

Aus dem **Institut für Physiologische Chemie**
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktor Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Th. Braun)

**Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren und Öle auf
in vitro kultivierte Keratinozyten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

verteidigt am 10. Dezember 2003

von Bettina Ruth Kuhnt

geboren am 9.7.1974 in Zerbst/Anhalt

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. D. Gläßer

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. D. Gläßer, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Prof. Dr. rer. nat. habil. W. Wohlrab, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Prof. Dr. med. habil. W.-I. Worret, Technische Universität München

urn:nbn:de:gbv:3-000006880

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006880>]

Ziel der Arbeit war es, einige Aspekte Wirkung freier Fettsäuren (FFS) und Öle auf humane *in vitro* kultivierte Keratinozyten der Linie HaCaT näher zu beleuchten.

Hierzu wurden zunächst Studien zur Aufnahme von Fettsäuren unter Verwendung der selbstfluoreszierenden Parinarsäure als Modellsubstanz durchgeführt. Die Messungen erfolgten mittels Laser Scan Mikroskopie ($\lambda_{\text{Ex}}=364\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}}>450\text{nm}$) an einzelnen Zellen. Es wurde gezeigt, daß Parinarsäure zunächst in die Zellmembran aufgenommen wird, um dann auf Zellbinnenmembranen umverteilt zu werden.

Besonders ungesättigte FFS wirken zytotoxisch auf Zellen. Diese Wirkung wird teils über eine Membranpermeabilisierung erklärt. Dabei wurde das Entstehen kleinerer Löcher in der Zellmembran durch den Nachweis der Passage großer Farbstoffmoleküle des 6-Carboxyfluoreszeins (6-CF) ins Zellinnere erbracht. Die Messungen wurden mit einem Laser Scan Mikroskop (LSM) durchgeführt, detektiert wurde die lokale Annäherung von 6-CF an einen Rhodaminfarbstoff, mit dem die Zellen zuvor beladen wurden. Führt die Einwirkung einer Fettsäure zur Membranpermeabilisierung für 6-CF zu dessen Einstrom in die Zelle, so wurde durch Resonanzenergietransfer erstmals eine Emission bei $\lambda_{\text{Em}}>540\text{nm}$ gemessen. In anderen Fällen konnte durchlichtmikroskopisch ein Austritt von Zytoplasma als Folge einer lokalen Membranruptur gesehen werden. Derartige Membranschädigungen traten nur bei der Verwendung ungesättigter FFS auf.

Die Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffgemisches aus Fluo3 und Fura-Red mit dem LSM durchgeführt. Inkubation der Keratinozyten mit freien ungesättigten Fettsäuren hatte einen Anstieg der Konzentration intrazellulären freien Calciums zur Folge. Dieser Anstieg war im angewandten Modell um so höher, je höher die Konzentration der Fettsäure war und je ungesättigter sie war. Die Kettenlänge der Fettsäure hatte keinen Einfluß, ebenso kam es allgemein bei der Verwendung gesättigter Fettsäuren, eines physiologischen Gemisches und von verschiedenen Pflanzenölen allenfalls zu einem schwachen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Mittels Messung von externalisiertem Phosphatidylserin nach Einwirkung von FFS und Ölen ließ sich ausschließlich für ungesättigte Fettsäuren eine proapoptotische Wirkung nachweisen. In der Arbeit werden zytotoxische, genauer proapoptotische Wirkungen ungesättigter FFS an einer hyperproliferativen Zelllinie nachgewiesen.

