteuerte Therapien, da es in 90% der Melanome mutiert ist und diese Mutationen nachweislich eine onkogene Wirkung ausüben. Auch BRAF und MEK (Stufe in MAPK-Signalkaskade) stellen potentielle Targets für die Therapie von Melanomen dar. Weiter besteht auch die Möglichkeit die, durch Mutation ausgeschaltete, Tumorsupressor-Wirkung wiederherzustellen. Allerdings hat es sich als einfacher herausgestellt die Funktion von Onkogenen zu unterdrücken. Von besonderem Interesse sind Agentien, die auf Mediatoren

der Apoptose-Signalkette abzielen, da ein defektes Apoptose-System nachweislich der Grund für Chemoresistenz ist. Wobei sowohl die Induktion pro-apoptotischer (NOXA, BAD,...) als auch die Suppression anti-apoptotischer (Bcl-2,..) Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Möglichkeit darstellen. (Hocker *et al.*, 2008)

1.2 Apoptose

Unter Apoptose oder programmiertem Zelltod versteht man einen straff regulierten Prozess der, einmal aktiviert, selbstständig und ohne weitere externen Stimuli zum kontrollierten Tod der Zelle führt. Dabei können sowohl die Abwesenheit von anti-apoptotischen Faktoren, als auch die Anwesenheit von pro-apoptotischen Stimuli den programmierten Tod der Zelle initiieren. Mittels Apoptose werden mutierte, infizierte oder beschädigte Zellen entfernt. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen aktiven (ATP-abhängigen) Prozess der durch verschiedene morphologische und biochemische Besonderheiten charakterisiert ist. Die ATP-Abhängigkeit gewährleistet auch die Lenkbarkeit des Prozesses. Ist die Zelle unfähig genügend ATP für den Ablauf des programmierten Zelltodes bereitzustellen kann die Apoptose auch in Nekrose umschlagen. (McConkey, 1998)

Der Begriff Apoptose bezeichnet keinen einzelnen genau definierten Ablauf in der Zelle sondern verschiedene, ATP-abhängige, Formen des gesteuerten Zelltodes. Ausgelöst werden diese zellulären Suizid-Programme durch unterschiedliche vorgelagerte Signalketten. (Tabas, 2005)

Im Zuge der Apoptose kommt es zu einem Schrumpfen der Zelle, wobei die Zelle den Kontakt zu den Nachbarzellen verliert. Das Chromatin kondensiert an der Kernmembran und die DNA wird von Caspase-stimulierten DNAsen abgebaut. Die Zellmembran beginnt zu Knospen („blebbing“). Schließlich werden Zellvesikel, sogenannte „apoptotic bodies“, abgeschnürt und mittels Phagozytose entsorgt. Während des ganzen Prozesses bleibt die Zellmembran intakt.

Anders als bei der Nekrose, bei der es zu einem „Auslaufen“ der Zelle kommt, hält die Zelle bei der Apoptose ihre Integrität aufrecht. Der programmierte Zelltod ist, im Gegensatz zur Nekrose, nicht automatisch an einen entzündlichen Prozess gekoppelt. (McConkey, 1998)

Apoptotische Zellen werden mittels Phagozytose entsorgt. Während des apoptotischen Zellabbaus werden gleichzeitig Zelloberflächenproteine abgebaut, die bei gesunden Zellen das Binden von Phagozyten verhindern. Gleichzeitig werden Zelloberflächenproteine exprimiert und sekretiert, die Zell-Phagozyten-Interaktionen initiieren. Charakteristisch für apoptotische Zellen ist auch, dass an der Zelloberfläche präsentierte Phosphatidylserin, das im Zuge des Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran nach außen „flipp“t. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen kann durch Makrophagen und Neutrophile aber auch durch Epithelzellen erfolgen. (Henson *et al.*, 2001). (Fadok *et al.*, 1997)

Apoptotische Signaltransduktion

Apoptose wird durch unterschiedliche vorgelagerte Signalketten initiiert und gesteuert. Die zwei am besten studierten Signalwege sind die durch Todesrezeptoren und Mitochondrien vermittelte Apoptose. Bei durch Oberflächenrezeptoren vermitteltem Zelltod binden Liganden an einen sogenannte „death receptor“ an der Zellaußenmembran der Zielzelle und lösen so den programmierten Zelltod aus. Da das Signal von außerhalb der Zelle kommt spricht man auch von einem extrinsischem Signalweg. Die zweite Form der Apoptoseinitiation wird von Mitochondrien innerhalb der Zelle gesteuert und daher auch als intrinsischer Signalweg bezeichnet. (Tabas, 2005) (Alberts *et al.*, 2008)

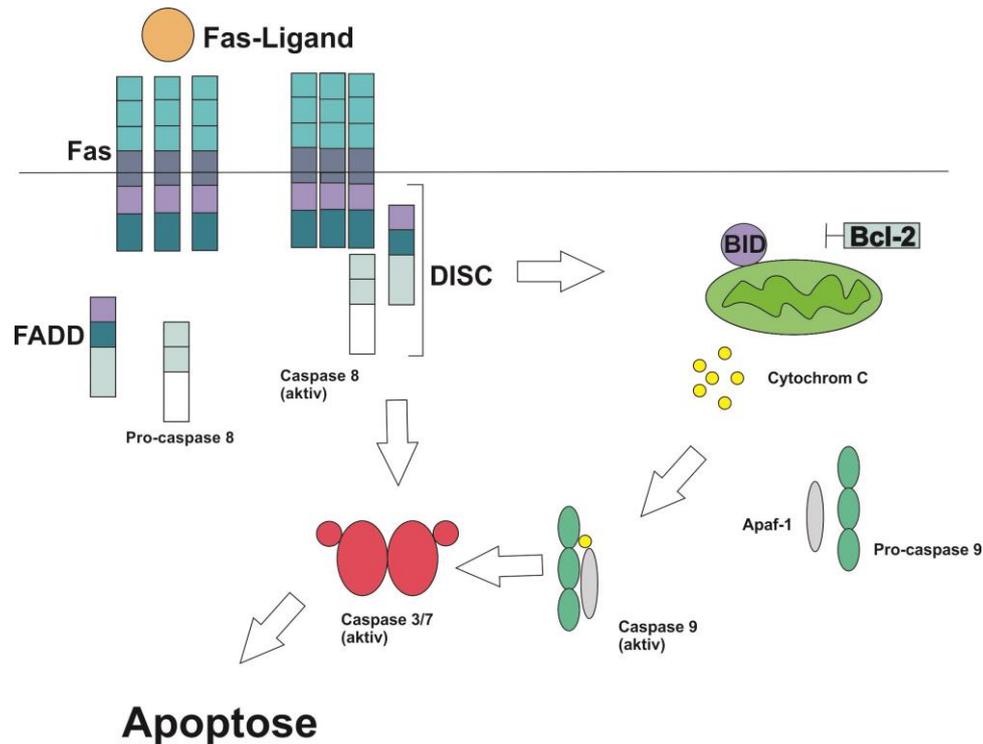


Abbildung 4: **Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose**. Schematische Darstellung der zwei grundlegenden Apoptosewege in der Zelle. Die durch externe Stimuli initiierte und „Todesrezeptoren“ vermittelte „extrinsische Apoptose“ und die auf Mitochondrien-basierende „intrinsische Apoptose“. Reicht die Menge der mittels extrinsischen Signalwegs produzierte, Apoptosesignale nicht aus. Wird das Signal an die Mitochondrien weitergeleitet und mittels intrinsischen Signalwegs amplifiziert.

„Death Receptor“ vermittelte Apoptose

Der „extrinsische“ Apoptoseweg (Abb. 4) wird durch membranständige Rezeptoren, den sogenannten „death receptors“, aktiviert. Verschiedene Mitglieder der TNF-R(tumor necrosis factor-receptor)-Familie wie Fas/CD95, TNF-R1, DR3, DR4 und DR5 können dabei den Platz des „death receptors“ einnehmen. Das Binden eines trimeren Liganden („death ligand“) bewirkt die Aggregation/ Aktivierung des Rezeptors. Der aktivierte Rezeptor rekrutiert im Zuge dessen verschiedene Adapterproteine. Das Adapterprotein FADD (Fas Associated Death Domain) besteht aus zwei unterschiedlichen funktionellen Strukturen: der „death domain“ (DD) und der „death effector domain“ (DED). FADD bindet mit seiner „death domain“ (DD) an die DD-Struktur des Rezeptors und interagiert mittels seiner „death effector domain“ mit der pro-caspase 8. Dadurch wird an dem Rezeptor der sogenannte „Death Inducing Signaling Complex“ (DISC) gebildet. Durch das Binden an FADD wird die pro-caspase 8 gespalten und

aktiviert und kann so Effektor-caspasen aktivieren, die ihrerseits die Apoptose einleiten. (Thorburn, 2003) (Stoneman und Bennet, 2004)

Mitochondrien-vermittelte Apoptose

Die „intrinsische“ Apoptose basiert auf der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. (Abb. 4) Das Cytochrom c bildet mit Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1) und Pro-Caspase 9 eine Komplex. Dadurch wird die Pro-Caspase 9 aktiviert und kann ihrerseits Effektorcaspasen initiieren. Die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol wird durch Proteine der Bcl-2-Familie (pro- oder anti-apoptotisch) gesteuert. (Stoneman und Bennett, 2004)

In manchen Zellen reicht die durch den „extrinsischen Apoptoseweg“ aktivierte Caspase 8 nicht aus um die Apoptose einzuleiten. In diesem Fall wird das Signal über den „intrinsischen Apoptoseweg“ verstärkt. Aktivierte Caspase 8 spaltet das zytosolische Protein Bid zu tBid, welches dann an die Mitochondrien bindet und zu einer Cytochrom C-Ausschüttung führt. (Wang, 2001)

1.3 Ceramid

Sphingolipide stellen mit zahlreichen verschiedenen Spezies eine Hauptgruppe der in Eukaryoten vorhandenen Lipide dar. Schon 1876 durch Johann Ludwig Wilhelm Thudichum entdeckt, wurde lange vermutet ihre primäre Aufgabe wären ihre strukturgebenden Eigenschaften beim Aufbau der Zellmembran. (Bartke und Hannun, 2009) Mittlerweile ist bekannt, dass verschiedene bioaktive Sphingolipide wie Ceramid, Sphingosine, Sphingosine-1-Phosphat und Ceramid-1-Phosphat eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion von Proliferation, Apoptose, Entzündungsprozessen, Angiogenese und der Entwicklung/ Bekämpfung von Krebs spielen. (Bartke und Hannun, 2009) (Hannun und Obeid, 2011)

Ein Schlüsselintermediat in Biosynthese und Metabolismus von komplexen bioaktiven Sphingolipiden ist Ceramid. Seine Synthese und Modifikation wird von zahlreichen Enzymen katalysiert. (Hannun und Obeid, 2011) Ceramide bestehen aus einer Sphingoidbase und einem Acylrest, der an das N-Atom des Sphingosins gebunden ist. Ceramide werden in allen Gewebsstrukturen synthetisiert und sind essentiell für Organisation und Funktion der Lipidmembran. (Christie, 2012)

Ceramid: Synthese und Stoffwechsel

Ceramid wird entweder *de novo* oder durch den Abbau komplexer Sphingolipide produziert. Für die *de novo* Synthese von Ceramid arbeiten zwei Enzyme, Serine Palmitoyltransferase und Ceramidsynthase, koordiniert zusammen (Abb. 5). Zunächst kommt es durch die Kondensation von Palmitoyl-CoA und Serin zur Bildung von 3-Ketosphinganine (Serine Palmitoyltransferase), welches weiter zu Sphinganinen reduziert wird. Die anschließende N-Acetylierung durch Ceramidsynthase generiert Dihydroceramid. Eine Desaturase wandelt zuletzt das acetylierte Sphinganine zum acetylierten Sphingosine, Ceramid, um. Für die Kondensation von Palmitoyl CoA mit Serin benötigt das Enzym Serine Palmitoyltransferase Pyridoxal 5'-phosphat. Es wird vermutete, dass dieser erste Schritt in der Ceramid *de novo* Synthese zugleich der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt ist. Die Kondensation zu 3-Ketosphinganine und die Acylierung zu Dihydroceramid finden an der cytosolischen Seiten des Endoplasmatischen Retikulums statt. (Reynolds *et al.*, 2004)

Es gibt sechs verschiedene Ceramidsynthasen (CerS) in Säugetieren, die sich hauptsächlich in ihrer Spezifität für verschieden lange Acyl-Ketten an den verwendeten Acyl-CoAs unterscheiden. CerS1 verwendet hauptsächlich C18-CoA, CerS4 C18- und C20-CoAs. CerS5 und CerS 6 sind spezifisch für C16-CoA. CerS 3 verarbeitet ausschließlich langkettige Acyl-CoAs (≥ 26 C). CerS 2 ist in der Lage Acyl-CoAs mit verschiedenen langen Fettsäureketten über C20 zu nutzen. Neben ihrer variierenden Selektivität für unterschiedliche Acyl-CoAs sind die

einzelnen Ceramidsynthasen meist charakteristisch für bestimmte Gewebe. Während CerS2 als sogenanntes „housekeeping gene“ in fast allen Geweben vertreten ist (Laviad *et al.*, 2008), wird die CerS3 exklusiv in der Haut exprimiert. (Mizutani *et al.*, 2009) Auch die CerS 4 ist vermehrt in der Haut zu finden. (Stiban *et al.*, 2010)

Neben der *de novo* Synthese katalysiert die Ceramidsynthase auch die Umwandlung von Sphingosine, das aus dem Abbau von Sphingomyeline (SM) gebildet und wieder in den Sphingomyelinstoffwechselweg recycelt wurde, zu Ceramid. (Abb. 6)(Reynolds *et al.*, 2004)

Eine weitere Möglichkeit zur Ceramidgenerierung stellt der Sphingomyelinase-katalysierte Abbau von Sphingomyelin an der Plasmamembran dar (Abb. 6). Zwei verschiedene Sphingomyelinasen (SMase) spielen dabei eine Rolle die neutrale (Magnesium-abhängige) SMase und die saure (a)SMase. Beide Sphingomyelinasen werden kurzfristig von verschiedenen Stressfaktoren aktiviert und bewirken dann über einen bestimmten Zeitraum (min-h) ein erhöhtes Ceramid-Level. (Reynolds *et al.*, 2004)

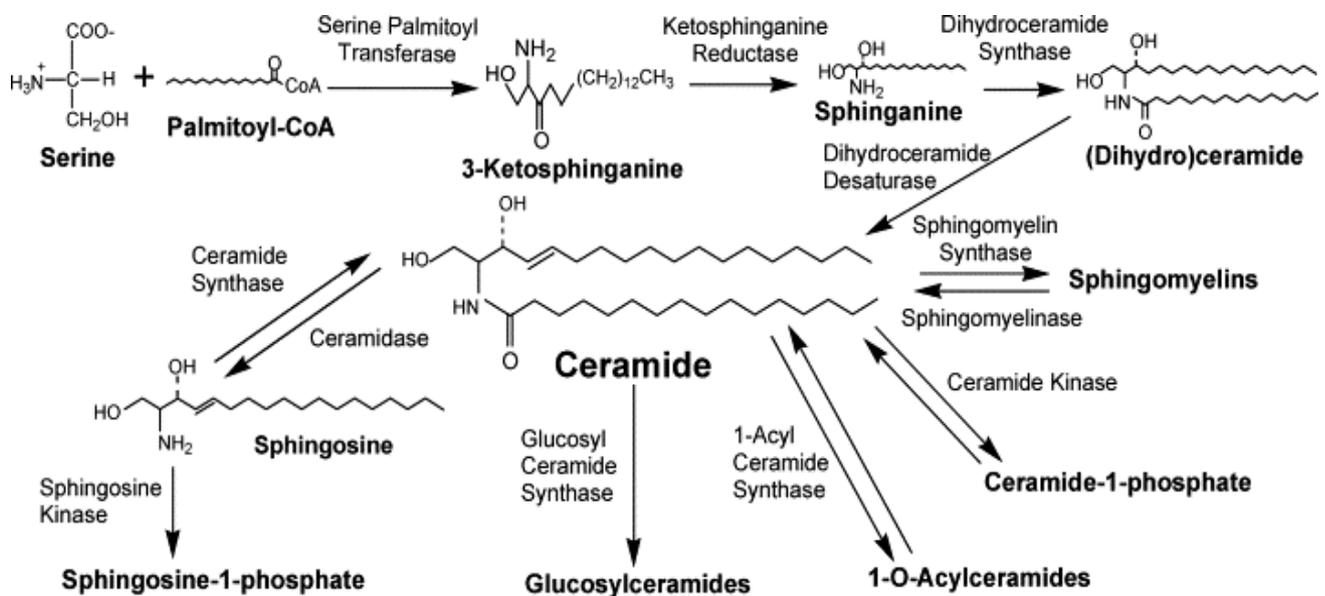


Abbildung 5: **Ceramid Stoffwechsel.** Ceramide sind das Schlüsselintermediat bei der Bildung komplexer Sphingolipide. Ceramid selbst kann entweder durch *de novo* Synthese oder im Zuge des Sphingomyelinabbaus gebildet werden. Wegen seiner zytotoxischen Eigenschaften wird Ceramid in der Zelle rasch durch Acylierung oder Glycosylierung in weniger schädliche Komponenten umgewandelt. (Reynolds C P, Maurer B J, Kolesnick R N. (2003) Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Letters* 206, 169-180.)

Sowohl die *de novo* Synthese als auch die Ceramidbildung durch den Abbau von Sphingomyelin reagieren auf die Anwesenheit von gewissen zytotoxischen Agentien mit einer erhöhten Produktion von Ceramid. Jedoch sind die Ceramidvorkommen aus diesen beiden Quellen in der Zelle in unterschiedlichen Arealen („Pools“) lokalisiert. Es ist nicht geklärt inwiefern die unterschiedlichen Ceramid-Pools zur Übertragung zytotoxischer Effekte auf die Zelle beitragen. (Reynolds *et al.*, 2004)

Ceramid ist zu einem geringen Anteil in jeder menschlichen Zelle enthalten. Normalerweise wird es rasch in komplexeren und nicht toxischen Sphingolipide, wie Sphingomyelin und verschiedene Glycosylceramide, umgewandelt. In der Haut und speziell in der Stratum Corneum (Hornschicht) der Epidermis wird Ceramid jedoch in großen Mengen für die Funktion und den Aufbau des Gewebes benötigt. (Christie, 2012)

Ceramid als Apoptoseinitiator

1993 entdeckten Obeid *et al.*, dass Ceramid nicht einfach nur cytotoxische Effekte auf die Zelle ausübt sondern Teil einer Signaltransduktionskette ist, die zum programmierten Zelltod führt. Heute gilt Ceramid als eine der Schlüsselkomponenten in der Apoptose-Regulation. Schon in den 80ern wurde entdeckt, dass die Hydrolse von Sphingomyelin zu Ceramid und damit der Sphingomyelinzyklus durch extrazelluläre Agentien reguliert wird. (Okazaki *et al.*, 1989) Damit stellt die durch extrazelluläre Agentien regulierte Synthese von Ceramid in der Zelle eine potente Möglichkeit zur gesteuerten Entsorgung kranker Zellen im Körper dar.