Inhalt

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 2. | THEORETISCHE GRUNDLAGEN | 3 |
| 2.1. | DAS UNTERSUCHUNGSOBJEKT | 3 |
| 2.1.1. | AUFBAU DER HAUT | 3 |
| 2.1.2. | WACHSTUM UND DIFFERENZIERUNG VON KERATINOZYTEN | 4 |
| 2.1.3. | ZELLYKLUS | 5 |
| 2.1.4. | KERATINOZYTEN DER ZELLINIE HACAT | 6 |
| 2.1.5. | APOPTOSE UND NEKROSE | 6 |
| 2.2. | FETTSÄUREN UND FETTE. | 8 |
| 2.2.1. | PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN UND LÖSLICHKEITSVERHALTEN FREIER FETTSÄUREN UND FETTE | 8 |
| 2.2.2. | BEDEUTUNG VON FREIEN FETTSÄUREN UND FETTEN FÜR HAUT UND SCHLEIMHÄUTE | 10 |
| 2.2.3. | BEDEUTUNG VON FREIEN FETTSÄUREN FÜR DIE ZELLMEMBRAN | 11 |
| 2.2.4. | STÖRUNG DER IONENHOMÖOSTASE DURCH FREIE FETTSÄUREN | 14 |
| 2.3. | UNTERSUCHUNGSPARAMETER | 15 |
| 2.3.1. | UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME VON FREIEN FETTSÄUREN IN DIE ZELLMEMBRAN | 15 |
| 2.3.2. | MESSUNG VON MEMBRANSCHÄDIGUNGEN DURCH FREIE FETTSÄUREN | 16 |
| 2.3.3. | PRINZIP DER MESSUNG INTRAZELLULÄREN FREIEN CALCIUMS UND DES PH-WERTES MIT HILFE VON FLUORESZENZFARBSTOFFEN | 18 |
| 2.3.4. | LASER SCANNING MIKROSKOPIE | 22 |
| 2.3.5. | APOPTOSE-NEKROSE - METHODEN DER DIFFERENZIERUNG | 22 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3. | MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 3.1. | ZELLKULTUR | 25 |
| 3.2. | HERSTELLUNG DER EFFEKTORLÖSUNGEN | 25 |
| 3.3. | LSM | 25 |
| 3.3.1. | VORBEREITUNG DER ZELLEN | 27 |
| 3.3.2. | MORPHOLOGIE SUBKULTIVIERTER HACAT ZELLEN | 27 |
| 3.3.3. | MESSUNG DER PARINARSÄUREAUFNAHME | 28 |
| 3.3.4. | MESSUNG DER MEMBRANSCHÄDIGUNG DURCH FETTSÄUREN MIT CARBOXYFLUORESZEIN | 28 |
| 3.3.5. | MESSUNG DES INTRAZELLULÄREN PH WERTES | 28 |
| 3.3.6. | MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION | 28 |
| 3.3.7. | BESTIMMUNG DER KERNRETRAKTION MITTELS HOECHST 33342 | 29 |
| 3.3.8. | DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN APOPTOSE UND NEKROSE MITTELS ANNEXIN-FITC BINDUNG | 29 |
| 3.3.9. | BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT MIT TRYPANBLAU | 30 |
| 3.3.10. | LANGZEITINKUBATIONEN VON KERATINOZYTEN MIT FREIEN FETTSÄUREN | 30 |
| 3.5. | LIPIDEXTRAKTIONEN. | 30 |
| 3.5.1. | LIPIDEXTRAKTION NACH INKUBATION MIT ¹⁴ C-MARKIERTER PALMITINSÄURE | 30 |
| 3.5.2. | LIPIDEXTRAKTION NACH INKUBATION MIT UNMARKIERTER PALMITINSÄURE | 30 |
| 3.5.3. | DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE | 31 |
| 3.6. | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 31 |
| 3.7. | GERÄTE, HILFSMITTEL UND CHEMIKALIEN | 32 |
| 3.7.1. | CHEMIKALIEN | 32 |
| 3.7.2. | GERÄTE UND HILFSMITTEL | 33 |
| 3.7.3. | ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER PUFFERLÖSUNGEN | 33 |
| 4. | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 34 |
| 4.1. | UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFNAHME VON FETTSÄUREN IN ZELLEN UNTER VERWENDUNG VON PARINARSÄURE ALS MODELLSUBSTANZ | 34 |
| 4.2. | ZEITABHÄNGIGER UMBAU APPLIZIERTER FREIER PALMITINSÄURE IN HACAT- ZELLEN | 37 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 4.3. | MEMBRANSCHÄDIGUNG DURCH FREIE UNGESÄTTIGTE FETTSÄUREN | 39 |
| 4.4. | WIRKUNG FREIER FETTSÄUREN AUF DEN INTRAZELLULÄREN PH WERT | 41 |
| 4.5. | WIRKUNG FREIER FETTSÄUREN UND NATIVER ÖLE AUF DIE INTRAZELLULÄRE KONZENTRATION FREIEN CALCIUMS | 43 |
| 4.5.1. | AUSWERTUNG DER VERSUCHE NACH LIPP ET NIGGLI UND BERECHNUNG DER KONZENTRATION INTRAZELLULÄREN FREIEN CALCIUMS NACH GRYNKIEWICZ | 43 |
| 4.5.2. | DER EINFLUß FREIER FETTSÄUREN AUF DIE KONZENTRATION INTRAZELLULÄREN FREIEN CALCIUMS IST KONZENTRATIONSABHÄNGIG | 46 |
| 4.5.3. | EINFLUß DER KETTENLÄNGE UND DES SÄTTIGUNGSGRADES FREIER FETTSÄUREN AUF DIE INTRAZELLULÄRE KONZENTRATION FREIEN CALCIUMS | 49 |
| 4.5.4. | EINFLUß EINES PHYSIOLOGISCHEN FETTSÄUREGEMISCHES AUF DIE INTRAZELLULÄRE CALCIUMKONZENTRATION | 51 |
| 4.5.5. | VERGLEICH ZUM EINFLUß VON FREIEN FETTSÄUREN, EINEM PHYSIOLOGISCHEN FETTSÄUREGEMISCH UND PFLANZLICHEN ÖLEN AUF DIE INTRAZELLULÄRE CALCIUMKONZENTRATION | 52 |
| 4.5.6. | EINFLUß DES KULTURALTERS AUF DIE FETTSÄUREINDUZIERT VERÄNDERUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION | 55 |
| 4.6. | APOPTOSE UND NEKROSE ALS ANTWORT AUF DIE APPLIKATION VON FREIEN FETTSÄUREN | 59 |
| 4.6.1. | APOPTOSEDETEKTION MITTELS BESTIMMUNG EXTERNALISIERTEN PHOSPHATIDYLSERINS | 59 |
| 4.6.2. | NACHWEIS DER KERNPYKNOSE | 63 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 65 |
| 6. | LITERATURVERZEICHNIS | 67 |
| 6.1. | QUELENNACHWEIS DER ABBILDUNGEN | 77 |
| 7. | THESEN | 78 |

Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| AM-Ester | Acetoxymethylester |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| 6-CF | 6-Carboxyfluoreszein |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGTA | Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat |
| FABP | Fatty Acid Binding Protein |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| HaCaT | Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes |
| HBS | HEPES Buffered Saline |
| HEPES | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure |
| LSM | Laser Scanning Microscope |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| POC-Kammer | Perfusion, Open and Closed Chamber |
| PPAR | Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor |
| SFM | Serum Free Media |
| TEWL | Transepidermal Water Loss |

1. Einleitung

„Weiß wie Schnee, rot wie Blut und schwarz wie das Ebenholz am Fensterrahmen.“ – So wird Schneewittchen, ein Mädchen von außerordentlicher Schönheit im gleichnamigen Märchen der Brüder Grimm beschrieben (Märchen der Gebrüder Grimm). Alle genannten Merkmale beziehen sich auf eines der größten Organe unseres Körpers und seine Anhangsgebilde: die Haut.

Gesunde, zarte und ebenmäßige Haut ist von alters her ein entscheidendes Schönheitsmerkmal der Menschen, besonders bei Frauen. Wen wundert es, daß zur Erlangung beziehungsweise Erhaltung einer schönen und gesunden Haut verschiedenste, zum Teil sogar recht aufwendige, Maßnahmen getroffen wurden. Am weitesten verbreitet war hierbei über Zeit und Kulturen hinweg die Behandlung der Haut mit Fetten und Ölen. Diokles von Karystos (ca. 4.Jh. v. Chr.) schreibt in seiner Abhandlung „Die gesunde Lebensweise“: „Es ist angebracht,... [nach dem Aufstehen] sofort, bevor sie etwas anderes tun, den ganzen Körper mit wenig Öl einzureiben,...Das Massieren macht die Haut kräftiger, das Salben macht sie weicher, das Reinigen macht die Poren reiner und atmungsfähiger,...“ (in Kollesch et Nickel 1986). Zudem geht die Salbung im Sinne von Heiligung oder Weihung auf uralte Traditionen zurück. So wird die Herstellung von Crisam aus Myrrhe, Zimt, Kalmus, Kassia und Olivenöl zur Salbung von Priestern und Königen bereits im zweiten Buch Mose beschrieben (2. Mose 30, 22-34), also in ca. 3500 Jahre alten Schriften, in denen man sich auf die Kunst der Salbenmacher bereits beruft. Bis in die heutige Zeit werben Kosmetikfirmen mit dem Zusatz nativer Öle in Hautpflegeprodukten.