Wie schon erwähnt, ist Ceramid zu einem geringen Anteil in jeder gesunden menschlichen Zelle enthalten. Kommt es jedoch zu einer Akkumulation von Ceramid in der Zelle, überwiegen die cytotoxischen Eigenschaften dieses Lipid-Messengers. Viele Apoptose-Initiatoren wie TNF α , Fas Rezeptor Liganden oder Chemotherapeutika greifen in die Regulation des Sphingomyelinzyklus ein und führen so zu einer Akkumulation von Ceramid in der Zelle. Ceramid wiederum reguliert Phosphatasen, Proteasen und Kinasen, die den

regulierten Zelltod steuern. (Pettus et al., 2002) Ceramid bildet innerhalb der Phospholipidmembran Ceramid-reiche Mikrodomänen, sogenannte „rafts. Die aSMase-gesteuerte Synthese von Ceramid ist für die Bildung solcher „rafts“ verantwortlich. Das führt dazu, dass, trotz der an sich geringen Gesamtkonzentration innerhalb der Phospholipidmembran, lokal Ceramid-reiche Areale entstehen. Die dadurch bedingten strukturellen Veränderungen der Phospholipidmembran dienen vermutlich dazu die Oligomerisierung bestimmter Proteine zu gewährleisten und stress-bedingte Signaltransduktion zu verstärken. (Christie, 2012)

Eine der durch Ceramid aktivierten Proteinkinasen (CAPK) ist KSR (Kinase suppressor of RAS), ein membranständiges Protein, das ausgelöst durch Cytokine phosphoryliert und somit aktiviert wird. Durch die Phosphorylierung von Raf, dem Ausgangsenzym der MAPK-Signalkaskade (Mitogen activated protein kinase), ist KSR imstande die MAPK-Kaskade zu aktivieren und so den programmierten Zelltod einzuleiten. Wobei Ceramid vermutlich direkt und via KSR die Aktivierung der Proteinkinase cRaf (=Raf 1) bewirkt, die dann MEK phosphoryliert und so die MAPK-Kaskade in Gang setzt. (Pettus et al., 2002) (Basu et al., 1998)

Eine weitere Klasse von Ceramid-abhängigen Enzymen sind die CAPPs (=Ceramide activated protein phosphatases). Substrate der CAPP sind unter anderem c-Jun, Bcl-2, Akt/PKB und Rb (Retinoblastoma protein). All diese Proteine greifen in die Regulation von Apoptose und Proliferation der Zelle ein. (Pettus et al., 2002)

Verschiedene Chemotherapeutika (Etoposid, Vincristin, Doxorubicin,...) und Strahlentherapie steigern die Ceramidsynthese in der Zelle. Immortalisierte Krebszellen sind in der Lage der Apoptose zu entgehen, indem sie eine Akkumulation von Ceramid in der Zelle verhindern. Ceramidase, ein Enzym des Ceramidstoffwechsels, konvertiert Ceramid zu Sphingosin, das mittels Phosphorylierung durch Sphingosin Kinase in Sphingosin-1-Phosphat

(S1P)umgewandelt werden kann. Während Ceramid anti-proliferatorisch und Apoptose-fördernd wirkt, hat S1P den gegenteiligen Effekt in der Zelle (fördert Proliferation und Überleben). (Reynolds *et al.*, 2004) Eine Möglichkeit um das Ceramidlevel in kanzerogene Zellen zu erhöhen ist die Ceramidase durch einen Inhibitor auszuschalten. Selzner *et al* haben gezeigt, dass der Ceramidase-Inhibitor B13 Ceramid in Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms signifikant erhöht und zur Apoptose der Krebszellen führt. Umliegende gesunde Leberzellen jedoch resistent gegen die B13-induzierte Inhibition der Ceramidase sind. (Selzner *et al.*, 2001) Auch die Inhibition der S1P (Sphingosin-1-phosphat) Synthese und der Glucosyl Ceramid Synthase (GCS, wandelt Ceramid in Glucoylceramid um) erhöhen den Ceramidgehalt kanzerogener Zellen. Generell scheint die Inhibition des Ceramidmetabolismus die Wirksamkeit von Ceramid-erhöhenden Krebstherapien zu verbessern. (Reynolds *et al.*, 2004)

1.4 Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies oxidieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) an *sn*-2-Position der Glycerophospholipiden und führen zur Bildung oxidierter Phospholipide. Während bei Säugetieren an die *sn*-1 Position von Phospholipiden meist eine gesättigte Fettsäure gebunden, ist die *sn*-2 Position häufig mit einer mehrfach ungesättigten Fettsäure verknüpft. (Fruhirth *et al.*, 2007)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reagieren mit den an Doppelbindungen benachbarten Wasserstoffatomen. Bisallylische Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen, die zwischen zwei Doppelbindungen lokalisiert sind (nicht konjugiertes DB-System) sind besonders schwach und haben eine niedrige Dissoziationsenergie, wodurch ein Wasserstoffatom einfach abgezogen werden kann, gefolgt von einer Reaktion mit molekularem Sauerstoff. Zuerst wird das Wasserstoffatom abgezogen, gefolgt von einer Umlagerung der Doppelbindungen und einer

Reaktion mit O_3 . Die daraus resultierenden Peroxyl-Radikale sind sehr reaktiv und können eine Vielzahl an Reaktion durchlaufen. (Fruhirth *et al.*, 2007)

Phosphatidylcholin (PC) ist das in Säugetierzellen und Lipidprotein-Partikeln am häufigsten vorhandene Phospholipid. Daher gehören die meisten oxPL der PC-Familie an. Oxidierte Phosphatidylcholone ähneln in ihre Struktur dem „Platelet-Activating Factor“ (PAF). Einige oxPL zeigen ähnliche biologische Aktivitäten wie der PAF. (McIntyre *et al.*, 1999) Außerdem hat Matsura *et al.* 2005 gezeigt, dass oxidiertes Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche apoptotischer Zellen vorkommt. (Matsura *et al.*, 2005) Die Externalisierung von PS ist auch eine Besonderheit von Tumorzellen. (Riedl *et al.*, 2011)

1.5 LDL und oxLDL

Lipoproteine sind Mikropartikel, die sowohl aus einem Lipid- als auch einem Proteinanteil bestehen. Ihre Struktur ist meist sphärisch, mit einem Kern aus neutralen Lipiden (hauptsächlich TAGs oder, im Fall von LDL, esterifiziertem Cholesterol) und einer Hülle bestehend aus Phospholipiden, freiem Cholesterol und Proteinen. Dabei entsteht eine sogenannte Mikroemulsion. Lipoproteine werden nach Dichte, Größe, Protein- und Lipidzusammensetzung unterschieden. LDL (=low density lipoprotein) ist neben VLDL, IDL, HDL und Chylomikronen eine der Lipoprotein-Hauptgruppen. Der Proteinanteil eines LDL-Partikels besteht hauptsächlich aus einem apoB-100 Molekül. Apolipoproteine sind oft amphipatische Moleküle und dadurch in der Lage, sowohl mit den hydrophoben Lipiden des Lipoproteins als auch der hydrophilen, wässrigen Umgebung zu interagieren. Durch ihre Wechselwirkungen mit den Lipiden haben sie großen Einfluss auf die Größe und Struktur von Lipoproteinen. (Segrest *et al.*, 2001)

Im Körper transportiert LDL Cholesterol, das in der Leber synthetisiert wird oder aus der Ernährung stammt und in allen Zellen für den Aufbau der Zellmembran benötigt wird. Die Zelle nimmt LDL mit Hilfe eines LDL-Rezeptors auf, der LDL anhand seines Apoprotein apoB-100 erkennt. Die Aufnahme von LDL wird dabei über die LDL-Rezeptor-Expression an der Zelloberfläche und der Menge an freiem Cholesterol in der Zelle gesteuert. (Brown und Goldstein, 1979)

oxLDL

Durch oxidativen Stress (siehe oben) werden LDL-Partikel modifiziert. Dabei wird anhand der „Stärke“ der durch Oxidation hervorgerufenen Modifikation unterschieden: während bei stark oxidiertem LDL (highly oxidized LDL) sowohl der Protein-, als auch der Lipid-Anteil oxidiert sind, ist bei mmLDL (minimally modified LDL) vor allem der Lipid-Teil von der oxidativen Modifikation betroffen. mmLDL wird trotz des oxidierten Lipidanteils noch vom LDL-Rezeptor erkannt und in die Zelle aufgenommen, während „highly oxidized LDL“ zu stark modifiziert ist. (Navab et al., 1996). Oxidiertes LDL wird im Gegensatz zum nativen Lipoprotein unkontrolliert über den CD36 Scavenger Rezeptor von Makrophagen in die Arterienwand aufgenommen. Die durch oxLDL hervorgerufenen Zellschäden führen zu Schaumzellenbildung und zur Ausschüttung verschiedener Cytokine, die den arteriosklerotischen Krankheitsverlauf beschleunigen. (Ross, 1999) Außerdem hat oxLDL eine chemotaktische Wirkung auf zirkulierende Monozyten, die in der Arterienwand in Makrophagen differenzieren und dadurch wieder Schaumzellen ausbilden beziehungsweise natives LDL oxidieren können. (Witzum und Steinberg, 1991). LDL das nur am Lipidteil oxidiert ist (mmLDL) aktiviert die saure Sphingomyelinase, was wiederum zur Synthese von Ceramid und zur Einleitung der Apoptose führt. (Loidl et al., 2004) Die cytotoxischen Effekte von oxLDL sind konzentrationsabhängig: Bachem et al haben 1999 gezeigt, dass niedrige Konzentrationen an oxLDL die Fibrogenbildung fördern und die Synthese der extrazellulären Matrix stimulieren. Hohe Konzentrationen lösen jedoch oxidativen Stress und Apoptose in

koronaren arteriellen SMCs (smooth muscle cells) (Bachem *et al.*, 1999), Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) und Melanomzellen (Ramprecht *et al.*, Dissertation, TU Graz, 2013) aus.

1.5 Oxidierte Phospholipide

Die durch oxLDL hervorgerufenen pathophysiologischen Effekte sind zum Teil auf oxidierte Phospholipide (oxidierter Lipidanteil) zurückzuführen. Die wichtigsten bioaktiven Lipide in mmLDL sind neben oxidierten Sterolen Oxidationsprodukte von 1-palmitoyl-2-arachidonyl-phosphatidylcholin (PAPC) und 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylcholin (PLPC). An die *sn*-2 Position von PAPC ist eine Arachidonsäure (AA, C 20:4) geknüpft, eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die durch extensive Oxidation verkürzt wird. Zu diesen fragmentierten Phosphatidylcholinen zählen unter anderem 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin (POVPC) und 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PGPC). (Fruhvirth *et al.*, 2007) (Watson *et al.*, 1995)

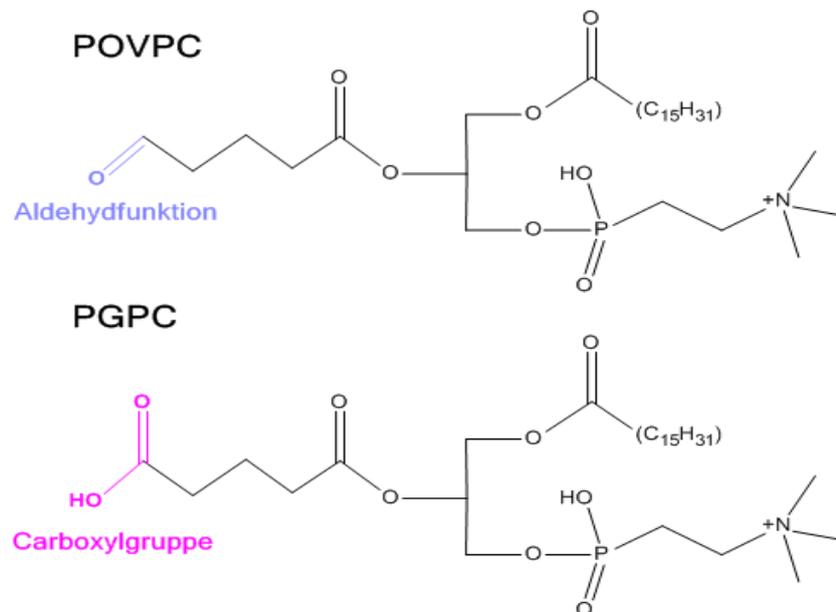


Abbildung 6: **POVPC und PGPC sind Oxidationsprodukte von PAPC.** Die bioaktiven oxPL POVPC und PGPC haben beide eine gesättigte Fettsäure (Palmitinsäure, C₁₆:0) in der *sn*-1 Position, eine verkürzte Acylkette in *sn*-2 Position und Cholin als polare Kopfgruppe an der *sn*-3 Position. Sie unterscheiden sich lediglich durch ihre reaktive Gruppe in der ω -Position der *sn*-2 Kette.

POVPC und PGPC unterscheiden sich lediglich durch ihre funktionelle Gruppe in der ω -Position der *sn*-2 Kette. Während bei POVPC eine Aldehydfunktion an der *sn*-2 Position verankert ist, handelt es sich bei PGPC um eine Carboxylgruppe. Aldehyde können mit primären Aminogruppen z.B. von Proteinen Schiff-Basen bilden. Dadurch ist POVPC im Stande kovalente Bindungen zu Proteinen und Amino-Phospholipiden auszubilden. PGPC hingegen kann lediglich physikalisch mit zellulären Molekülen interagieren. Wodurch sich diese beiden oxPL deutlich in ihrer Reaktivität unterscheiden. (Fruhirth *et al.*, 2007)

Oxydierte Phospholipide unterscheiden sich in Struktur und Polarität deutlich von ihren Ausgangslipiden. Sie sind in der Lage die Funktion der Lipid-Doppelschicht zu verändern und Lipid-Lipid/ Lipid-Protein-Interaktionen zu beeinflussen. (Fruhirth *et al.*, 2007)

Die Oxidation von Phospholipiden führt dazu, dass sich die Konformation dieser PL innerhalb der Lipid-Doppelschicht ändert. Dabei zeigen die, durch Oxidation verkürzten, Fettsäuren nicht länger in das Innere der Lipid-Doppelschicht sondern an die Zell-Außenseite („whisker-like“). Diese verkürzten Fettsäuren können dann vom Makrophagen Scavenger Rezeptor (CD 36) erkannt werden. (Greenberg *et al.*, 2008)

Langer Kontakt mit μ M-Konzentrationen von POVPC und PGPC induzieren Apoptose in VSMC (vascular smooth muscle cells) (Loidl *et al.*, 2004), Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) und Melanomzellen (Ramprecht *et al.*, Dissertation, TU Graz, 2013) indem sie die saure Sphingomyelinase stimulieren. Die apoptotische Wirkung dieser oxPL ist dabei von der Serumkonzentration im Medium abhängig. Wird der Probe viel Serum zugesetzt („high serum conditions“), lösen die oxPL nicht Apoptose aus, sondern haben nur eine antiproliferatorische Wirkung. (Fruhirth *et al.*, 2006)

Die zentrale Fragestellung dieser Diplomarbeit war, ob die Toxizität von oxPL, speziell von POVPC, in Melanomzellen mit der Bildung von Ceramid assoziiert ist. Daher wurde eine Bestimmung von Aktivität und/oder Expression der Ceramid-synthetisierenden Enzyme

aSMase und CerS durchgeführt. Außerdem wurden im Rahmen einer Lipidomanalyse die durch POVPC induzierten Ceramid- und Sphingolipidmuster in Melanonzellen analysiert. Verschiedene Ceramid-Species (mit unterschiedlichen Fettsäureresten) haben verschiedene Membraneigenschaften und somit unterschiedlichen biologische (toxische) Effekte. (Christie, 2012)

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente kombiniert mit Daten von Ramprecht *et al* (Dissertation, TU Graz, 2013) haben gezeigt, dass Ceramid durch POVPC nur in SBcl2-(Muttermalzellen) und WM9-(metastasierende Melanomzellen) Zellen erhöht war. Die Steigerung des Ceramid-Levels korreliert in diesem Fall mit der Aktivität der aSMase und einer apoptotischen Wirkung. Nach unseren derzeitigen Erkenntnissen scheint es keinen Zusammenhang zwischen Ceramidbildung und Apoptose in den anderen Zelllinien (WM35, WM164) zu geben.

2 Materialien und Methoden

2.1.Zellkultur

Materialien und Reagenzien

- Humane Muttermalzelllinien (SBcl2) und Melanomzelllinien (WM35, WM9, WM164) von Dr. Meenhard Herlyn (The Wistar Institute, Philadelphia, PA)
- RPMI 1640 Medium (mit oder ohne Phenolrot) von GIBCO (Carlsbad, CA)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) von PAA Laboratories (Linz, Österreich)
- Fetales Kalbserum (FCS) von GIBCO (Carlsbad, CA)
- Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl) von PAA Laboratories (Linz, Österreich)
- L-Glutamin von PAA Laboratories (Linz, Österreich)
- 25% Trypsin-EDTA mit Phenolrot von GIBCO (Carlsbad, CA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) von SIGMA-Aldrich (Wien, Österreich)
- Trypanblau von Invitrogen (Wien, Österreich)
- Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten von Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
- Zellschaber von Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
- Kryoröhrchen CRYO.S™ von Greiner (Kremsmünster, Österreich)
- Einfrierbox „Mr. Frosty“ (NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container) von Thermo Scientific (Langenselbold, Germany)
- Countess® Automated Cell Counter von Invitrogen (Wien, Österreich)

Kultivieren von humanen Muttermal- und Melanomzellen

Die humane Muttermalzelllinien (SBcl2) und Melanomzelllinien (WM35, WM9, WM164) wurden in RPMI 1640 supplementiert mit 2 % FCS, 200 U/ml Penicillin/Streptomycin und 4 mM L-Glutamin kultiviert. Die Aufzucht erfolgte standardgemäß in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe bei 37°C in angefeuchteter CO₂-Atmosphäre (5%). Zum Splitten wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, 1 ml Trypsin-EDTA (für 75 cm² Flasche) zugegeben und bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Anschließend wurde die Trypsinisierung durch Zugabe von Medium abgestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min, 25°C). Danach wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und ein entsprechendes Aliquot Zellsuspension in eine Zellkulturflasche/ Zellkulturplatte überführt. Gesplittet wurde im Verhältnis 1:3 alle 3-4 Tage. Für Experimente wurde 2 Tage vor Experimentstart 1:3 gesplittet.

Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen durch Zugaben vom Trypsin vom Flaschenboden gelöst und abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min, 25°C). Das Zellpellet wurde anschließend in RPMI 1640 Medium (versetzt mit 10% DMSO (v/v)) resuspendiert und 1,5 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte über Nacht, bei -70°C in einer speziellen Einfrierbox („Mr. Frosty“), die ein gleichmäßiges Abkühlen um 1°C/h gewährleistet. Um ein Zellaliquot aufzutauen wurde zunächst das Kryoröhrchen in lauwarmem Wasser (~37°C) angetaut und anschließend in 5 ml vorgewärmtes Medium in einer 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde ein „Countess® Automated Cell Counter“ von Invitrogen verwendet. Die Zellen wurden geerntet, in 2 mL RPMI 1640 Medium (ohne Phenolrot) resuspendiert und eine 1:1 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau

hergestellt. Dieses Gemisch wurde dann in die Zählkammern der „Countess® Cell Counting Chamber Slides“ pipettiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte laut Benutzerhandbuch.

2.2 Aufnahme von Mikroskopbildern der verschiedenen Zelllinien

Um die morphologischen Veränderungen humaner Muttermal- und Melanomzelllinien unter der Einwirkung von oxPL abzubilden wurden SBcl2, WM35, WM9 und WM164 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an oxPL inkubiert. Veränderungen an den Zellen wurden mittels Durchlichtmikroskopie detektiert.

Materialien und Reagenzien

- Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Wien, Österreich) bezogen.
- Die Synthese von POVPC und PGPC erfolgte nach einem in unserem Labor modifiziertem Verfahren wie zuvor beschrieben (Moumtzi *et al.*, 2007).
- Ethanol (pA) von J.T.Baker (Deventer, Holland)
- Staurosporin von Invitrogen (Leek, Niederlande)
- Durchlichtmikroskop Axiovert 35 von Carl Zeiss (Deutschland) ausgestattet mit einer CCD-Kamera und betrieben mit Axio Vison.

Probenvorbereitung und Inkubation mit oxPL

Zur Illustration der unterschiedlichen humanen Muttermal- und Melanomzelllinien (SBcl2, WM35, WM9, WM164) unter Einfluss von oxPL wurden die Zellen jeweils für 0 min, 5 min, 15 min, 6 h und 24 h mit 25 µM / 50 µM POVPC, 25 µM / 50 µM PGPC, EtOH (1% Endkonzentration im Inkubationsmedium, Negativkontrolle), 10 µM STS (Staurosporin) und H₂O₂ (1 mM, 10 mM, 40 mM, 80 mM) in 24 Well-Platten inkubiert. Staurosporin wurde eingesetzt um bei den verschiedenen Zelllinien Apoptose einzuleiten (Bertrand *et al.*, 1994),

H₂O₂ hingegen bewirkt einen nekrotischen Zerfall (Dygbukt *et al.*, 1994). Beide Agentien dienten dazu Vergleichsbilder zu dem durch die oxPL induzierten Zelltod zu generieren. Um eine Konfluenz von 50% zu gewährleisten wurden 18h vor Experimentstart 125.000 Zellen / Well ausgesät. Das Inkubationsvolumen pro Well betrug 400 µL und ergab sich aus RPMI 1640 mit 0.1 % FCS plus der entsprechenden Menge Agens (siehe oben).

Für die Inkubation der unterschiedlichen Zelllinien mit oxPL wurde RPMI 1640 (ohne Phenolrot) mit 0.1% FCS verwendet. Dem Inkubationsmedium wurde eine ethanolische Lösung mit der jeweils benötigten Konzentration (µM) an oxidiertem Phospholipid mittels Ethanol-Injektion zugesetzt. Dafür wurde die entsprechende Menge an oxPL in Ethanol pA gelöst und mit einer Hamilton Spritze, unter Rühren, in vorbereitetes RPMI 1640 Inkubationsmedium injiziert, um die Mizellenbildung der Lipide anzuregen (Batzri und Korn, 1973). Die Menge an Ethanol wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von unter 1% (v/v) Ethanol entstand. Für entsprechende Kontrollexperimente wurde RPMI 1640 (ohne Phenolrot) mit 0.1% FCS und derselben Menge an Ethanol versetzt, das Inkubationsmedium enthielt aber kein oxidiertes Phospholipid (Negativkontrolle).

Vor der Inkubation mit dem vorbereiteten Inkubationsmedium (+oxPL / -oxPL) wurden die Zellen ein bis zweimal mit RPMI 1640 (ohne Phenolrot) mit 0.1% FCS gewaschen um überschüssiges FCS zu entfernen.

Die Zellbilder wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Axiovert 35) von Carl Zeiss (Deutschland) ausgestattet mit einer CCD-Kamera, bei 320facher Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 533 ms aufgenommen.

2.3 Expressionsanalyse von Ceramid Synthasen nach Stimulation mit POVPC

Die Expressionsanalyse verschiedener Ceramid Synthasen (CerS2, CerS3, CerS4) in humanen Muttermal- und Melanomzellen erfolgte mittels an eine SDS-Gelelektrophorese angeschlossenen Western Blotting und der nachfolgenden Detektion durch verschiedene Antikörper-Systeme.

Materialien und Reagenzien

- Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Wien, Österreich) bezogen.
- Farbstoffreagenz von BIORAD zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts (nach der Methode von Bradford) von Biorad Laboratories (Hercules, USA)
- Rinderserumalbumin (BSA) von Sigma-Aldrich (Wien, Österreich)
- „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“(10-170 kDa) und „PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder“ von Fermentas (Leon-Rot, Deutschland)
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) von Biorad Laboratories (Hercules, USA)
- CerS2 Antikörper (Anti-LASS2; ab57136), CerS3 Antikörper (Anti-LASS3; ab28637), CerS4 Antikörper (Anti-LASS4; ab66512) von Abcam (Cambridge, USA)
- „Goat Anti-Mouse IgG-FITC Secondary Antibody“ (ab6785) gegen CerS2 Primären Antikörper von Abcam (Cambridge, USA)
- „Goat Anti-Rabbit IgG-FITC Secondary Antibody“ (ab6717) gegen CerS3, CerS4 Primären Antikörper von Abcam (Cambridge, USA)
- „Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP Secondary Antibody“ (SACSC-2030) gegen CerS3, CerS4 Primären Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
- Mikrotiterplattenleser von Anthos Labtec Instruments (Salzburg, Österreich)
- Winread 2.3 Software (Version 1.7) von Anthos Labtec Instruments (Salzburg, Österreich)

- Nitrocellulosemembran (PROTAN BA85, Cellulosenitrat, 0.45 μM) Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland)
- Filterpapier von Whatman (Dassel, Deutschland)
- Fluoreszenzscanner Molecular Imager FX von Biorad Laboratories (Hercules, USA)
- Quantity-One[®] Fluoreszenzscanner- Software von Biorad Laboratories (Hercules, USA)
- ImageJ Bildverarbeitungssoftware (National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>)

Verwendete Puffer und Lösungen

Neutraler Lysepuffer	
HEPES	20 mM
MgCl ₂	10 mM
EDTA	2 mM
Na ₂ MoO ₄	0.1 mM
NaF	1 mM
Triton X-100	0.2 %
<hr/>	
1,4- Dithiothreitol (DTT)	5 mM
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM
4- Aminobenzamidin (4ABA)	1 mg/ ml

Die Proteaseinhibitoren (DTT, PMSF, 4ABA) wurden direkt vor dem Gebrauch in 5 μL EtOH gelöst und dem Lyse- Puffer zugesetzt.

Dissoziationspuffer	
KH ₂ PO ₄ (pH 6.8)	20 mM
EDTA	6 mM
SDS	6 %
Glycin	10 %
Bromphenolblau	0,05 %

Probenpuffer für SDS-Gelelpho.-Proben (Gesamtvolumen 100 μL)	
Dissoziationspuffer	78 μL
1 M Tris (pH 8,8)	20 μL
β -mercaptoethanol	2 μL

5x Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese(vor Verwendung 1:5 Verdünnung mit H₂O dest.)

Tris	15 g/L
EDTA	1,67 g/L
Glycin	71 g/L
SDS	5 g/L

	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (10 %)
Bis-Acrylamid	2,5 ml	562 µL
1 M Tris-Puffer	pH 8,8; 3,75 ml	pH 6,8; 625 µL
H ₂ O dest.	3.61 ml	3,69 µL
20 % Sodiumdodecylsulfate (SDS)	50 µL	25 µL
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

Die beiden Radikalstarter (APS, TEMED) werden zuletzt zugegeben und lösen die „Vernetzungsreaktion“ aus, die in kürzester Zeit dazu führt, dass aus dem Flüssigkeitengemisch ein festes Gel wird.

Transferpuffer für Western Blotting

Tris	2,46 g/L
Glycin	14,27 g/L
MeOH	200 ml/L

10x TBS (pH 7,6)(vor Verwendung 1:10 Verdünnung mit H₂O dest.)

Tris	24,2 g/L
NaCl	80,0 g/L

TBST (Waschpuffer)

TBS (10x)	100 ml/L
Tween 20	1 ml/L

Für die Herstellung aller Puffer wurde H₂O dest. verwendet.

Probenvorbereitung und Inkubation mit POVPC

Alle Zelllinien wurden in 60 mm (\varnothing) Petrischalen in RPMI 1640 Medium mit 2% FCS mit Phenolrot zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Anschließend wurde zweimal mit RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS ohne Phenolrot gewaschen und die Zellen mit 3 ml einer 50 μ M POVPC- Dispersion in RPMI 1640 mit 0.1% FCS oder 1 vol% EtOH in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS über einen Zeitraum von 6 oder 24 h bei 37°C in angefeuchteter CO₂-Atmosphäre (5%) inkubiert.

Proteinisolation und Bestimmung des Gesamtproteingehalts

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (4 ml) gewaschen, zweimal in eiskaltem PBS (4 ml) mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale geschabt und mittels Zentrifugation (450 g, 10 min, 4°C) geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 μ L eiskaltem neutralem Lysepuffer resuspendiert und auf Eis lysiert (1 h, alle 15 min für 30 s gevortext) Danach wurde das Zelllysatz zentrifugiert (1000 g, 10 min, 4°C) und aus dem Überstand der Proteingehalt mittels Bradford- Methode bestimmt (Bradford, 1976). Dafür wurde dem Zelllysatz ein Farbreagenz zugesetzt. Das darin enthaltene Coomassie-Brillant-Blau bildet Komplexe mit den im Zelllysatz enthaltenen Proteinen aus. Freies Coomassie-Brillant-Blau hat sein Absorptionsmaximum bei 465 nm, komplexiertes bei 595 nm. Unter Zuhilfenahme einer Kalibrationsgerade kann dieser Absorptionsshift und der daraus resultierende Farbumschlag für die Proteinbestimmung des Zelllysats herangezogen werden. Für die Kalibrationsgerade wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte eine BSA-Verdünnungsreihe (mindestens 5 verschiedenen Konzentrationen)erstellt. Zusätzlich wurde das zu bestimmende Zelllysatz in unterschiedlichen Mengen(4 μ L, 6 μ L, 8 μ L) in freien Wells der Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann wurde jedem Well 200 μ L des Farbreagenz zugesetzt, für 5 min inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Mikrotiterplattenleser detektiert.

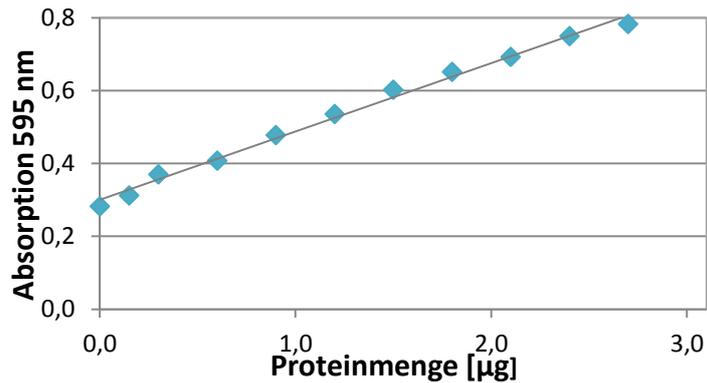


Abbildung 7: **Kalibrationsgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford.** Zwischen 0 und 18 µL einer 0,15 mg/ml BSA-Lösung wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und 200 µL Farbreagenz dazugegeben. Geradegleichung: $y = 0,1879x + 0,3001$

SDS- Gelelektrophorese

Für das 1D SDS-Gel wurden 20 µg Protein mittels Aceton Fällung präzipitiert. Dazu wurde dem Zelllysat die 10fache Menge an Aceton (v/v) zugesetzt, für 12 h (über Nacht) bei -17°C stehen gelassen und anschließend abzentrifugiert (1000 g, 4°C, 20 min). Das Aceton wurde weiter abgesaugt und das Proteinpellet an der Luft trocknen gelassen.

Das so erhaltene Proteinpellet wurde in Eppendorf Tubes in 10 µL Proben-Puffer resuspendiert und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abkühlen gelassen, kurz abzentrifugiert (1000 g, 4°C, 10 sec), und auf ein 1D-SDS-Gel (4.5% Sammelgel, 10% Trenngel) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in 2 Schritten durchgeführt: 0.5 h 10 mA/Gel + 1.5 h 20 mA/Gel. Als Molekulargewichtstandard wurden „PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder“ (5- 250 kDA) und „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (10- 170 kDA) von Fermentas verwendet.

Western Blotting und Detektion

Die Proteinbanden wurden mittels Semi-Dry-Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies geschah mit einem Semi-Dry-Blotter für 1 h bei einer konstanten Spannung von 20 V. Die Anordnung des Blotting-Sandwiches war wie folgt: Filterpapier-Nitrozellulosemembran-Gel-Filterpapier. Die Größe der Nitrozellulosemembran

wurde an die jeweilige Gelgröße angepasst und vor dem Blotting für 10 min in 1xTransferpuffer eingelegt. Das Filterpapier wurde etwas größer als die Membran bemessen und ebenfalls für 10 min mit 1xTransferpuffer präpariert. Wichtig war hier, dass nach dem Aufeinanderschichten des Sandwiches möglichst alle Luftbläschen mittels eines Glasstabs „herausgerollt“ wurden.

Nach dem Blotting wurden die Proteinbanden auf der Membran reversibel (entfernen mit H₂O dest.) mit Ponceau S eingefärbt um eine Kontrolle des Blottings zu gewährleisten. Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend mit 15 ml TBST (Tris-gepufferter Salzlösung) 3 mal für jeweils 10 min gewaschen und dann die freien Bereiche (kein Protein) auf der Membran mit 5%iger-Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBST) abgesättigt.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe oben) für eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper-Verdünnungen wurden hierfür laut Anweisung von Abcam mit 5%iger Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBST) hergestellt:

Tabelle 1: **Eingesetzte Antikörperverdünnungen für die Inkubation der Nitrozellulosemembranen mit primärem Antikörper.** Das Inkubationsvolumen betrug 12 ml pro Membran (5%ige Milchpulverlösung+ Antikörper).

Eingesetzte Antikörperverdünnungen	
Anti-LASS2	1:500
Anti-LASS3	1:1200
Anti-LASS4	1:480

Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBST gewaschen (15 ml; 2 mal für 10 min) und anschließend mit dem jeweiligen sekundären FITC- markierten Antikörper(Verdünnung: 1:5000, in 10 ml 5%iger-Milchpulver-Lösung) für eine Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit und Waschen der Membran mit TBST (15 ml; 2 mal 10min) konnten die Fluoreszin (FITC)-markierten Proteinbanden mit einem Fluoreszenzscanner detektiert

werden. Hierfür wurde mit dem Laser bei 488 nm (Absorptionsmaximum von Fluoreszin bei 488 nm) angeregt und bei 530 nm die Emission detektiert.

Die Detektion mittels Chemolumineszenz folgte bis zu dem Waschschrift nach der Detektion mit dem primären Antikörper dem gleichen Ablauf, dann wurde die Membran für eine Stunde mit dem Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörper (Verdünnung: 1:2000, in 10 ml 5%iger-Milchpulver-Lösung) inkubiert und anschließend mit TBST gewaschen (15 ml; 2 mal 10 min). Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit dem Chemolumineszenz-Kit Roti[®]-Lumin laut Vorschrift behandelt und die Chemolumineszenz-markierten Proteinbanden in der Dunkelkammer mittels Fotodetektion nachgewiesen.

Für die Quantifizierung der Proteinbanden wurde das Programm ImageJ verwendet.

2.4 Bestimmung der aSMase Aktivität

Für die Aktivitätsbestimmung der sauren Sphingomyelinase (aSMase) wurde ein fluoreszierendes Sphingomyelin-Substrat eingesetzt. Der Umsatz von Sphingomyelin zu Ceramid wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und anschließender Fluoreszenzanalyse detektiert.

Materialien und Reagentien

- Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Wien, Österreich) bezogen.
- NBD-C₆-Ceramid (von 2008) von Cayman Chemical Company (Michigan, USA)
- CCD- Kamera von Herolab (Wiesloch, Deutschland)
- Easy Win Software

Verwendete Puffer und Lösungen

Saurer Lysepuffer (ALB) pH 5,0 (mit HOAc)		Saurer Reaktionspuffer (ARB) pH 5,0 (mit HOAc)	
NaAc	250 mM	NaAc	250 mM
Triton X-100	0,2 %	EDTA	1 mM
1,4- Dithiothreitol (DTT)	5 mM		
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	1 mM	Die Proteaseinhibitoren (DTT, PMSF, 4ABA) wurden direkt vor dem Gebrauch in 5µL EtOH gelöst und dem Lyse- Puffer zugesetzt.	
4- Aminobenzamidin (4ABA)	1 mg/ ml		

Probenvorbereitung und Zellaufschluss

Humane metastasierende Melanomzellen (WM9) wurden in 60 mm Petrischalen zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen.

Anschließend wurde zweimal mit RPMI 1640 Medium + 0.1% FCS gewaschen und die Inkubation der Zellen mit 25 µM POVPC beziehungsweise 1 vol% EtOH für 2 min, 5 min und 15 min wie oben beschrieben durchgeführt (Inkubationsvolumen = 2 ml). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (4 ml) gewaschen, zweimal in eiskaltem PBS (4 ml) mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst, in Zentrifugenröhrchen überführt und mittels Zentrifugation (450 g, 10 min, 4°C) geerntet.

Für die Lyse wurde das Zellpellet in saurem Lysepuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis unter viertelstündlichem vortexen inkubiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Bestimmung der aSMase-Aktivität

Für die Bestimmung der aSMase-Aktivität wurden 2 µg Protein eingesetzt und auf gemeinsames Volumen gebracht. Dafür wurde dem Zelllysate, wie zuvor in der Literatur

beschrieben, ein fluoreszenzmarkiertes Sphingomyelin (SM)-Substrat zugesetzt (Loidl *et al.*, 2002). Für die Fluoreszenzmarkierung des SM-Substrates wurde der Fluorophor N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD) verwendet, der ein Absorptionsmaximum bei 466 nm und ein Emissionsmaximum bei 536 nm hat. Das fluoreszierende NBD-Sphingomyelin-Substrat wurde in THF aufgelöst und mit einer Hamiltonspritze, unter Rühren, in ARB (sauren Reaktionspuffer) injiziert (20 nmol trockenes NBD-SM in 10 µL THF in 2000µL ARB injiziert). Von diesem NBD-SM-Substratmix wurden dann 200 µL dem Probenlysat zugesetzt und für 2,5 h bei 37°C unter schütteln inkubiert. Das fluoreszierende NBD-SM-Substrat wurde von der im Zelllysat enthaltenen sauren Sphingomyelinase zu NBD-Ceramid umgesetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit 300 µL CHCl₃/MeOH (2/1 (v/v)) abgestoppt. Die obere (wässrige) Phase wurde dann mit einer Pasteurpipette abgezogen und 20 µL der organischen (unteren) Phase auf eine DC-Platte aufgetragen. Die entstandenen Lipidspezies wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittel: CHCl₃:MeOH:H₂O 65:25:4 v/v/v) aufgetrennt. $RF_{\text{Sphingomyelin}}=0.14$, $RF_{\text{Ceramid}}=0.77$. Die fluoreszierenden Spots wurden mit einer CCD- Kamera bei einer Extinktionswellenlänge von 256 und 365 nm quantifiziert. Die Quantifizierung des fluoreszierenden NBD-Ceramids erfolgte mittels einer Kalibrationsgerade. Dafür wurde NBD-C₆-Ceramid in unterschiedlichen Konzentrationen auf ein DC aufgetragen und anschließend mit einer CCD- Kamera bei Extinktionswellenlängen von 256 und 365 nm quantifiziert.

Für die Fluoreszenzquantifizierung der Lipid-Spots wurde eine EasyWin Software verwendet.

2.5 Bestimmung des Ceramid- und Sphingomyelin- Musters

Um zu untersuchen wie die Inkubation mit POVPC das Ceramid- bzw. Sphingomyelinmuster in den verschiedenen Zelllinien beeinflusst wurden die humanen Muttermal- und

Melanomzelllinien mit 50 μ M POVPC inkubiert. Anschließend wurden die aus den Zellen gewonnen Lipidextrakte mittels Massenspektrometrie analysiert.

Materialien und Reagentien

- Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Wien, Österreich) bezogen.
- Accela Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographen von Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
- Thermo Hypersil GOLD C18- Säule (100x 1 mm, 1.9 μ m) von Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
- TSQ Quantum Ultra Triple Quadrupol Massenspektrometer von Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
- QuanBrowser Software von Thermo Scientific (Massachusetts, USA)

Probenvorbereitung und Inkubation mit oxPL

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Ceramid- und Sphingomyelin Spezies wurden alle Zelllinien in 100 mm (\varnothing) Petrischalen in RPMI 1640 mit 2% FCS und Phenolrot zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Vor der Inkubation mit oxidierten Phospholipiden (POVPC) wurden die Zellen zweimal mit RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS gewaschen um das überschüssige FCS zu entfernen. Für die Stimulation mit POVPC wurden die unterschiedlichen Zelllinien jeweils mit 3 ml einer 50 μ M POVPC Dispersion oder 1 vol. % EtOH (Negativkontrolle) in RPMI 1640 mit 0.1% FCS inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (4 ml) gewaschen, zweimal in eiskaltem PBS (4 ml) mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale geschabt und mittels Zentrifugation (450 g,

10 min, 4°C) geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Davon wurden 100 µL der Zellsuspension abgezweigt und mittels Zentrifugation geerntet (450 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 70 µL neutralem Lysepuffer für eine Stunde, unter viertelstündlichem vortexen, auf Eis lysiert und anschließend abzentrifugiert (1000 g, 10 min, 4°C) um die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) durchführen zu können.

Lipidextraktion und Hydrolyse

Die übrigen 900 µL Zellsuspension wurde abermals zentrifugiert (450 g, 10 min, 4°C), in 3 ml CHCl_3 / MeOH (2:1 v/v) resuspendiert und eine Stunde bei 4°C kräftig geschüttelt. Anschließend wurde der Probe 700 µL MgCl_2 - Lösung (0.036%), zur Phasentrennung, hinzugefügt, weitere 15 min bei 4°C geschüttelt und abzentrifugiert (300 g, 2 min, Raumtemperatur). Die untere Chloroform Phase wurde gesammelt und im Stickstoffstrom eingedampft.

Für die nachfolgende milde alkalische Hydrolyse wurden den eingedampften Lipidextrakten 400 µL CHCl_3 / MeOH / H_2O (16 / 16 / 5 v/v/v) zugesetzt und stark geschüttelt. Anschließend wurden 400 µL 0.2 M NaOH in MeOH zugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 400 µL 0.5 M EDTA- Lösung und 150 µL 1 M CH_3COOH . Nach erneutem starkem Schütteln wurde der Probe 1 ml CHCl_3 zur Extraktion zugesetzt und wiederum für 5 min stark geschüttelt. Schließlich wurden die Lipidextrakte abzentrifugiert (300 g, 3 min, Raumtemperatur), die CHCl_3 - Phase in ein frisches Glasfläschchen transferiert und im Stickstoffstrom eingedampft.

Massenspektrometrische Analyse

Die getrockneten Lipidextrakte wurden bei Harald Köfeler, Core Facility for Mass Spectrometry (Center for Medical Research, Medical University Graz) in 100 µL CHCl_3 / MeOH (1:1 v/v) resuspendiert und 100 pmol interner Standard (Cer 12:0, Cer 25:0, SM 12:0)

zugesetzt. Die chromatographische Auftrennung der Lipide erfolgte mittels Accela Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographen (HPLC). Als Laufmittel wurden eine wässrige Lösung aus 1% Ammoniumacetat (v/v) und 0.1% Ameisensäure (v/v) (A) sowie Acetonitril/ 2-propanol (5:2 v/v) mit 1% Ammoniumacetat (v/v) und 0.1% Ameisensäure(v/v) (B) verwendet. Es wurde ein Gradient von 35% zu 70% B (4 min) und von 70% zu 100% B (16 min) gefahren, gefolgt von einer 10minütigen Spülung mit 100% B. Die Flussrate betrug 250 μL / min. Die unterschiedlichen Sphingomyelin- und Ceramid- Spezies wurden mit einem Triple Quadrupol Massenspektrometer bestimmt. Die Ionisierung der Proben wurde durch Elektrosprayionisation (ESI) bewerkstelligt, die SM und Cer Spezies wurden bei positiver Ionisierung detektiert wie in der Literatur beschrieben (Bielawski et al 2009), (Brugger et al 1997). Aus den Spektren wurden mit QuanBrowser die Ceramid- und Sphingomyelin- Spezies mittels Internem Standard quantifiziert.

3 Resultate

Ziel dieser Arbeit war es, die zytotoxischen Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf humane Melanomzellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden kultivierte humane Melanom-Zelllinien unterschiedlicher Stadien verwendet (primäre Melanom-Zelllinien SBcl2 und WM35, metastasierende Melanom-Zelllinien WM9 und WM164). Die Zellen wurden mit den oxidierten Phospholipiden POVPC und PGPC, Oxidationsprodukten von Phosphatidylcholin, inkubiert. Die daraus resultierenden Effekte auf die Zellmorphologie der Melanomzellen sowie auf die Proteinexpression bestimmter Enzyme (Ceramid-Synthase, saure Sphingomyelinase) und die Sphingolipidom-Zusammensetzung in den Zellen wurden mit entsprechenden Methoden detektiert.