In zahlreichen Abhandlungen wurde auf die Besonderheiten der Haut im Vorkommen, in der Zusammensetzung und Verteilung von Fetten und Fettsäuren hingewiesen (Elias 1996, Schneider et Wohlrab 1997). Die Produktion von Fettsäuren und Fetten in Abhängigkeit vom Differenzierungsstadium legt einen engen Bezug zu Zellzyklus, Reifung und Apoptose von Keratinozyten nahe (Whitfield 1995). Daneben gehen verschiedene dermatologische Erkrankungen wie zum Beispiel Psoriasis, atopische Dermatitis oder Lichen planus mit einer Störung des Fettstoffwechsels der Keratinozyten einher (Das et al. 1992, Uchiyama et al. 2000). Untersuchungen an Mäusen legen nahe, daß gerade diese Störungen zu Fehlfunktionen der Haut führen, wobei die Hautveränderungen von Tieren, die unter einem chronischen

Mangel an essentiellen Fettsäuren leiden, denen ähneln, die an humaner z.B. psoriatisch veränderter Haut vorkommen (Kömüves et al. 2000).

Die zytotoxische Wirkung von Fettsäuren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe besonders an bovinen Linsenepithelzellen untersucht (Gläßer et al. 1996), jedoch liegen ähnliche Studien mit anderem Versuchsdesign auch an Keratinozyten vor (Fröde et Wohlrab 1998). Sie wird zumindest zum Teil über eine Calciumfreisetzung realisiert (Glanz et al. 1997).

Calcium ist ein intrazellulär ubiquitär als second messenger vorkommendes Ion. Es spielt bei der Regulation verschiedenster Lebensäußerungen eine hervorragende Rolle. So wird die Kontraktion von Muskeln über Calcium realisiert, die Blutgerinnung ist vom Vorhandensein von Calcium abhängig. Besonders herausragend und für die Wahl der Calciummessung in dieser Arbeit maßgeblich, ist jedoch die zentrale Rolle des Calciums in der Zellzykluskontrolle und der Differenzierungsinduktion von Keratinozyten (Kumar et al. 1999, Abdel-Naser 1999, Bikle et al. 1996, McGovern et al. 1995). So ist die differentielle Calciumhomöostase Grundlage für die normale Proliferation und Reifung der Keratinozyten (Menon et al.1994, Vicanová et al. 1998). Bei Menschen mit Psoriasis konnte eine Störung der Regulation der Calciumkonzentration gefunden werden (Karvonen et al. 2000).

Ziel der Arbeit war daher die Untersuchung der Wirkung freier Fettsäuren und Fette auf die intrazelluläre Calciumkonzentration von Keratinozyten zwischen Nutzen und Schädigung der Zellen. Es folgten Tests zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose. Zudem wurden ausgewählte Versuche zur Fettsäureaufnahme und Verstoffwechselung durchgeführt. Als Untersuchungsmodell dienten in-vitro kultivierte Keratinozyten der HaCaT-Linie (Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes) (Boukamp et al. 1988).

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Das Untersuchungsobjekt

2.1.1. Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Sie erfüllt wichtige Aufgaben, die sich in Kontakt- und Schutzfunktionen unterteilen lassen. Zu den Kontaktfunktionen gehören die Perzeption von Tast-, Schmerz-, Vibrations- und Wärmereizen, unter der Schutzfunktion subsummiert man die Barriere gegen potentiell schädliche physikalische, chemische, biologische und immunologische Schädigung von außen und gegen Verlust von Wasser und anderen im Körper gebrauchten Substanzen von innen (Plewig et al. 1997). Speziell der transepidermale Wasserverlust (TEWL) ist ein häufig benutzter Parameter zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit der Haut unter besonderer Berücksichtigung der Epidermis in vivo (Schneider et Wohlrab 1997, Kutz et Peltner 1999).