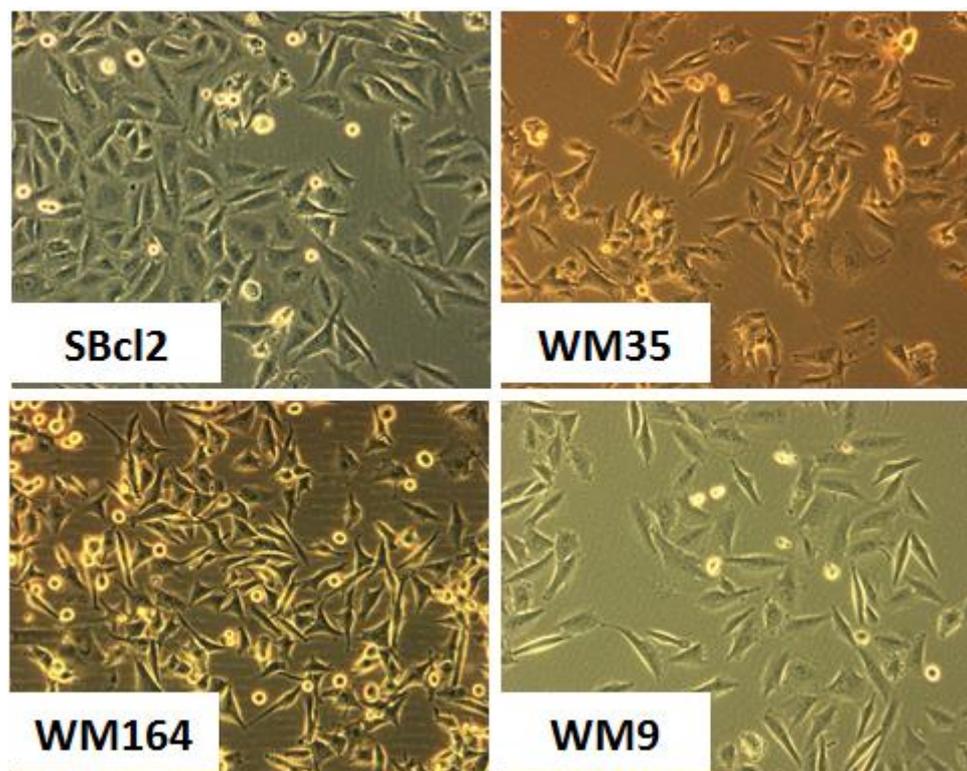


Abbildung 8: **Isolierte Melanomzellen aus Tumoren.** Für die Experimente mit oxPI wurden die primären Melanom-Zelllinien SBcl2 (Muttermalzellen) und WM35 sowie die metastasierenden Melanomzell-Linien WM164 und WM9 verwendet. (Bilder von Claudia Ramprecht, Dissertation, TU Graz, 2013)

3.1 Effekte oxidierter Phospholipide auf die Zellmorphologie

Um die Auswirkung von POVPC und PGPC auf die Zellmorphologie zu untersuchen wurde die primäre Melanom-Zelllinie SBcl2 mit verschiedenen Konzentrationen der oxidierten Phospholipide inkubiert und anschließend die Zellmorphologie über eine bestimmte Zeitspanne hinweg beobachtet. Dafür wurde ein Durchlichtmikroskop mit 320facher Vergrößerung verwendet.

In Abbildung 9 sind native SBcl2 Zellen in RPMI 1640 Medium + 2% FCS dargestellt. Die hier abgebildeten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 50% gezüchtet und lediglich vor dem Mikroskopieren gewaschen (siehe Methodenteil).

Die SBcl2 Zellen haften zum Großteil am Boden der Mikrotiterplatte an und bilden dabei einen relativ gleichmäßigen Zellrasen, der aus eher länglichen, morphologisch unauffälligen Einzelzellen besteht. Nur wenige Zellen haben sich abgelöst (runde, kugelige Zellen) und schwimmen im Medium.

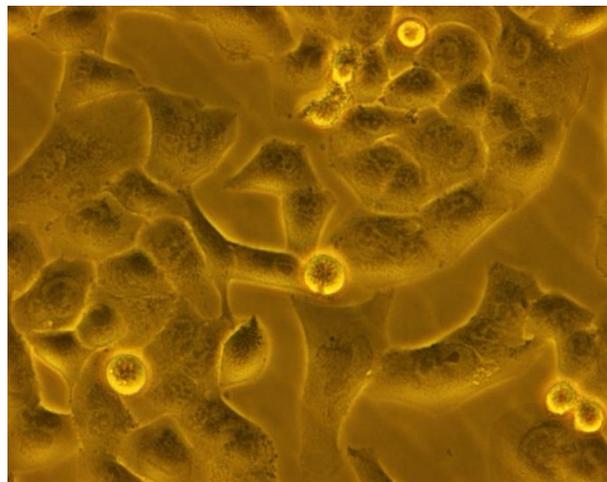


Abbildung 9: **SBcl2 Zellen** in RPMI 1640 Medium + 2% FCS. 320fache Vergrößerung.

Wie oben erwähnt wurden die SCBcl2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an POVPC und PGPC behandelt um den zytotoxischen Effekt der oxPL über morphologische

Veränderungen beobachten zu können. Dazu wurden für beide oxidierten Phospholipide Konzentrationen von 25 μM und 50 μM in RPMI 1640 mit 0.1% FCS eingesetzt.

Weiters wurden SBcl2 Zellen mit 1% EtOH (v/v) in RPMI 1640 mit 0.1% FCS inkubiert um eine Kontrollprobe ohne den Effekt der oxidierten Phospholipide zu generieren (Negativkontrolle).

Um eine Kontrollprobe für Apoptose-induzierte morphologische Veränderungen zu bekommen wurden die SBcl2 Zellen mit 10 μM Staurosporin (STS) (in RPMI 1640 + 0.1% FCS), einem Apoptoseinitiator behandelt. STS fungiert als Protein Kinase (PK) Inhibitor und greift so in die apoptotische Signaltransduktion ein. (Bertrand *et al.*, 1994)

Zusätzlich wurden SBcl2 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an H_2O_2 in RPMI 1640 + 0.1% FCS versetzt das konzentrationsabhängig als Nekroseinitiator fungiert. (Dybbukt *et al.*, 1994)

Abbildung 10 zeigt SBcl2 Zellen nach 0 min Inkubationszeit mit EtOH, PGPC, POVPC und STS. Es sind keine morphologischen Veränderungen zwischen den einzelnen Zellpräparaten zu erkennen.

Nach 15min (Abb. 11) zeigen die mit 10 μM STS behandelten Zellen erste morphologische Veränderungen, was auf eine beginnende Zellschädigung hinweist. Jedoch sind bei den mit oxPL inkubierten Zellen noch keine Veränderungen zu beobachten.

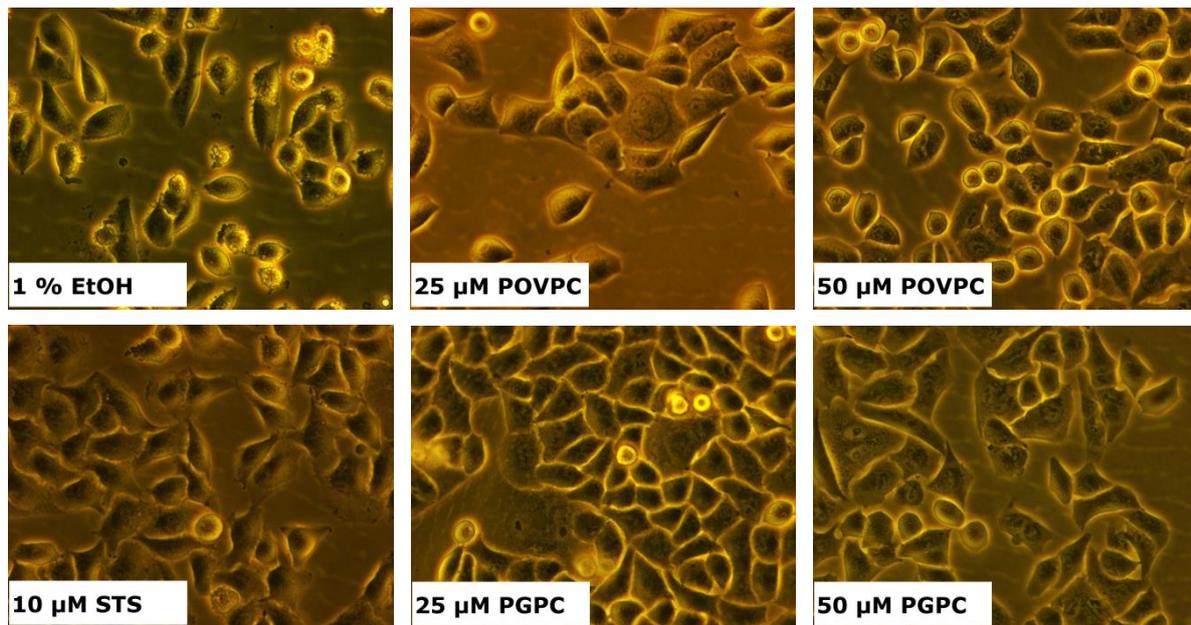


Abbildung 10: Effekt oxidierter Phospholipide auf die Morphologie von SBcl2 Zellen. Die Zellen wurden mit 1% EtOH, 25 μM POVPC, 50 μM POVPC, 10 μM STS, 25 μM PGPC, 50 μM PGPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS versetzt und sofort mikroskopiert. 320fache Vergrößerung.

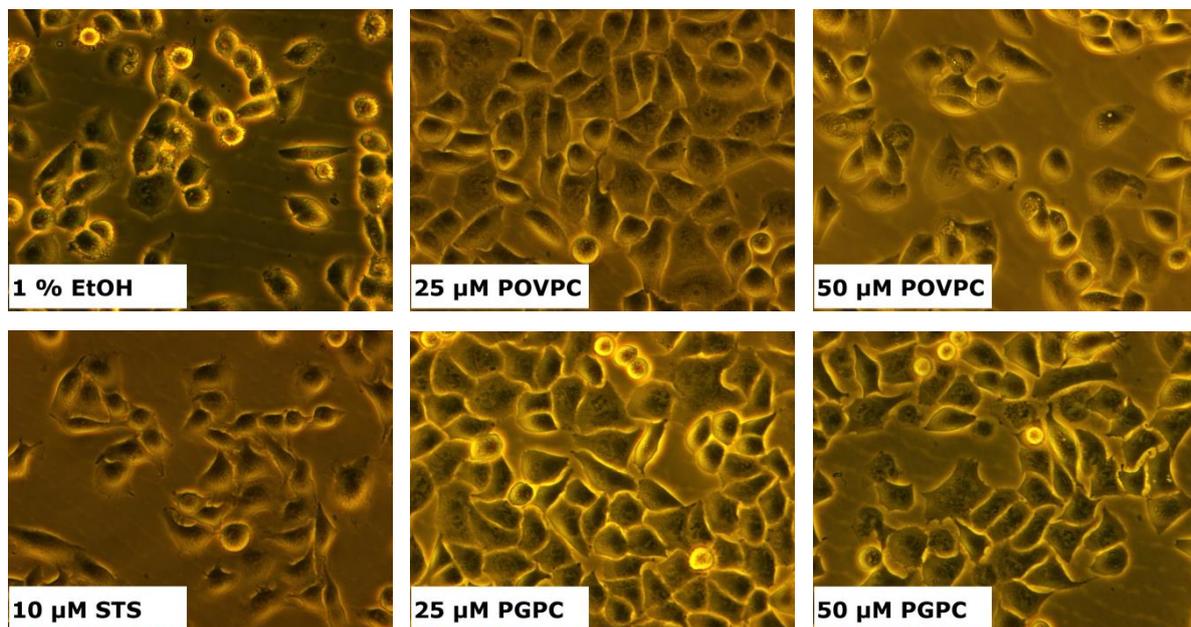


Abbildung 11: Effekt oxidierter Phospholipide auf die Morphologie von SBcl2 Zellen. Die Zellen wurden mit 1% EtOH, 25 μM POVPC, 50 μM POVPC, 10 μM STS, 25 μM PGPC, 50 μM PGPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS versetzt und nach 15 min mikroskopiert. 320fache Vergrößerung.

Abbildung 12 zeigt die verschieden behandelten SBcl2 Zellen nach 6 h Inkubationszeit. Starke morphologische Veränderungen sind bei den mit 10 μM STS inkubierten Zellen zu beobachten. Es gibt keine auffälligen Morphologischen Unterschiede zwischen den mit oxPL inkubierten Zellen und der EtOH-Negativkontrolle.

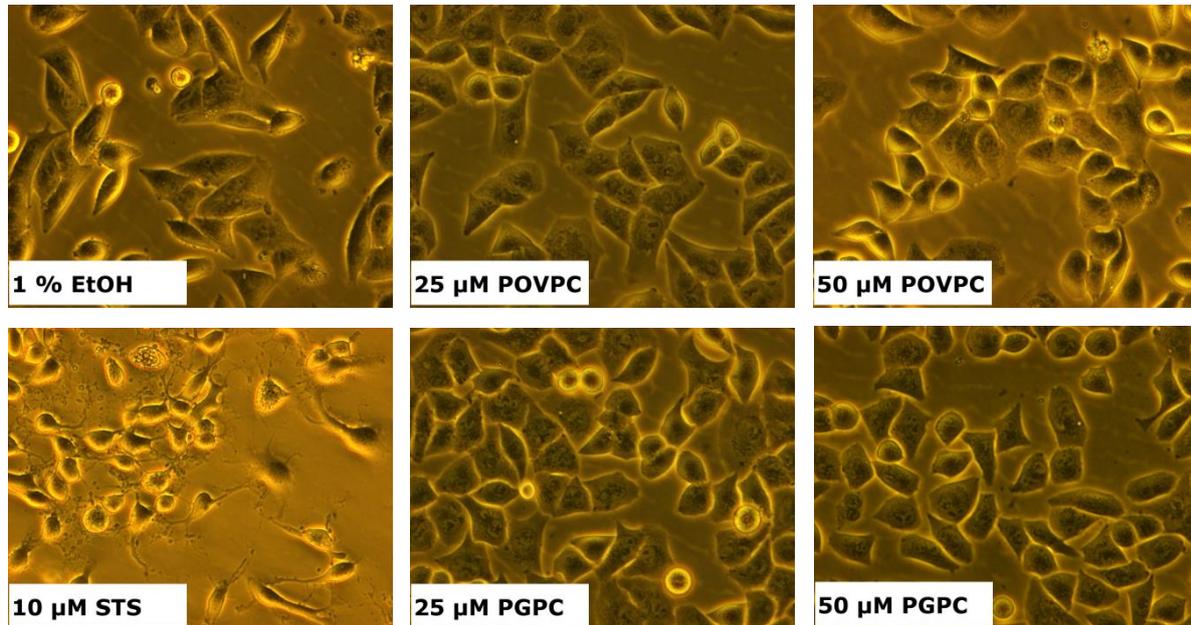


Abbildung 12: **Effekt oxidierter Phospholipide auf die Morphologie von SBcl2 Zellen.** Die Zellen wurden mit 1% EtOH, 25 μM POVPC, 50 μM POVPC, 10 μM STS, 25 μM PGPC, 50 μM PGPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS versetzt und nach 6 h mikroskopiert. 320fache Vergrößerung.

Nach 24h Inkubationszeit (Abb. 13) sind die mit 10 μM STS behandelten Zellen fast zur Gänze aufgelöst, die verbliebenen Zellen weichen in Ihrer Morphologie gravierend von der Negativkontrolle ab. Die SBcl2 Zellen sind nicht mehr intakt vorhanden, Zellfragmente hafteten am Boden der Mikrotiterplatte und kugelige Zellbestandteile schwimmen im Medium.

Von den mit oxidiertem Phospholipid inkubierten Zellen zeigen lediglich die mit 50 μM PGPC behandelten Zellen eine Veränderung im Vergleich zur Negativkontrolle. Hier sind deutlich weniger Zellen vorhanden als zu Beginn der Inkubation. Der Großteil der noch vorhandenen Zellen weicht in seiner Morphologie von der EtOH-Kontrolle ab. Die Zellen weisen eine raue Oberfläche auf, sind „löchriger“ und kugelig als die Zellen der Negativkontrolle.

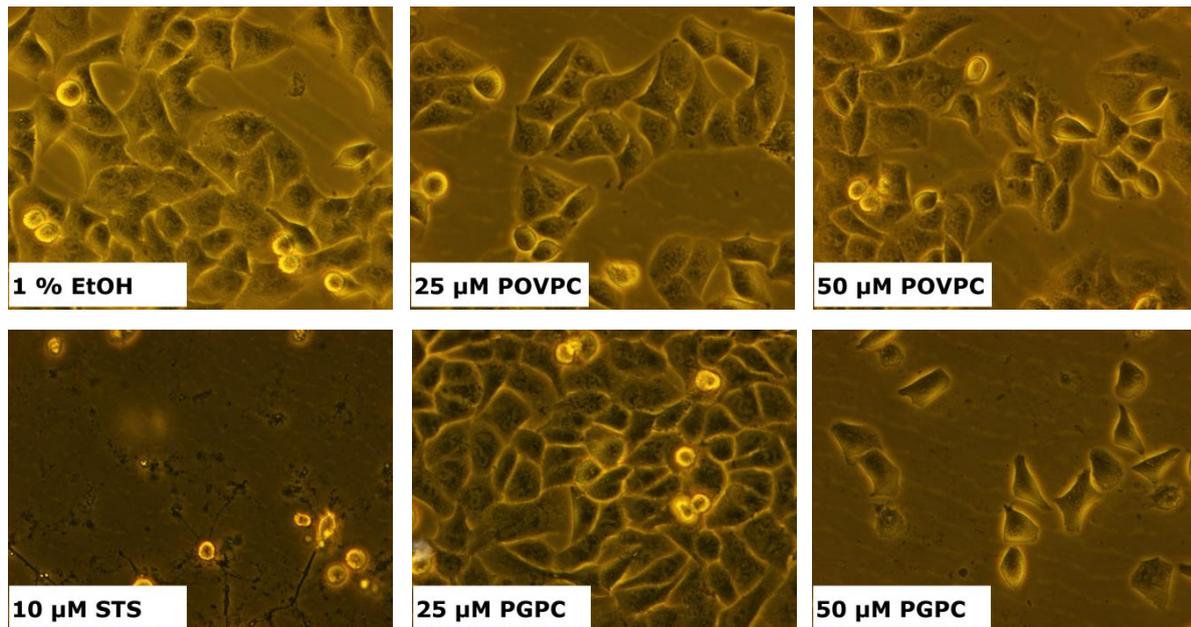


Abbildung 13: **Effekt oxidierter Phospholipide auf die Morphologie von SBcl2 Zellen.** Die Zellen werden mit 1% EtOH, 25 µM POVPC, 50 µM POVPC, 10 µM STS, 25 µM PGPC, 50 µM PGPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS versetzt und nach 24 h mikroskopiert. 320fache Vergrößerung

Abbildung 14 zeigt die morphologischen Unterschiede zwischen SBcl2 Zellen die entweder mit einem Apoptose-(STS) oder einem Nekrose(H_2O_2)-initiator inkubiert wurden. Muttermalzellen die für 24 h mit 80 mM H_2O_2 behandelt wurden sind deutlich von mit 10 µM STS (induziert Apoptose) über denselben Zeitraum inkubierten SBcl2 Zellen zu unterscheiden. Die mit 80 mM H_2O_2 behandelten Zellen sind kugelig und löchrig, wohingegen die mit 10 µM STS inkubierten Zellen geschrumpft und fragmentiert aussehen. In beiden Fällen lassen die morphologischen Veränderungen verglichen zu nativen SBcl2 Zellen (Abb. 9) auf eine starke Zellschädigung schließen.

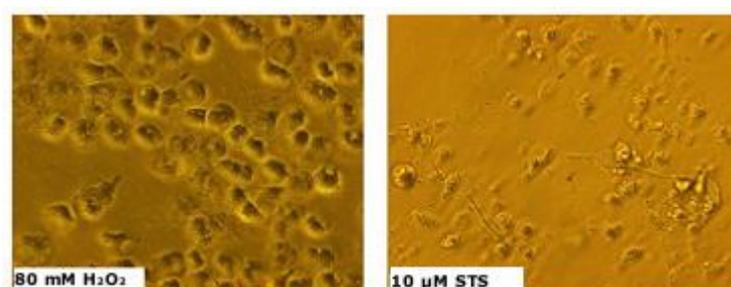


Abbildung 14: **SBcl2 Muttermalzellen nach 24 h Inkubation mit 80 mM H_2O_2 in RPMI 1640 mit 0.1% FCS und 10 µM STS in RPMI 1640 mit 0.1% FCS.** 320fache Vergrößerung.

3.2 Effekte oxidierter Phospholipide auf die Ceramid Synthese

Das bioaktive Sphingolipid Ceramid ist ein wichtiges Intermediat des Sphingomyelin-Stoffwechsels und fungiert als Signalmolekül innerhalb der Zelle. Als sogenannter „second messenger“ greift es in die Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose ein. (Hannun und Luberto, 2000)

In besonders bei der Regulierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, nimmt Ceramid eine wichtige Rolle ein. (Pettus *et al.*, 2002)

Zytokine, zytotoxische Agentien, ultraviolette Strahlung und andere Stresssignale bewirken Veränderungen im Sphingomyelin- Stoffwechsel, die zu einer Akkumulation von Ceramid in der Zelle führen. (Hannun und Luberto, 2000)

Ceramid wird in der Zelle auf unterschiedliche Arten gebildet und weiter katabolisiert. Es entsteht im Zuge des Sphingomyelin-Stoffwechsels durch die Hydrolyse von Sphingomyelin mittels Sphingomyelinase. Weiters wird Ceramid *de novo* mittels katalysierter Acylierung von Sphingamin durch Ceramidsynthase (CerS) gebildet. Schließlich kann es durch Reacylierung von Sphingosin, das beim Abbau von Spingomyelin entsteht, synthetisiert werden. (Hannun und Luberto, 2000)

Expression und Aktivität beider Enzyme, Ceramidsynthase und saurer Sphingomyelinase, korrelieren mit Zellstress und werden durch zytotoxische Agentien beeinflusst (Reynolds *et al.*, 2003). Diese beiden Enzyme können auch dazu herangezogen werden um zytotoxische Effekte von oxPI auf Melanomzellen zu untersuchen.

Saure Sphingomyelinase

Es gibt fünf verschiedene Sphingomyelinasen in Säugetierzellen. Sie werden anhand ihrer pH Optima und Lokalisation in den Zellen charakterisiert und katalysieren alle die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid. (Pettus *et al.*, 2002)

Frühere Studien auf diesem Gebiet haben gezeigt, dass die saure Sphingomyelinase in vaskulären glatten Muskelzellen durch die oxidierten Phospholipide POVPC und PGPC aktiviert wird, was wiederum Ceramid-abhängige Apoptose- Signalwege induziert. (Loidl *et al.*, 2003)

Die Aktivität der sauren Sphingomyelinase in der humanen metastasierenden Krebszelllinie WM9 wurde mittels eines Fluoreszenz-Assays bestimmt. Für den Assay wurde fluoreszierendes NBD- Sphingomyelin verwendet, das von der sauren Sphingomyelinase zu fluoreszierendem NBD-Ceramid hydrolysiert und anschließend mittels Dünnschichtchromatographie von der Ausgangsverbindung getrennt wurde (Loidl *et al.*, 2002). Die Fluoreszenzintensität der NBD-Ceramid Spots wurde mittels Herolab CCD-Kamera gemessen. Dabei wurden gleichzeitig beide Lichtquellen verwendet (Anregung bei 256+365 nm).

Um die Aktivität der aSMase über die Ceramidbildung absolut bestimmen zu können wurde eine Kalibrationsgerade (Fluoreszenzintensität vs. Lipidkonzentration) mit fluoreszierendem NBD-Ceramid erstellt. Die Messparameter waren für die Kalibrationsgerade und die eigentlichen Aktivitätsbestimmungen gleich.

Abbildung 15 zeigt eine DC-Platte, auf der steigende Konzentrationen von NBD-Ceramid aufgetragen wurden. Die Konzentration und die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Spots wurden für die Erstellung einer Kalibrationsgerade verwendet. Es ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Menge an NBD-Ceramid zu erkennen. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Konzentration an aufgetragenem NBD-Ceramid. Die

Konzentration an aufgetragenem NBD-Ceramid wurde so gewählt, dass die Werte der Intensitäten der Aktivitätsmessung auf dieser Kalibrationsgerade liegen.

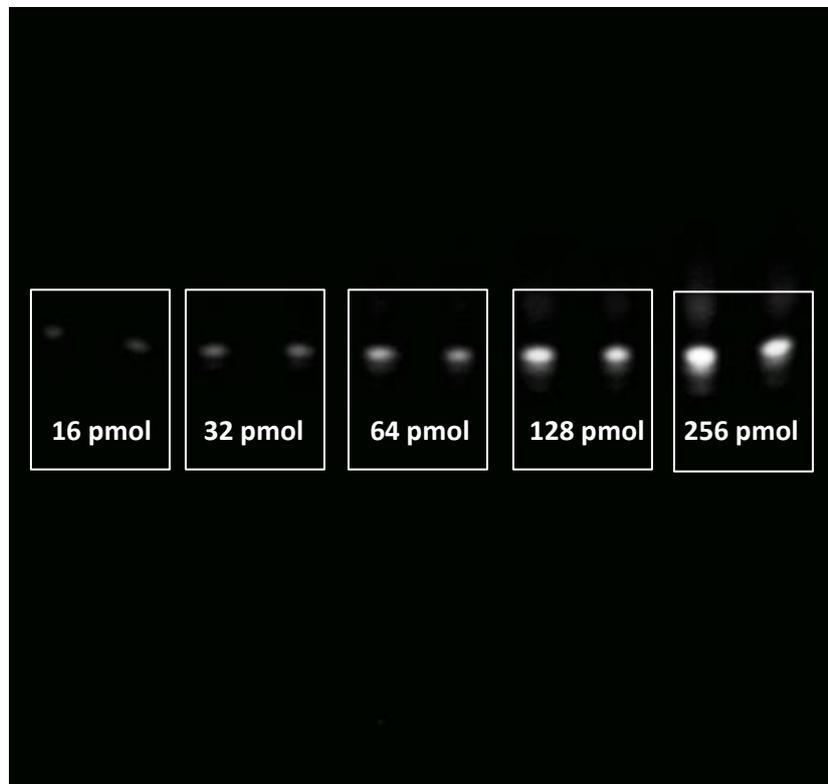


Abbildung 15: **Konzentrationsabhängige Fluoreszenz von NBD-Ceramid auf Kieselgel.** NBD-C₆-Ceramid wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (16 pmol, 32 pmol, 64 pmol, 128 pmol, 256 pmol) jeweils zweimal nebeneinander auf eine DC-Platte aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde ein 100 nmol-NBD-C₆-Ceramid-Aliquot in 200 µL CHCl₃ gelöst und auf 1 pmol/µL mit Chloroform verdünnt. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das Chromatogramm wurde mittels CHCl₃:MeOH:H₂O (65:25:4 v/v/v) als Laufmittel entwickelt. Die Fluoreszenz wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen. (siehe Methodenteil)

Für die Kalibrationsgerade (Abbildung 16) wurde die NBD-Ceramid Konzentration gegen die relative Intensität des fluoreszierenden Ceramids aufgetragen. Jeder der aufgetragenen Werte ist der Mittelwert einer Doppelbestimmung. Abbildung 16 veranschaulicht die hohe, über einen weiten Konzentrationsbereich beständige, Linearität dieser Methode.

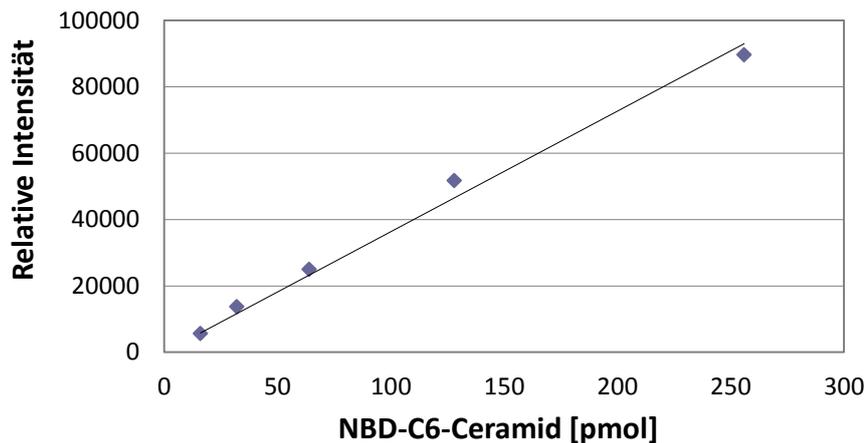


Abbildung 16: **Kalibrationsgerade für die Bestimmung der aSMase Aktivität mittels Fluoreszenz-Assay.** NBD-C₆-Ceramid wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (16 pmol, 32 pmol, 64 pmol, 128 pmol, 256 pmol) auf eine DC-Platte aufgetragen und die Fluoreszenzintensität mittels CCD-Kamera gemessen.

Für die Messung der aSMase Aktivität in WM9 Zellen wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 25 μ M POVPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS für 0, 2, 5 und 15 min inkubiert, geerntet und lysiert. Anschließend wurden 2 μ g Protein einem NBD-Sphingomyelin-Mix zugesetzt. Die im Zelllysat enthaltene aSMase setzt das NBD-Sphingomyelin zu NBD-Ceramid um. Nach Inkubation wurden die durch Phasentrennung erhaltenen Lipidextrakte auf eine DC-Platte aufgetragen (Details siehe Methodenteil).

Die in Abbildung 19 dargestellten Daten stammen aus der Dissertation von Claudia Ramprecht (2013) und wurden wie oben beschrieben gewonnen. Es wurde jedoch mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS für 0, 5 und 15 min inkubiert. Die aufgetragenen Proteinmengen betragen 4 bzw. 15 μ g.

Abbildung 17 zeigt ein für ein Experiment typisches DC. Das Substrat, NBD-Sphingomyelin, ist im unteren Bereich des DCs zu sehen, während das Produkt aus der Umsetzung mit der sauren Sphingomyelinase, NBD-Ceramid, sich im oberen Bereich des DCs befindet.

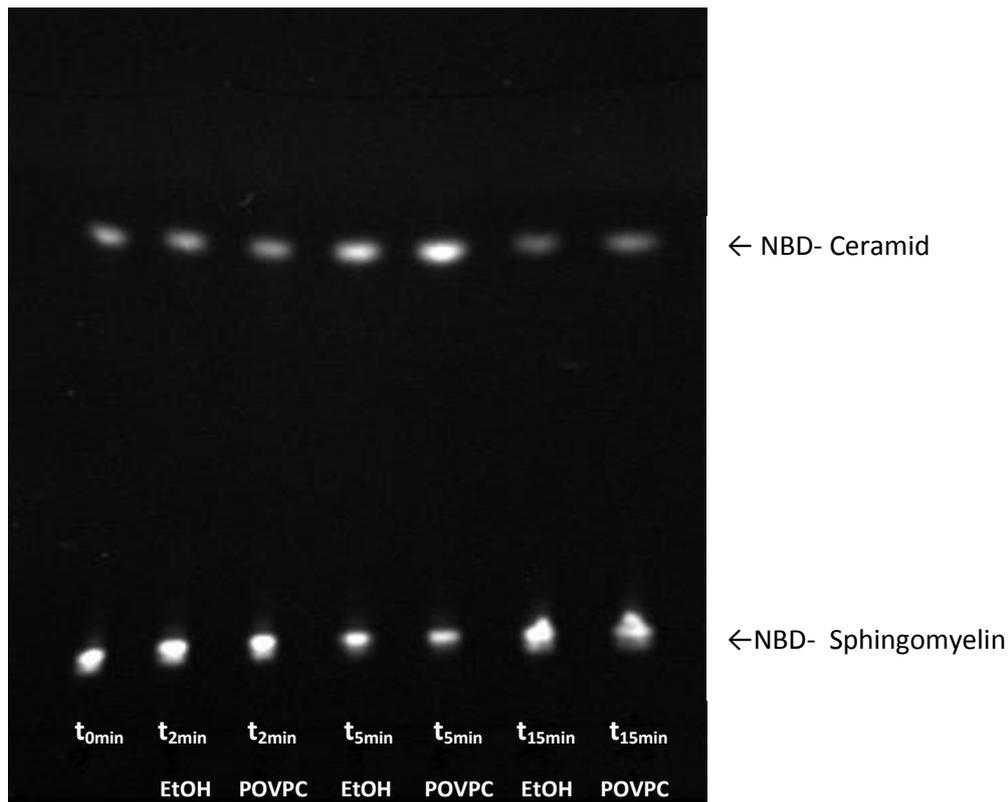


Abbildung 17: **Zeitabhängige Ceramid-Bildung als Folge der aSmase Aktivität.** Zellen der Linie WM9, metastasierende Melanom Zellen, wurden mit 25 μM POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS für 2, 5 und 15 min inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in saurem Lyse-Puffer lysiert. Anschließend wurden 2 μg Protein einem NBD-Sphingomyelinsubstrat (siehe Methodenteil) zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die Lipide extrahiert und mittels DC aufgetrennt. Die Intensität der fluoreszierenden Ceramid bzw. Sphingomyelinspots wurde mittels CCD-Kamera detektiert.

Für jeden Zeitpunkt wurde eine Kontrollprobe mit 1% EtOH in RPMI 1640 Medium + 0.1% FCS erstellt und auf das DC aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min war die Fluoreszenzintensität des NBD-Ceramid Spots der POVPC-Probe deutlich höher als die der Kontrollprobe mit 1% EtOH. Die gesteigerte Menge an NBD-Ceramid resultiert aus einer gesteigerten aSMase Aktivität. Dieser deutliche Unterschied war nach Inkubationszeiten von 2 und 15 min nicht feststellbar. Für die interne Referenzierung der Daten wurden die Intensitäten der NBD-Ceramid Spots durch die Intensität des Totallipids (NBD-Ceramid+NBD-Sphingomyelin-Spots) dividiert, um Volums- Fehler zu korrigieren, die beim Auftragen auf die DC-Platte entstehen können.

Abbildung 18 zeigt die statistische Auswertung der Daten. Dabei wurde jeweils die aSMase Aktivität gegen die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen. In Abbildung 18 A wurde die

Aktivität der sauren Sphingomyelinase auf die Kontrollprobe zum Zeitpunkt 0 ($t=0\text{min}$) bezogen, in Abbildung 18 B auf die Ethanolkontrolle. Die abgebildeten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Nach 2 min Inkubationszeit ist kein Unterschied in der aSMase Aktivität bei der mit $25\ \mu\text{M}$ POVPC stimulierten Proben verglichen zur Negativkontrolle erkennbar. Nach 5 min Inkubationszeit ist ein deutlicher Anstieg der aSMase Aktivität bei den mit $25\ \mu\text{M}$ POVPC inkubierten WM9 Zellen gegenüber der Negativkontrolle feststellbar, wohingegen nach einer Inkubationszeit von 15 min die relative aSMase Aktivität wieder sinkt.

Der nach 5min Inkubationszeit hervorgerufene oxPL-induzierte Aktivitätsanstieg der aSMase in den WM9 Zellen entspricht früheren Beobachtungen an vaskulären glatten Muskelzellen und RAW Makrophagen. Schon in vorhergegangenen Studien wurde beobachtet, dass POVPC, als zytotoxisches Agens, die Expression und Aktivität der sauren Sphingomyelinase beeinflusst (Loidl *et al.*, 2002) (Stemmer *et al.*, 2012). Für statistisch signifikante Unterschiede wären jedoch auf jeden Fall weitere unabhängige Experimente notwendig gewesen.

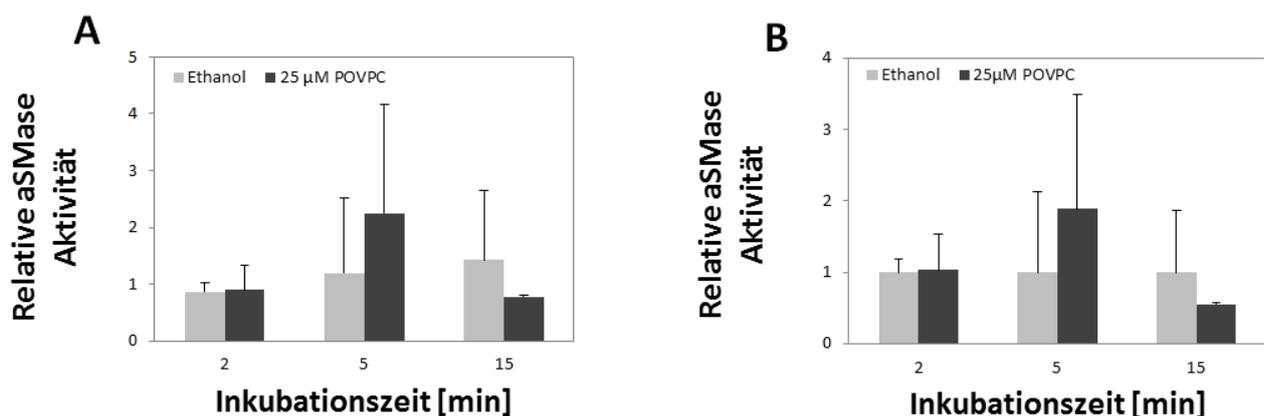


Abbildung 18: **Auswirkung von POVPC auf die aSMase Aktivität.** Zellen der Linie WM9, metastasierende Melanom Zellen, wurden mit $25\ \mu\text{M}$ POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS für 2, 5 und 15 min inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in saurem Lyse-Puffer lysiert. Die aSMase Aktivität wurde mit einem Fluoreszenz-Aktivitätsassay bestimmt. Dafür wurden $2\ \mu\text{g}$ Gesamtprotein des Zelllysats eingesetzt. Die absolute Enzymaktivität zum Zeitpunkt 0 (t_0) war $5.82\ \text{pmol}/\text{min}/\mu\text{g}$ Protein. A, relative saure Sphingomyelinase Aktivität bezogen auf den Zeitpunkt 0. B, relative saure Sphingomyelinase Aktivität bezogen auf die Kontrollproben (=100%). Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$) dargestellt. Die Unterschiede waren nach Student T-Test nicht signifikant.

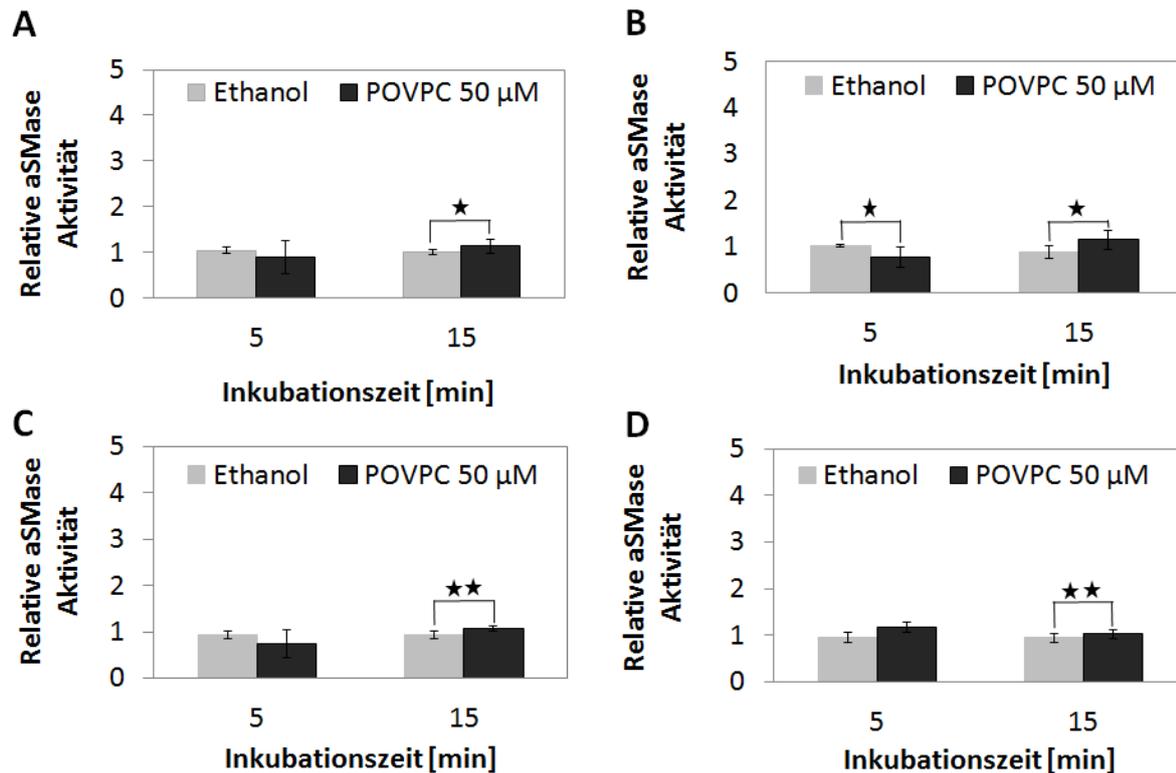


Abbildung 19: **Auswirkung von POVPC auf die aSMase Aktivität verschiedener Melanom-Zelllinien.** Primäre(SBcl2, WM35) und metastasierende (WM164, WM9) Melanom Zellen, wurden mit 50 µM POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS für 5 und 15 min inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in saurem Lyse-Puffer lysiert. Die aSMase Aktivität wurde mit einem Fluoreszenz-Aktivitätsassay bestimmt. Dafür wurden 4 bzw. 15 µg Gesamtprotein des Zellysats eingesetzt. Die relative Aktivität der aSMase wurde auf den Zeitpunkt 0 bezogen. Relative saure Sphingomyelinase Aktivität in **A**, SBcl2; **B**, WM35; **C**, WM 164; **D**, WM9 Melanom Zellen. Daten werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 4$) dargestellt und wurden mittels Student T-Test auf Signifikanz geprüft. * $P \leq 0.05$ verglichen zur Ethanolkontrolle. ** $P \leq 0.005$ verglichen zur Ethanolkontrolle. (Daten: Claudia Ramprecht, Dissertation, TU Graz, 2013)

Abbildung 19 zeigt die statistische Auswertung der relativen sauren Sphingomyelinaseaktivität in primären (SBcl2 (19 A), WM35 (19 B)) und metastasierenden (WM164 (19 C), WM9 (19 D)) Melanomzelllinien. Die Zellen wurden mit 50 µM POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS für 5 und 15 min inkubiert. Die relative saure Sphingomyelinaseaktivität wurde auf die Kontrollprobe (Zusammensetzung siehe oben) zum Zeitpunkt 0 ($t=0$ min) bezogen.

In SBcl2, WM35 und WM164 Zellen ist die relative aSMase-Aktivität nach 5 min Inkubationszeit niedriger als in der jeweiligen Negativkontrolle. In WM 9 Zellen jedoch ist die relative aSMase-Aktivität höher als in der zugehörigen Negativkontrolle. Das passt zu den in

Abb. 18 gemachten Beobachtungen. Nach 15 min Inkubation mit POVPC ist die relative Aktivität der sauren Sphingomyelinase in allen Zelllinien höher als in den korrespondierenden Ethanolkontrollen.

Ceramidsynthase

Die Ceramidsynthase ist ein Schlüsselenzym der *de novo* Synthese von Ceramid. Ausgangsprodukte sind dabei L- Serin und Palmitoyl CoA. Zunächst entsteht über einen Zwischenschritt Sphinganine. Sphinganine wird dann von einer Ceramid Synthase (=N-Acyl Transferase) zu Dihydroceramid acyliert und anschließend zu Ceramid metabolisiert (siehe Abbildung 19). Durch die Verwendung verschieden langer Acyl-Ketten für die Acylierung von Sphinganine entstehen Ceramide mit verschieden langen Acyl-Ketten. Es gibt sechs verschiedene Ceramidsynthasen in Säugetieren, die sich hauptsächlich in ihrer Spezifität für verschieden lange Acyl-Ketten unterscheiden und die damit wesentlich das Fettsäuremuster einer Zelle beeinflussen. (Levy *et al.*, 2010)

Um Rückschlüsse auf die Effekte der oxPL auf die *de novo* Synthese von Ceramid ziehen zu können entschieden wir uns für eine Expressionsanalyse der Ceramidsynthasen unter dem Einfluss dieser zytotoxischen Verbindungen in humanen Muttermal- und Melanomzellen.

Im Zuge dieser Arbeit untersuchten wir drei Ceramidsynthasen. Wir entschieden uns für eine Expressionsanalyse der CerS2, 3 und 4 in allen verwendeten Zelllinien (SBcl2, WM35, WM9, WM164).

Von den sechs verschiedenen Ceramidsynthasen in Säugetieren wird die CerS2 universell exprimiert, sie fungiert als sogenanntes „housekeeping gene“ (Laviad *et al.*, 2008). Ceramidsynthase 3 wird speziell in der Haut und hier besonders in den Keratinocyten exprimiert und ist daher für die Studie von Melanomzellen von besonderem Interesse (Mizutani *et al.*, 2009), auch CerS4 wird in hohem Maß in der Haut exprimiert (Stiban *et al.*, 2010).

Die Melanomzellen wurden für 6 und 24 h mit 50 μM POVPC in RPMI Medium 1640 mit 0.1% FCS inkubiert. Kontrollproben wurden nur mit RPMI 1640 mit 0.1% FCS das 1% EtOH (v/v) enthielt inkubiert. Für die Herstellung des Inkubationsmediums mit oxPI werden die Lipide zuvor in EtOH aufgenommen, somit enthält das Inkubationsmedium mit oxPI auch EtOH. Die Endkonzentration an EtOH im Inkubationsmedium darf dabei 1% (v/v) nicht übersteigen, da es sonst zu Zellschäden führen könnte.

Die Analyse der Proteinexpression wurde semi-quantitativ mittels Western blotting durchgeführt.

Die Melanomzellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen und mit 50 μM POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS beziehungsweise mit 1% EtOH in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS für 6 und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und je 20 μg Protein für das Western Blotting verwendet. Die Western Blots wurden mit dem, für die jeweilige CerS spezifischen, primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde CerS2 mittels FITC-markierten sekundären Antikörpern und CerS3 und CerS4 mittels HPO-aktiven sekundären Antikörpern detektiert. (Details siehe Methodenteil)

In Abbildung 20 sind beispielhafte Western Blots der jeweiligen CerS abgebildet. Es ist ein Expressionsabfall der CerS2 nach 24 Stunden Inkubation mit 50 μM POVPC verglichen zur Negativkontrolle zu erkennen. Diese verringerte Expression der CerS2 nach 24 h Inkubation mit 50 μM POVPC war in allen drei humanen Melanom-Zelllinien vorhanden.

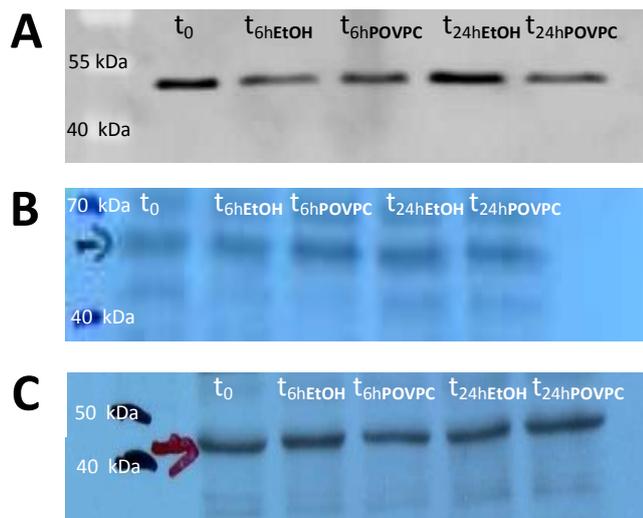


Abbildung 20: **Expression von Ceramidsynthase 2 (A) in SBcl2-, und CerS3 (B) in WM35- und CerS4(C) in WM35-Zellen.** Die Zellen wurden mit 0.1% EtOH oder 50 μ M POVPC inkubiert. Die CerS wurden wie im Methodenteil angegeben, mittels Western blotting bestimmt. Zu diesem Zweck wurde CerS2 mit FITC-markiertem sekundärem Antikörper und CerS3 und 4 mit HPO-aktivem sekundärem Antikörper inkubiert und mittels Fluoreszenzsignal detektiert. Die Molekulargewichte (in Da) der verschiedenen Ceramidsynthasen lauten wie folgt: CerS2: 44.876; CerS3: 46.217; CerS4: 46.339 (Levy *et al.*, 2010).

Abbildung 21 zeigt die statistische Auswertung der Expressionsunterschiede, der CerS2, zwischen den mit oxPL behandelten Zellen und den jeweiligen Negativkontrollen. Die relative Bandenintensität (relative Intensitäten bezogen auf die Bandenintensität zum Zeitpunkt 0, $t=0$ min) der CerS2 auf den Western Blots wurde gegen die Inkubationszeit in Stunden aufgetragen. In SBcl2 Zellen (Abb. 20A) hat POVPC nach einer Inkubationszeit von 6 h keine Auswirkungen auf die Expression der CerS2. Nach einer Inkubationszeit von 24 h ist die Expression von Ceramidsynthase2 in den mit oxPL inkubierten Proben niedriger als in der zugehörigen Negativkontrolle.

Dieses „Herunterregulieren“ der CerS2 Expression ist auch in den anderen Melanom-Zelllinien zu verzeichnen, wobei in WM35 Zellen (Abb. 20B) eine deutlich größerer Unterschied zwischen POVPC- und Negativkontroll-Probe und in WM9 Zellen (Abb. 21C) ein geringerer Unterschied als in SBcl2 Zellen (Abb. 21 A) zu sehen ist. In WM35 Zellen (Abb. 21 B) ist 6 h Inkubationszeit ein geringer Anstieg der CerS2 Expression in der POVPC-Probe verglichen zur

Negativkontrolle feststellbar. Dieser nicht signifikante Expressionsanstieg der CerS tritt auch in WM9 Zellen (Abb. 21 C) auf. Besonders hervorzuheben ist jedoch der Expressionsabfall der CerS2 in den oxPL Proben nach einer Inkubationszeit von 24 h (siehe oben) der sich mit deutlicher Kontinuität durch alle drei Zelllinien (SBcl2, WM35, WM9) zieht.

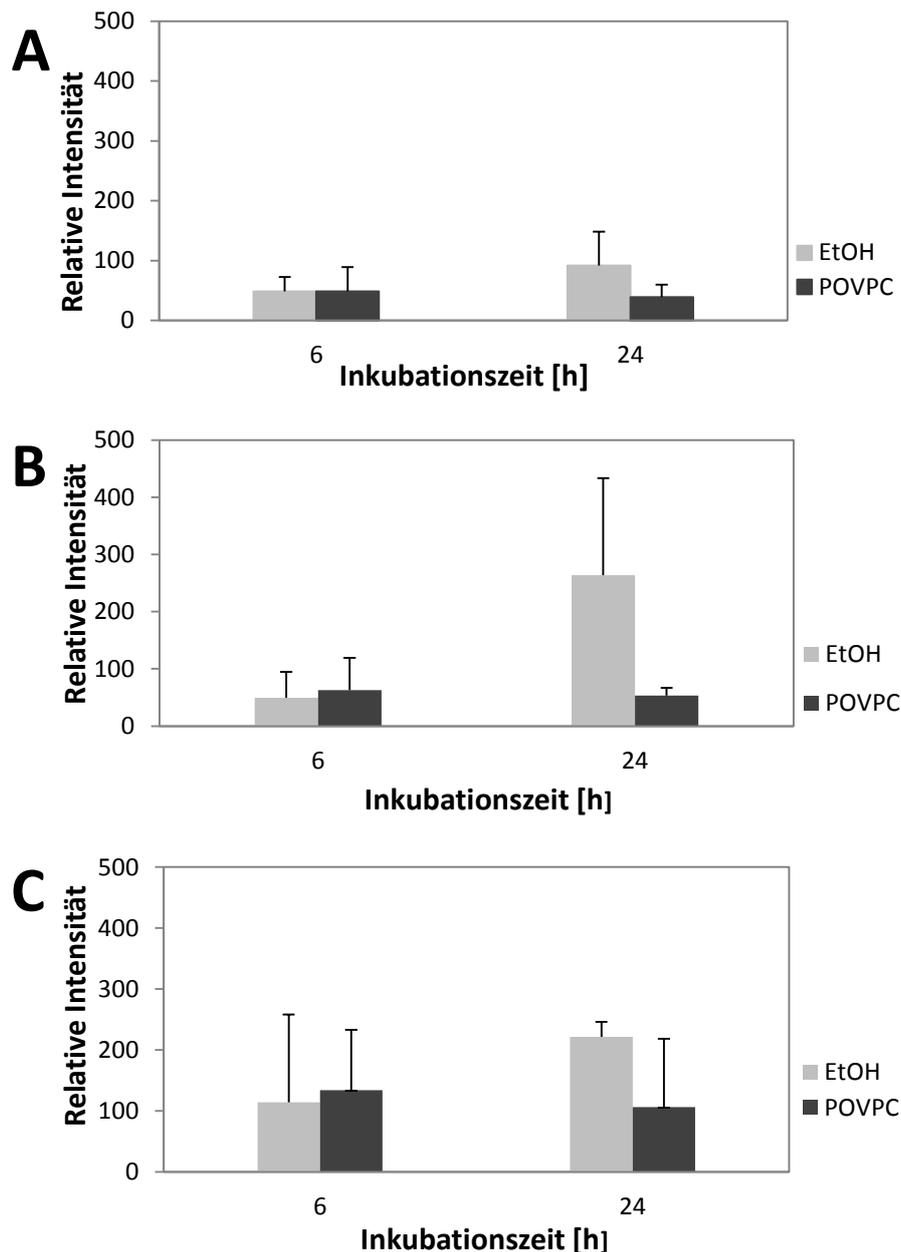


Abbildung 21: **Effekt von POVPC auf die Expression von Ceramidsynthase 2 in Melanom- und Muttermalzellen.** Konfluente Zellen wurden mit 50 μ M POVPC für 6 und 24 Stunden inkubiert. CerS 2 wurde mittels Western blotting detektiert. Dafür wurden ein anti-CerS2 primärer Antikörper und ein sekundärer FITC-markierter Antikörper verwendet. Abgebildet sind die Bandenintensitäten relativ zu den Werten zum Zeitpunkt 0 (t_0). **A**, CerS2 in SBcl2 Zellen. **B**, CerS2 in WM35 Zellen. **C**, CerS2 in WM9 Zellen.

Abbildung 22 zeigt die statistische Auswertung der Expressionsunterschiede, von CerS3, zwischen den mit oxPL behandelten Zellen und der jeweiligen Negativkontrolle. Wiederum wurde die relative Bandenintensität der CerS3 auf den Western Blots gegen die Inkubationszeit in Stunden aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 6 h ist, im Vergleich zur Negativkontrolle, ein geringer, jedoch nicht signifikanter Expressionsanstieg der CerS3 in den mit oxPL inkubierten WM35 Zellen festzustellen. Nach 24 h Inkubationszeit ist ein Expressionsabfall der CerS in den mit POVPC behandelten Zellen (verglichen zur Negativkontrolle) zu verzeichnen. Die CerS3 konnte lediglich in WM35 Zellen nachgewiesen werden. In SBcl2, WM9 und WM164 konnte CerS3 mittels Western Blotting und Antikörperdetektion zu keinem Zeitpunkt (mit und ohne Inkubation mit POVPC) detektiert werden.

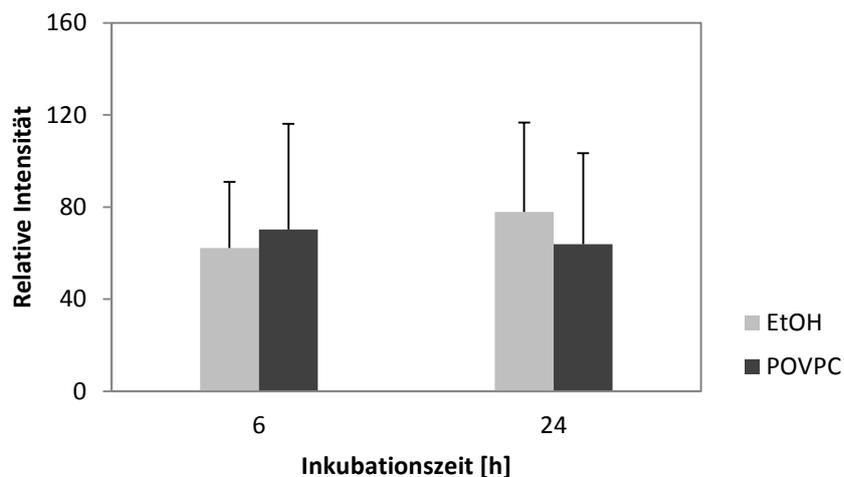


Abbildung 22: **Expression von Ceramidsynthase 3 in WM35 Zellen in Abhängigkeit von POVPC.** Konfluente Zellen wurden mit 50 μ M POVPC für 6 und 24 Stunden inkubiert. CerS2 wurde mittels Western blotting detektiert. Dafür wurden ein anti-CerS2 primärer Antikörper und ein sekundärer HPO-aktivierender Antikörper verwendet. Abgebildet sind die Bandenintensitäten relativ zu den Werten zum Zeitpunkt 0 (t_0).

Abbildung 23 zeigt die statistische Auswertung der Expressionsunterschiede der Ceramidsynthase 4 in SBcl2, WM35 und WM9 Zellen. Es wurde die relative Bandenintensität gegen die Inkubationszeit in Stunden aufgetragen. Nach einer 6stündigen Inkubation mit POVPC ist die Expression der CerS4 in SBcl2 (Abb. 23 A) und WM35 (Abb. 23 B) Zellen in den

mit oxPL behandelten Proben höher als in der jeweiligen Negativkontrolle. Dieser Effekt kann in WM9 Zellen (Abb. 23 C) nicht verzeichnet werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h ist in SBcl2 Zellen (Abb. 22 A) kein Expressionsunterschied festzustellen. Jedoch ist in den WM35 (Abb. 23 B) und WM9 (Abb. 23 C) Zellen der schon oben beschriebene Effekt zu sehen, dass nämlich die Expression der CerS4 in den mit oxPL behandelten Zellen geringer als in der jeweiligen Negativkontrolle ausfällt.

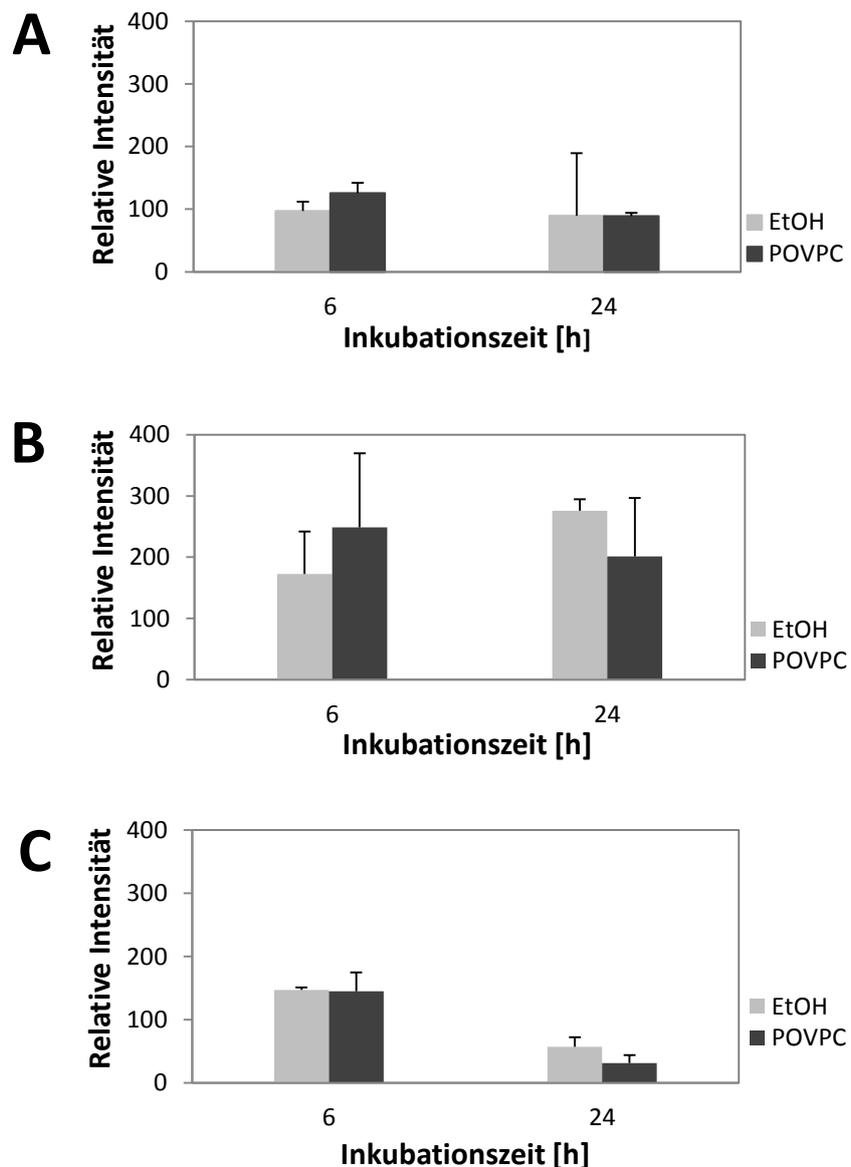


Abbildung 23: **Effekt von POVPC auf die Expression von Ceramidsynthase 4 in Melanom- und Muttermalzellen.** Konfluente Zellen wurden mit 50 μ M POVPC für 6 und 24 Stunden inkubiert. CerS4 wurde mittels Western blotting detektiert. Dafür wurden ein anti-CerS4 primärer Antikörper und ein sekundärer HPO-aktivierender Antikörper verwendet. Abgebildet sind die Bandenintensitäten relativ zu den Werten zum Zeitpunkt 0 (t_0). **A**, CerS4 in SBcl2 Zellen. **B**, CerS4 in WM35 Zellen. **C**, CerS4 in WM9 Zellen.

3.3 Lipidomanalyse

Durch die verschiedenen Synthesewege werden in der Zelle abhängig von den Versuchsbedingungen unterschiedliche Ceramid Spezies produziert. (Levy *et al.*, 2010)

Da unterschiedliche Ceramide verschiedene Aufgaben in der Zelle erfüllen, können die repräsentativen Ceramid- und Sphingomyelinspezies und das daraus resultierende Fettsäuremuster funktionelle Folgen nach sich ziehen. (Hannun und Luberto, 2000)

Die Stimulation der Melanomzelllinie WM9 mit dem oxidierten Phospholipid POVPC führte, abhängig von der Inkubationszeit, zu einem Anstieg der aSMase Aktivität in den Zellen. Es lag daher nahe, herauszufinden, welche Ceramid- und Sphingomyelinspezies als Folge der Inkubation mit POVPC gebildet werden. Dafür wurden die Ceramid- beziehungsweise Sphingomyelinmuster von unbehandelten Zellen mit den mit POVPC stimulierten Zellen verglichen.

Zellen aller eingesetzten Zelllinien (SBcl2, WM35, WM9, WM164) wurden für 15 min und 6 h mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 mit 0.1% FCS inkubiert. Weiters wurde eine Kontrollprobe mit 0.8% EtOH in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS erstellt, da die Lipide für die Herstellung des Inkubationsmediums mit oxPI zuvor in EtOH aufgenommen und diesem als ethanolische Lösung zugesetzt werden.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und eine Lipidextraktion mit anschließender milder alkalischer Hydrolyse durchgeführt. Die erhaltenen Lipidextrakte wurden extern, mittels Massenspektrometrie analysiert. (Details siehe Methodenteil)

Für die Auswertung wurde die Absolutmenge an verschiedenen Ceramid- beziehungsweise Sphingomyelinspezies auf den Gesamtproteingehalt in den jeweiligen Zellen bezogen. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurde dann die relative Menge verschiedener Ceramid- und Sphingomyelinspezies in Bezug auf die jeweiligen Fettsäuren aufgetragen.

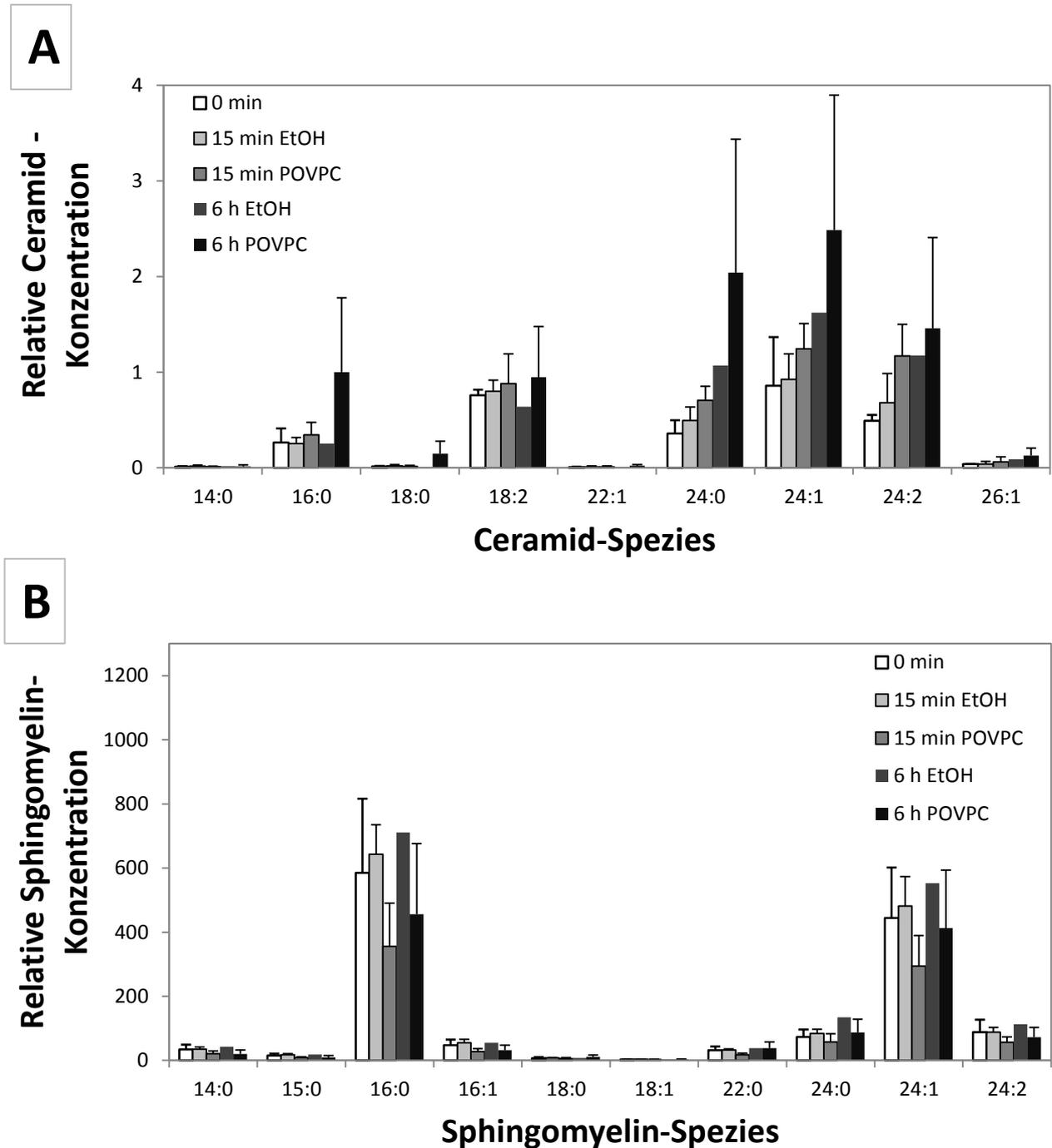


Abbildung 24: **Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin-Muster in SBcl2 Zellen.** Die Zellen wurden für 15 min bzw. 6 h mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS inkubiert. Die Kontrollproben enthielten nur Medium + EtOH(0.8%). Die Zellen wurden geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und anschließend einer milden alkalischen Hydrolyse unterworfen. Die MS-Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die angegebenen Kohlenwasserstoffketten beziehen sich auf die N-acylgruppe im Lipid. A, relative Ceramidkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. B, relative Sphingomyelinkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Abbildung 24 zeigt den Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin-Muster in SBcl2 Zellen. Abbildung 24 A zeigt verschiedene Ceramidspesies, wobei einige Ceramide mit

spezifischen Fettsäuren sowohl in den mit POVPC inkubierten Zellen als auch ihren korrespondierenden Negativkontrollen kaum vorhanden sind. Die relativen Konzentrationen an 14:0, 18:0, 22:1 und 26:1 Fettsäuren in den Ceramiden sind sehr gering. In den mit POVPC inkubierten Zellen gibt es einen geringen Anstieg an Ceramid-C_{18:0}-Fettsäuren nach 6 h Inkubationszeit. Ceramid-Palmitinsäure (16:0) ist in den Negativkontrollen und in den für 15 min mit 50 µM POVPC inkubierten SBcl2-Zellen gleichermaßen vorhanden, nach 6 h Inkubation mit POVPC kommt es jedoch zu einem Anstieg an 16:0 Fettsäuren in den Ceramiden. Weiter wird die Menge an 24:0-Ceramidspezies in den Zellen durch beides die Inkubationszeit und die Behandlung mit POVPC beeinflusst. Die Konzentration der Ceramid-C_{24:0}-Fettsäuren nimmt mit der Inkubationszeit sowohl bei den Negativkontrollen als auch bei den mit POVPC behandelten Zellen zu, wobei die mit POVPC inkubierten Zellen einen höheren Gehalt an 24:0-Ceramidspezies aufweisen als ihre korrespondierenden Negativkontrollen. Dieser Effekt wird deutlich vergleicht man die Konzentration an Ceramid-C_{24:0}-FS nach 15 min Inkubation mit Ethanol (Negativkontrolle) und POVPC und nach 6 h Inkubation mit POVPC. Auch die Konzentration an 24:1-Fettsäuren in den Ceramiden steigt mit der Inkubationszeit und ist in den mit POVPC behandelten Zellen höher als den Negativkontrollen zur selben Zeit. Allerdings ist der Anstieg weniger gravierend verglichen mit dem der 24:0 Fettsäuren in den Ceramiden.

Ceramide mit 18:2-Fettsäuren sind in SBcl2 Zellen in großem Maß vorhanden werden aber durch die Inkubation mit POVPC nicht beeinflusst.

Bei 24:2 Fettsäuren in den Ceramiden kommt es wiederum zu einem leichten Anstieg mit der Inkubationszeit. Auch die Behandlung der Zellen mit POVPC führt zu einem Anstieg an Ceramid-C_{24:2}-Fettsäuren. Wobei dieser Effekt nach einer Inkubationszeit von 15 min deutlicher ist als nach 6 h.

Abbildung 24 B zeigt den Effekt von POVPC auf das Sphingomyelinmuster in SBcl2 Zellen. Die 16:0 und 24:1 Ceramid-Fettsäuren weisen höchste relative Konzentration in den Zellen auf. Dabei wird ihre Konzentration an Cer-C_{16:0}-FS/Cer-C_{24:1}-FS weder durch die Dauer der Inkubationszeit noch durch die Inkubation mit POVPC beeinflusst. Eine kleinere Konzentration an 24:0 und 24:2 Ceramidspecies ist in allen SBcl2 Zellen vorhanden. 14:0, 22:0 und 24:0 Ceramid-Fettsäuren kommen nur in geringen Konzentrationen in den Zellen vor. Minimale Menge an 18:0 und 18:1 Fettsäuren in den Ceramiden sind zu verzeichnen. Keine der untersuchten Sphingomyelinspecies wird durch die Inkubation mit POVPC beeinflusst.

Abbildung 25 A zeigt den Effekt von POVPC auf die Ceramidspecies in WM35 Zellen. Wie schon in SBcl2 Zellen (Abb. 25 A) dominieren 16:0, 18:2, 24:0, 24:1 und 24:2 Ceramide. Jedoch gibt es bei keiner der Ceramidspezies einen signifikanten Konzentrationsanstieg durch die Inkubation mit POVPC. Wiederum sind 14:0, 18:0, 22:1 und 26:1 Fettsäuren in den Ceramiden kaum vorhanden.

Auch das Sphingomyelinmuster der WM35 Zellen (Abb. 25 B) wird durch die Inkubation der Zellen mit POVPC nicht beeinflusst. Hier dominiert Palmitinsäure (16:0) in den Ceramiden in allen WM35 Zellansätzen. Die anderen Fettsäuren sind nur in geringem Maß vorhanden.

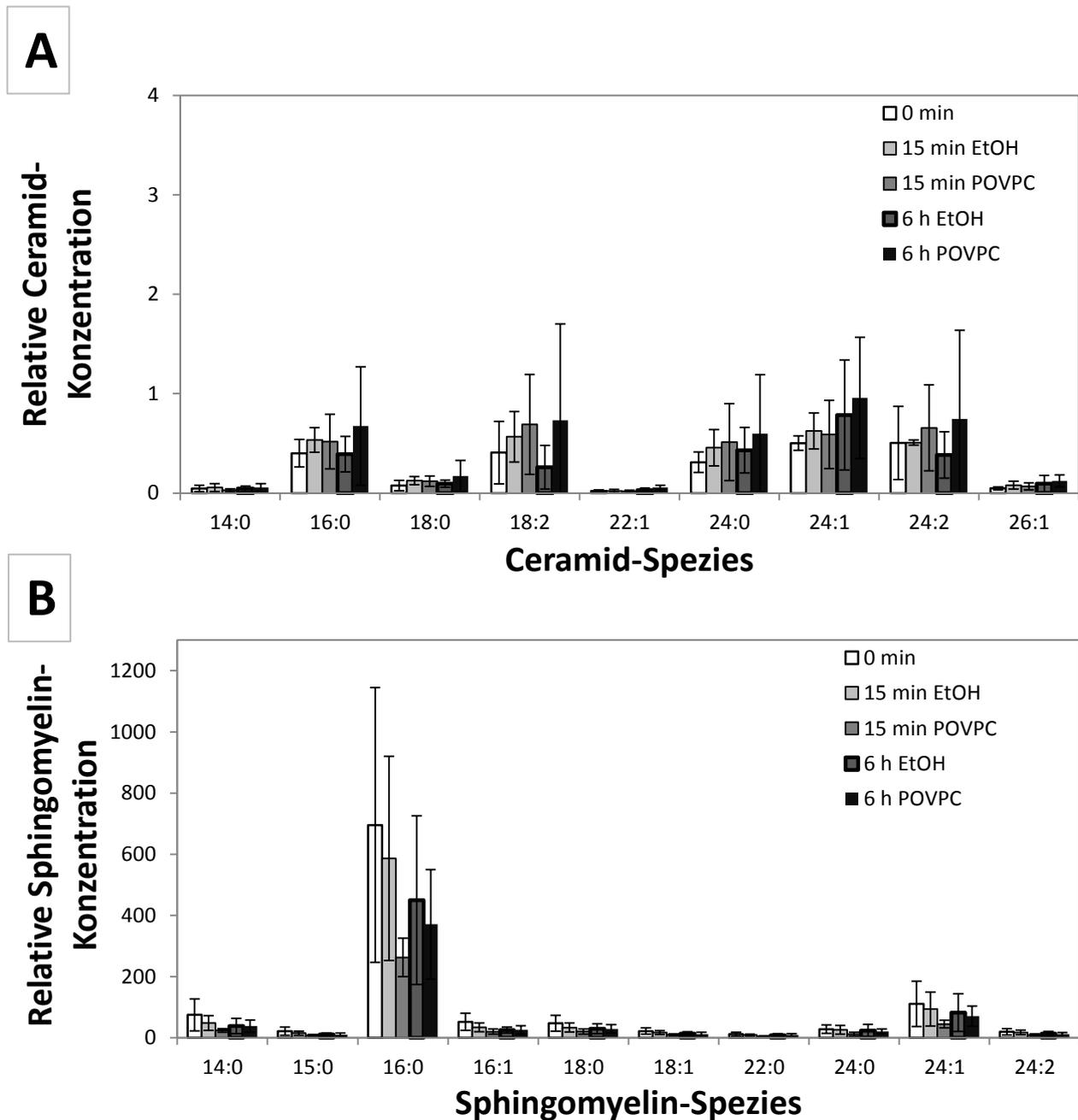


Abbildung 25: **Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin-Muster in WM35 Zellen.** Die Zellen wurden für 15 min bzw. 6 h mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS inkubiert. Die Kontrollproben enthielten nur Medium + EtOH(0.8%). Die Zellen wurden geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und anschließender einer milden alkalischen Hydrolyse unterworfen. Die MS-Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die angegebenen Kohlenwasserstoffketten beziehen sich auf die N-acylgruppe im Lipid. A, relative Ceramidkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. B, relative Sphingomyelinkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

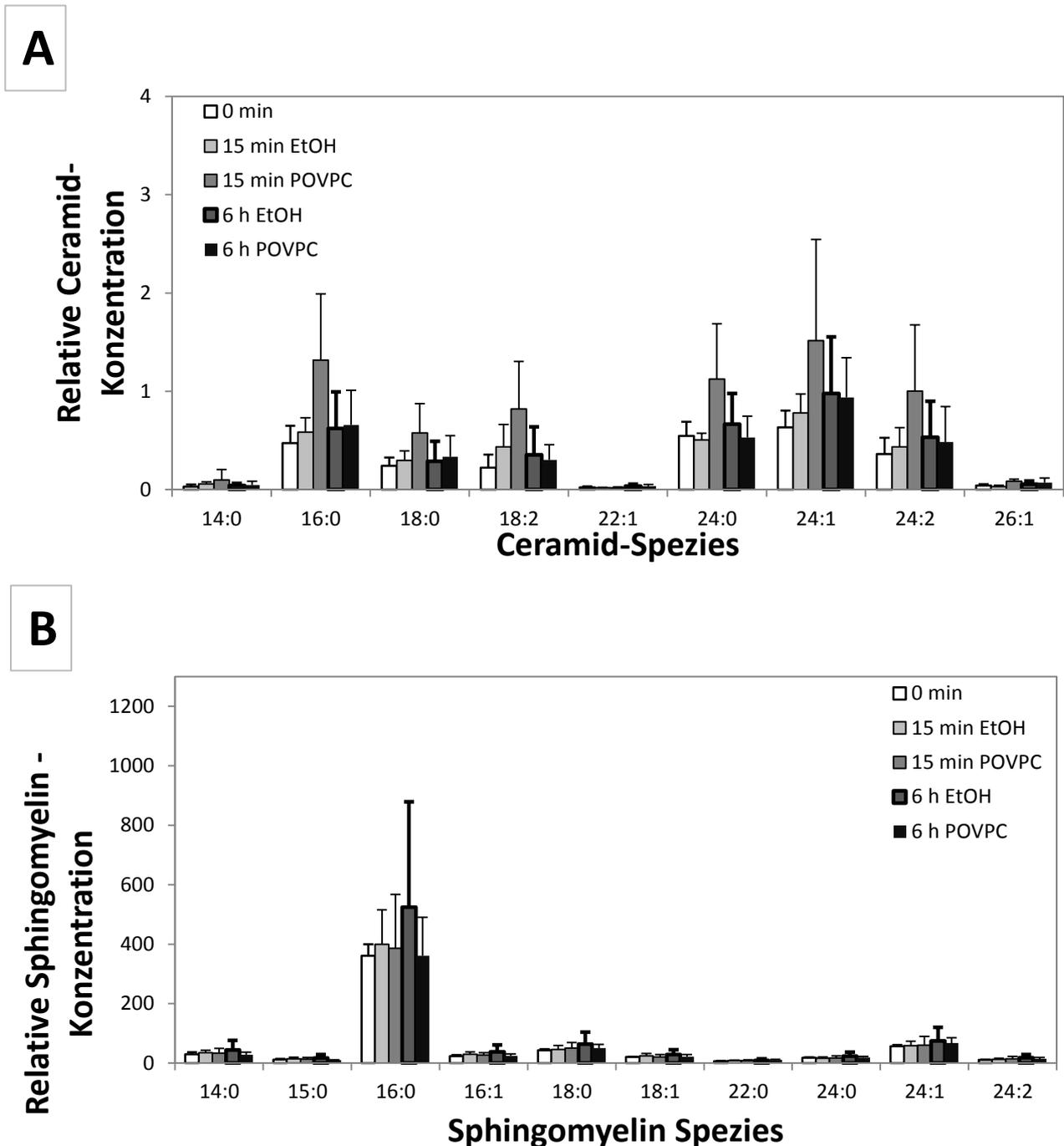


Abbildung 26: **Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin-Muster in WM164 Zellen.** Die Zellen wurden für 15 min bzw. 6 h mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS inkubiert. Die Kontrollproben enthielten nur Medium + EtOH(0.8%). Die Zellen wurden geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und anschließend einer milden alkalischen Hydrolyse unterworfen. Die MS-Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die angegebenen Kohlenwasserstoffketten beziehen sich auf die N-acylgruppe im Lipid. A, relative Ceramidkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. B, relative Sphingomyelinkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Abbildung 26 zeigt den Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin- Muster in WM164 Zellen. Vergleicht man das Diagramm verschiedener Ceramidspecies in WM 164 Zellen (Abb 26A) mit denen in SBcl2 und WM35 Zellen fällt zunächst auf, dass neben den schon zuvor vorhandenen 16:0, 18:2, 24:0, 24:1 und 24:1 Fettsäuren hier auch 18:0 Fettsäuren in den Ceramiden in hohem Maß vorhanden sind.

Bei allen aufgezählten Ceramidspezies führt die Inkubation der WM164 Zellen mit POVPC nach 15 min zu einem Anstieg der jeweiligen Cer-FS in den mit oxPI behandelten Zellen verglichen zur jeweiligen Negativkontrolle, wobei dieser Effekt am deutlichsten beim Cer-16:0-Fettsäuregehalt in den Zellen ist.

Abbildung 26 B zeigt dass bei den verschiedenen Spingomyelinspecies in WM164 Zellen SM-C_{16:0}-Fettsäuren dominieren. Wiederum nimmt auch bei WM164 Zellen die Inkubation mit POVPC keinen Einfluss auf das Spingomyelinmuster in den Zellen.

Abbildung 27 A zeigt die Auswirkung von POVPC auf die verschiedenen Ceramidspezies in WM9 Zellen. Wie schon bei den vorangegangenen Zelllinien dominieren 16:0, 18:2, 24:0, 24:1 und 24:2 Fettsäuren in den Ceramiden mengenmäßig in WM 9 Zellen. In den mit POVPC behandelten Zellen kommt es, verglichen zu den jeweiligen Negativkontrollen, nach einer Inkubationszeit von 6 h zu einem Anstieg der relativen Konzentration dieser Cer-Fettsäuren, wobei dieser Effekt bei den 16:0, 18:0 und 24:2 Fettsäuren in den Ceramiden am größten ist. Im Fall dieser drei Ceramidspezies zeigen die übrigen Inkubationsansätze (0 min, 15 min Kontrolle, 15 min POVPC, 6 h Kontrolle) ein gleich bleibendes Level der jeweiligen Ceramidspecies. Nach 6 h Inkubation mit POVPC kommt es jedoch zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg dieser Lipide.

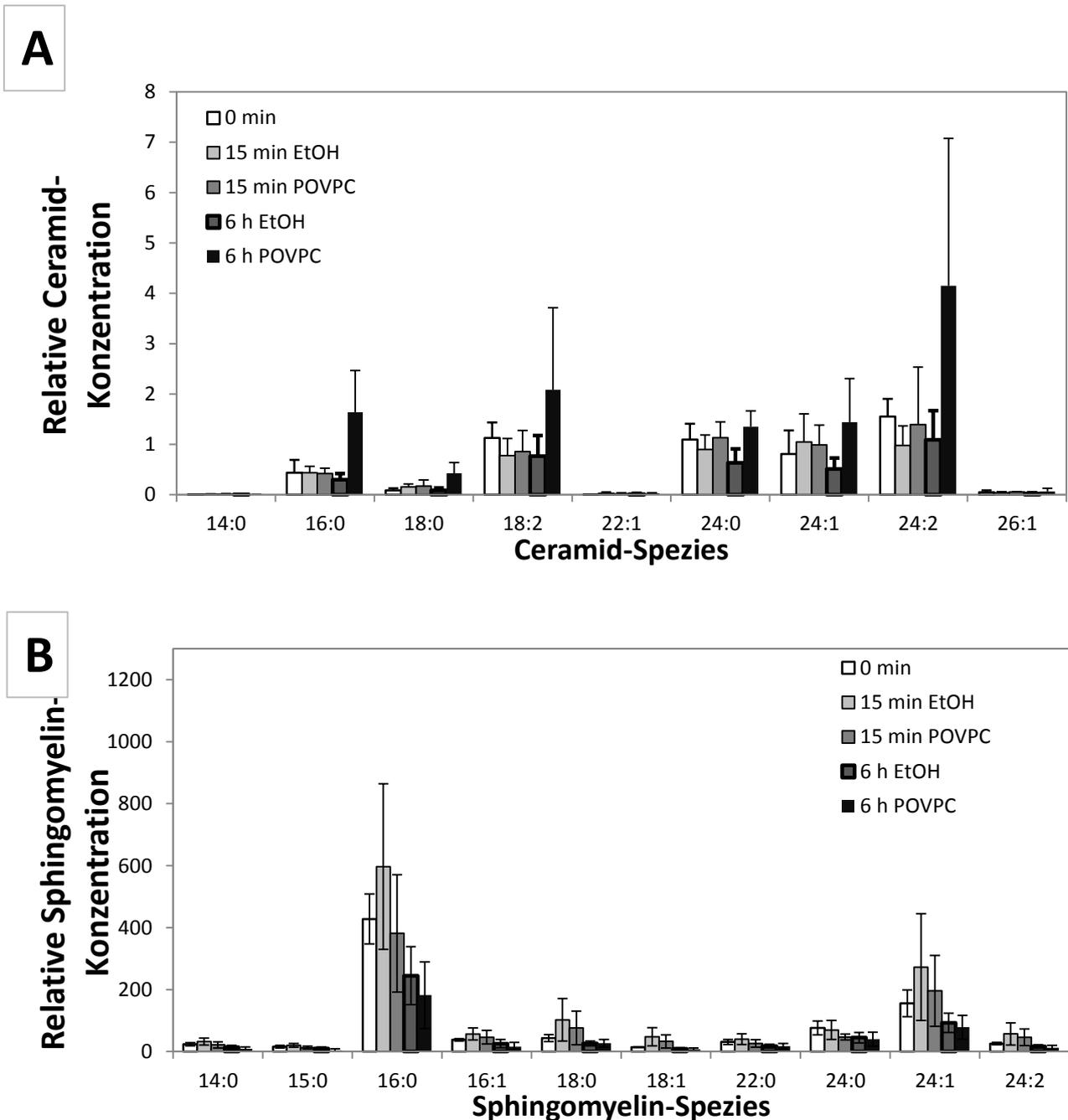


Abbildung 27: **Effekt von POVPC auf die Ceramid- und Sphingomyelin-Muster in WM9 Zellen.** Die Zellen wurden für 15 min bzw. 6 h mit 50 μ M POVPC in RPMI 1640 Medium mit 0.1% FCS inkubiert. Die Kontrollproben enthielten nur Medium + EtOH(0.8%). Die Zellen wurden geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und anschließender einer milden alkalischen Hydrolyse unterworfen. Die MS-Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die angegebenen Kohlenwasserstoffketten beziehen sich auf die N-acylgruppe im Lipid. A, relative Ceramidkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. B, relative Sphingomyelinkonzentration bezogen auf den Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Abbildung 27 B zeigt den Effekt von POVPC auf das Sphingomyelin- Muster in WM9 Zellen.

Wie schon in den vorhergegangenen Zelllinien dominieren 16:0 und 24:1 SM-Fettsäuren. Im

Fall beider Sphingomyelinspezies beeinflussen sowohl die Inkubationszeit als auch die Inkubation mit POVPC die Konzentration in den Zellen. Nimmt man die zum Zeitpunkt 0 geernteten Zellen aus, sinkt die relative Konzentration an 16:0-Sphingomyelin-Fettsäuren mit Dauer der Inkubationszeit und in den mit POVPC inkubierten Zellen, verglichen zur korrespondierenden Negativkontrolle. Dieser Konzentrationsverlauf lässt sich auch für die relative Konzentration an Sphingomyelin-C_{24:1}-Fettsäuren in WM 9 Zellen festzustellen.

4 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Toxizität der oxidierten Phospholipide POVPC (1-plamitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholin) in verschiedenen humanen Melanomzellen *in vitro* untersucht.

POVPC und PGPC (1-plamitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) sind in oxLDL enthaltene, bioaktive Lipide. Sie haben eine lange hydrophobe Seitenkette in *sn*-1 Position, eine polare, durch Oxidation verkürzte, Acyl-Kette in *sn*-2 Position und eine polare Kopfgruppe. Ihre amphipathischen Eigenschaften machen POVPC und PGPC leicht austauschbar zwischen Membranen und Zellen. (Stemmer *et al.*, 2012). POVPC trägt eine Aldehyd-funktion an der *sn*-2 Position, die mit freien primären Aminogruppen (-NH₂) Schiff Basen formen kann. Dadurch ist POVPC im Stande, kovalente Bindungen zu Proteinen und Amino-Phospholipiden einzugehen, wodurch es zu einem der bioaktivsten oxPL überhaupt wird. PGPC hingegen hat an seiner *sn*-2 Position eine Carboxylgruppe und ist lediglich in der Lage physikalisch mit Zellen zu interagieren. (Fruhwirth *et al.*, 2007) (Deigner und Hermetter, 2008)

Frühere Studien haben gezeigt, dass POVPC und PGPC toxisch in vaskulären glatten Muskelzellen (Loid *et al.*, 2003)(Fruhwirth *et al.*, 2006) und Makrophagen (Steinbrecher *et al.*, 1990) wirken. Ramprecht *et al* haben außerdem nachgewiesen, dass diese oxPL in der Lage sind, Apoptose in verschiedenen humanen Melanomzelllinien zu induzieren.

Die Auswirkungen von POVPC und PGPC auf die Zellmorphologie von SBcl2 Zellen (primären Melanomzellen) wurden mit einem Durchlichtmikroskop beobachtet. Dabei zeigte sich lediglich nach 24 h Inkubation mit 50 µM PGPC ein sichtbarer Effekt. Die Zahl der intakten Zellen war hier deutlich geringer und die verbliebenen Zellen lagen bereits im lysierten Zustand vor. Die Inkubation mit POVPC führte zu keinen sichtbaren Veränderungen in der

Zellmorphologie. (Abb. 10-13) Zuvor gemachte Untersuchungen mit FACS (Fluorescence-activated cell sorting) haben gezeigt, dass PGPC und POVPC bereits nach 6 h bei Konzentrationen von 25 und 50 μM PGPC zu Apoptose führen. (Ramprecht *et al.*, Dissertation, TU Graz, 2013) Mit biochemischen Markern kann man somit Apoptose in SBcl2-Zellen viel früher feststellen. Zu sichtbaren Veränderungen in der Zellmorphologie kommt es erst in späteren Stadien des Zelltods.

In vaskulären glatten Muskelzellen (Fruhirth *et al.*, 2006) und RAW 264.7 Makrophagen (Stemmer *et al.*, 2012) ist die durch oxPL induzierte, Apoptose mit der Aktivierung der sauren Sphingomyelinase (aSMase) assoziiert. Saure Sphingomyelinase katalysiert durch die Hydrolyse von Spingomyelin die Bildung von Ceramid. Ceramid hat in größeren Mengen einen cytotoxischen Effekt in Zellen und führt zur Apoptose (Obeid *et al.*, 1993). In verschiedenen Krebszellen induziert die Behandlung mit Chemotherapeutika eine vermehrte Produktion von Ceramid. Krebstherapien basierend auf der Steigerung der Ceramid-Synthese und/oder der Inhibition des Ceramid Stoffwechsels wurden daher schon früher diskutiert. (Reynolds *et al.*, 2004)

Der Effekt von POVPC auf die Aktivität der aSMase in primären (SBcl2, WM35) und metastasierenden (WM164, WM9) Melanomzellen wurde mit einem Fluoreszenz-Aktivitäts-Assay untersucht. POVPC führt bereits nach 5 bzw. 15 min (abhängig von der eingesetzten Lipidkonzentration) zu einem Anstieg der aSMase-Aktivität. In WM 9 Zellen, die mit 25 μM POVPC inkubiert wurden, ist die Aktivität der sauren Sphingomyelinase nach 5 min stark erhöht, sinkt jedoch nach einer Inkubationszeit von 15 min wieder. (Abb.18) In einem weiteren Experiment wurden die unterschiedlichen Ceramid- und Sphingomyelin-Spezies bzw. deren Häufigkeit in Melanomzellen in Abhängigkeit von POVPC und der Inkubationszeit mit dem oxPL untersucht. Die Menge der unterschiedlichen Ceramidspezies war nach einer Inkubation mit POVPC nach 6 h am höchsten. Es muss also neben der sauren

Sphingomyelinase noch eine weiterer Ceramid-Syntheseweg durch die Inkubation mit POVPC beeinflusst werden.

Die *de novo* Synthese von Ceramid aus Sphingalin sowie die Acylierung von Sphingosin (Salvage-Pathway) mittels Ceramidsynthase sind weitere potentielle Ceramidquellen. Die POVPC-abhängige Expression von drei verschiedenen Ceramidsynthasen (CerS2, CerS3, CerS4) wurde mittels Western blotting untersucht. Es wurde keine Erhöhung der CerS-Expression verzeichnet. Um festzustellen ob die unterschiedlichen CerS für die oxPI-induzierte Ceramid-Produktion eine Rolle spielen müsste die Aktivität der Ceramidsynthasen in den Melanomzellen nach Inkubation mit POVPC bestimmt werden.

Wie schon zuvor erwähnt, wurde auch das Ceramid- bzw. Sphingomyelinmuster in Abhängigkeit von POVPC in den unterschiedlichen Melanomzellen bestimmt. In SBcl2 und WM9 Zellen war der Effekt von POVPC auf die unterschiedlichen Ceramid-Spezies deutlich zu erkennen. (Abb. 24 und 27) In beiden Zelllinien steigt die Menge an Ceramid-C16:0-Fettsäuren und Ceramid-C24:2-Fettsäuren nach Inkubation mit POVPC an und ist nach einer Inkubationszeit von 6 h am größten. In SBcl2 Zellen zeigt sich dieser Effekt zusätzlich noch bei Ceramid-C24:0-, und Ceramid-C24:1-Fettsäuren. In WM9 Zellen kommt es durch die Inkubation mit POVPC zu einem Anstieg an C-18-Fettsäuren bei den Ceramiden. Die Inkubation mit POVPC hat lediglich in WM9 Zellen Auswirkungen auf das Sphingomyelinmuster. Interessanterweise nimmt die Menge an Sphingomyelin-C16:0-FS mit der Inkubation von POVPC und der Inkubationszeit ab. Den gleichen Effekt, wenn auch weniger stark, kann man bei Sphingomyelin-C24:1-FS beobachten. Die selektive Zunahme von verschiedenen Ceramid-Spezies bzw. Abnahme von Sphingomyelin-Spezies ist ein Hinweis auf die Substratspezifität der aktiven Enzyme. Wie schon erläutert kann die saure Sphingomyelinase aufgrund ihres Aktivitätsmaximums nicht alleine für die gesteigerte Ceramidsynthese nach Inkubation mit POVPC verantwortlich sein. Eine andere Möglichkeit wäre die *de novo* Synthese durch Ceramidsynthasen. Es gibt sechs verschiedenen

Ceramidsynthesen die sich durch ihre Selektivität für verschieden lange Acyl-Ketten unterscheiden. Die CerS4 ist zum Beispiel spezifisch für C18- und C20-Acyl-CoA. CerS4 findet sich auch vermehrt in der Haut (Stiban *et al.*, 2010). Weiterführende Studien müssen noch klären, inwiefern die oxPL-induzierten Ceramid-Muster die Eigenschaften der Zellemembranen (Plasmamembran, Mitochondrienmembran, Endoplasmatisches Reticulum) und somit auch die Membranfunktionen (Signalproteine, Membranblebbing, Membranpermeabilität) verändern.

OxPL induzieren Apoptose in humanen Melanomzellen. (Ramprecht *et al.*, Dissertatio, TU Graz, 2013) Die Inkubation mit POVPC führt zu einem Anstieg der aSMase-Aktivität und des Ceramidlevels in Melanomzellen. Ramprecht *et al.* haben gezeigt, dass oxPL (POVPC und PGPC) zwar einen starken toxischen Effekt in Melanomzellen haben, in nicht entartete Melanocyten jedoch kaum cytotoxische Eigenschaften haben. Diese Eigenschaft und die Tatsache, dass es sich bei oxPL um körpereigene und damit gut abbaubare Substanzen handelt können diese Lipide zu nützlichen Wirkstoffen gegen Hautkrebs machen.

In den beschriebenen Experimenten verhielten sich SBcl2 Zellen (Muttermalzellen) ähnlich wie WM9 (metastasierende Melanomzellen) Zellen. Das stimmt mit den von Ramprecht *et al.* gemachten Beobachtungen überein, wonach Aktivität der aSMase, Aufnahme von oxPL in die Zelle, Ausmaß der Apoptose und Bildung von verschiedenen Ceramid-Spezies positiv korrelieren. Der Mechanismus der cytotoxischen Wirkung bleibt jedoch noch zu klären.

POVPC ist durch seine Aldehyd-funktion in der Lage kovalente Produkte mit Proteinen in Makrophagen und Melanomzellen zu bilden. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass POVPC in Makrophagen zunächst mit Komponenten der Phospholipid-Membran reagiert und nur langsam in die Zelle aufgenommen wird, sich hingegen in Melanomzellen schnell um den Zellkern anlagert. (Fruhirth *et al.*, 2007) (Stemmer *et al.*, 2012)(Ramprecht *et al.*, Dissertatio, TU Graz, 2013). Eine Besonderheit von Tumorzellen ist, dass PS in den Zellen an die Membranaußenseite lokalisiert. (Riedl *et al.*, 2011) Ramprecht *et al.* haben gezeigt, dass

POVPC in der Lage ist kovalente Lipid-Lipid-Addukte auch mit PS zu formen. Dies könnte ebenfalls die Aufnahme von POVPC in Tumorzellen beeinflussen. Es bleibt jedoch zu klären welchem Mechanismus die rasche Aufnahme von POVPC in Tumorzellen bzw. die Reaktion von POVPC mit Membrankomponenten folgt. Zuletzt haben Ramprecht und Britz gezeigt, dass sich murine Melanomzellen bezüglich Toxizität und Erhöhung von aSMase-Aktivität und Ceramid-Level ähnlich verhalten. Diese Daten sind die Voraussetzung für spätere Experimente im Versuchstier.

5 Referenzen

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K und Walter P. (2008) *Molecular Biology of the cell*. Fifth Edition. *Garland Science*, New York, USA.
- Bachem M G, Wendelin D, Schneiderhan W, Haug C et al. (1999) Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix syntheses or induce apoptosis in human coronary smooth muscle cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 37(3), 319-326.
- Bartke N und Hannun YA. (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research* 50, 91-96.
- Basu S und Kolsnick R. (1998) Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* 17, 3277-3285.
- Batzri S und Korn ED. (1973) Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*.;298(4):1015–1019.
- Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, Bastian BC. (2007) Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 179-182.
- Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn K W, Pommier Y. (1994) Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporin. *Exp Cell Res* 211, 314-321.
- Bielawski J, Pierce JS, Snider J, Rembiesa B, Szulc ZM, Bielawska A. (2009) Comprehensive quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods of Molecular Biology* 579, 443-67.
- Bradford M M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.

- Brown M S und Goldstein J L. (1979) Receptor-mediated endocytosis: Insight from the lipoprotein receptor system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (7), 3330-3337.
- Brugger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann,WD. (1997) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 2339-2344.
- Christie W W. (2012) Ceramides. Chemistry, Occurrence, Biology and Analysis. AOCs Lipid Library.
- Dypbukt J M, Ankarcrona M, Burkitt M, Sjöholm A, Ström K, Orrenius S, Nicotera P. (1994) Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem*. 269, 30553-30560.
- Deigner H-P, Hermetter A. (2008) Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology. *Current Opinion in Lipidology* 19, 289-294.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL und Henson PM. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 148, 2207-2216.
- Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. (1985) Early Detection of Malignant Melanoma: the Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 35 (3), 130-151.
- Fruhwirth G O, Loidl A und Hermetter A. (2007) Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772, 718-736.
- Fruhwirth G O, Moutzi A, Loidl A, Ingolic E und Hermetter A. (2006) The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761, 1060-1069.

- Greenberg M E, Li X, Gugiu BG, Gu X, Quin J, Salomon R G und Hazen S L. (2008) The Lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 2385-2396.
- Hannun Y A, Luberto C. (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Cell Biology*, 10, 73-80.
- Hannun Y A und Obeid L M. (2011) Many Ceramides. *The Journal of Biological Chemistry* 32, 27855-27862.
- Henry H, Thomas A, Shen Y, White E. (2002) Regulation of the mitochondrial checkpoint in p53-mediated apoptosis confers resistance to cell death. *Oncogene* 21, 748-760.
- Henson PM, Bratton DL und Fadok V. (2001) Apoptotic cell removal. *Current Biology* 11, R795-R805.
- Hocker TL, Singh MK, und Tsao H. (2008) Melanoma Genetics and Therapeutics Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *Journal of Investigative Dermatolog.* 128, 2575-2595.
- Iveskog S, Ragnarsson-Oldig B, Platz A und Ringborg U. (1998) N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes of unexposed skin. *Journal of Investigative Dermatology* 111, 757-761.
- Laviad E L, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill A H und Futerman. (2008) Characterization of Ceramide Synthase 2: tissue distribution, substrate specificity and inhibition by sphingosine-1-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 283, 531-528.
- Levy M und Futerman H. Mammalian Ceramide Synthases. *IUBMB Life* 62, 347-356.
- Loidl A, Claus R, Deigner H P, Hermetter A. (2002) High-precision fluorescence assay for sphingomyelinase activity of isolated enzymes and cell lysates. *J. Lipid Res.* 43, 815-823.
- Loidl A, Sevcsik E, Riesenhuber G, Deigner H P, Hermetter A. (2003) Oxidized Phospholipids in Minimally Modified Density Lipoprotein Induce Apoptotic Signaling via Activation of Acid Sphingomyelinase in Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 32921-32928.

- Matsura T, Togawa A, Kai M, Nishida T, Nakada J, Ishibe Y, Kojo S, Yamamoto Y, und Yamada K. (2005) The presence of oxidized phosphatidylserine on Fas mediated apoptotic cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta* 1736 (3), 181-8.
- McConkey DJ. (1988) Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters* 99, 157-168.
- McIntyre TM, Zimmerman GA und Prescott SM. (1999) Biologically Active Oxidized Phospholipids. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 25189-25192.
- Meier F, Satyamoorthy K, Nesbit M, Hsu M-Y, Schitteck B, Garbe C und Herlyn M. (1998) Molecular events in melanoma development and progression. *Frontiers in Bioscience* 3, 1005-10.
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y. LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific(dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem. J.* 398, 531-538.
- Moutzi A, Trenker M, Flicker K, Zenzmaier E, Saf R und Hermetter A. (2007) Import and fate of fluorescent analogs of oxidized phospholipids in vascular smooth muscle cells. *Journal of Lipid Research* 48, 565- 582.
- Navab M, Berliner J A, Watson A D, Hama S Y, Territo M C et al. (1996)The Yin and Yang of Oxidation in the Development of Fatty Streak. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 16, 831-842.
- Obeid L M, Linardic C M, Karolak L A und Hannun Y A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259/5102, 1769-1771.
- Okazaki T, Bell R M, Hannun Y A. (1989) Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. *Journal of Biological Chemistry* 264 (32), 19076-80.
- Pettus B J, Chalfant C E, Hannun Y A. (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta.* 1585, 114–125.

- Reynolds C P, Maurer B J, Kolesnick R N. (2003) Ceramid synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer lett.* 206, 169-180.
- Riedl S, Rinner B, . Asslaber M, Schaidler H, Walzer S , Novak A, Lohner K, und D Zweytick (2011). In search of a novel target–phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808(11), 2638–2645
- Ross R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340(2), 115-126.
- Segrest J P, Jones M K, Loof H D und Dashti N. (2001) Structure of apolipoproteins B-100 in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 42, 1346-1367.
- Selzner M, Bielawska A, Morse M A, Rudiger H A, Sindram D, Hannun Y A und Clavien P A. (2001) Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Research* 61, 1233-1240.
- Steinbrecher U, Zhang H, und Loughheed M. (1990). Role of oxidatively modified ldl in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine* 9(2), 155–168.
- Stemmer U, Dunai ZA, Koller D, Pürstinger G, Zenzmaier E, Deigner HP, Aflaki E, Kratky D, Hermetter A.(2012) Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages. *Lipids Health Dis.* 2012 Sep 7;11:110
- Stoneman V E A und Bennett M R. (2004) Role of apoptosis in atherosclerosis and ist therapeutic implications. *Clinical Science* 107, 343-354.
- Stiban J, Tidhar R und Futerman A H. (2010) Ceramide Synthases: Roles in Cell Pysiology and Signaling. *Advances in experimental Medicine and Biology* 688, 60-71.
- Szeimies R-M, Hauschild A, Garbe C, Kaufmann R, Landthaler M. (2010) Tumore der Haut. *Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Deutschland.*
- Tabas I. (2005) Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Artherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 25, 225-2264.

- Thorburn A. (2003) Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling* 16, 139-144.
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. (2000) Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Research* 60, 1800-4.
- Wang X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 15, 2922-2933.
- Watson A D, Berliner J A, Hama S Y, La Du B N, Faull K F, Fogelman A M und Navab M. (1995) Protective effect of high density lipoprotein associated paraxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* 96, 2882-2891.
- Witztum J L und Steinberg D. (1991) Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *The American Society for Clinical Investigation* 88, 1785-17

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)