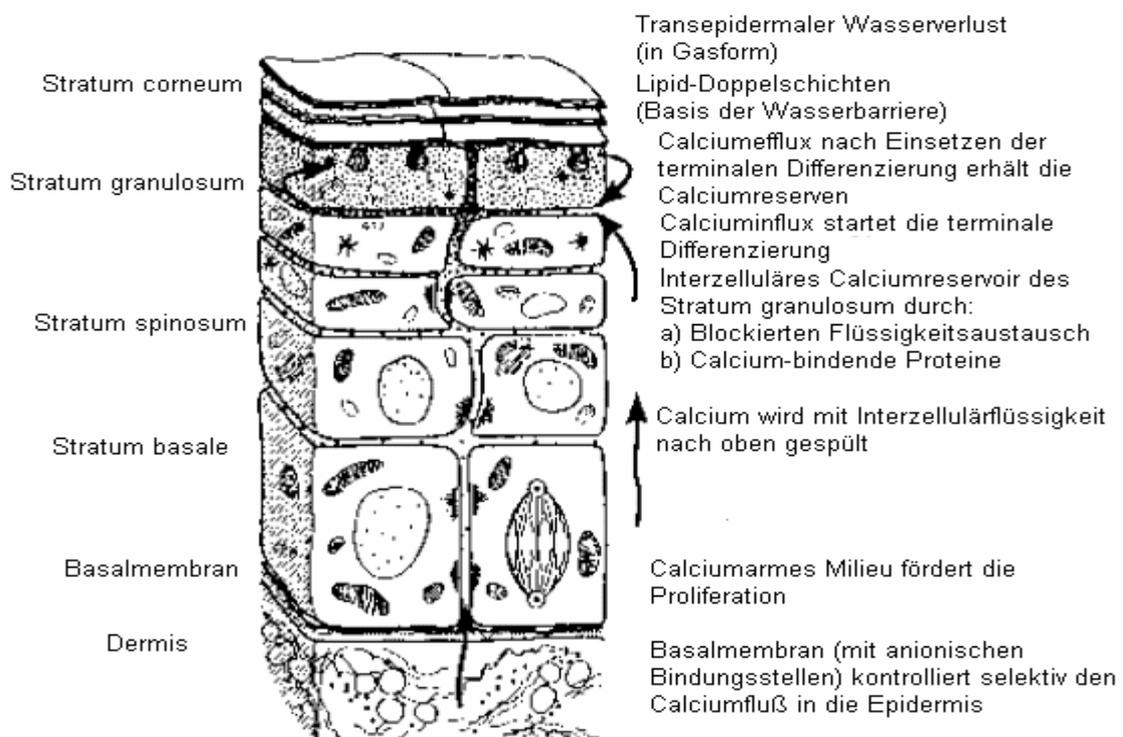


Abb. 1: Aufbau der Epidermis und Verteilung freien Calciums intraepidermal, modifiziert nach Menon et al. 1994 (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

2.1.2. Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten

Die Haut ist, mehr als die meisten anderen Gewebe des Körpers, im Laufe des Lebens der ständigen Regeneration unterworfen. Dabei findet die Proliferation in den tiefen Epidermisschichten, unter normalen Bedingungen nur im Stratum basale statt. Nach einer mitotischen Teilung bleibt eine Tochterzelle im Stratum basale, während die andere eine Differenzierung mit vertikaler Durchwanderung der Epidermis vollzieht, schließlich apoptotisch wird und in das Stratum corneum als tote Hornzelle übergeht. Man kann sagen, daß es im Organ Haut eine horizontale Proliferationsrichtung entlang der Basalmembran im Gegensatz zu einer vertikalen, beziehungsweise von der Basalmembran aus zentrifugalen Differenzierungsrichtung gibt. Für Keratinozyten ist die Anheftung an eine feste Unterfläche für die Initiation der DNA-Replikation im Rahmen der Zellteilung unumgänglich (vgl. Kapitel 2.1.3. und Whitfield et al. 1995).

Die Lebensdauer eines Keratinozyten bis zur Verhornung beträgt beim gesunden Menschen ca. drei bis vier Wochen (Moll 1998). Die Zelle erlebt hierbei einen durchgreifenden Wandel in Inhalt und Gestalt. Die unterste Schicht, das Stratum basale, hat Kontakt zur dermoepithelialen Junctionszone und kann als Einzige Nährstoffe aus dem Blut erhalten, da die Epidermis selbst nicht vaskularisiert ist. Verläßt eine Zelle die Basalschicht, verliert sie ihre Teilungsfähigkeit, wird größer und flacher, der Wassergehalt verringert sich. Die Zusammensetzung des Extrazellularraumes ändert sich tiefgreifend: Um den Aufgaben, die die Haut als Trennorgan zur Umwelt hat, gerecht zu werden, muß eine Barriere aufgebaut werden. Dies wird zum Beispiel durch die Produktion von Fetten und Fettsäuren und deren extrazelluläre Anreicherung in lamellären Strukturen in den oberen Hautschichten erreicht. Als Beweis für die Wichtigkeit der Fettsäureproduktion mag die Tatsache dienen, daß als Antwort auf eine Barriestörung die Synthese von Fettsäuren in der Haut gesteigert wird (Harris et al. 1997). Ein intraepidermaler Calciumgradient wird erzeugt, bei dem die Calciumkonzentration im Stratum basale am geringsten (promitotisch) und in den obersten Schichten des Stratum granulosum am höchsten (antimitotisch) ist (Menon et al. 1994, Vicanová et al. 1998, Schürer et al. 1991). Analog kann durch die Calciumkonzentration des Nährmediums die Proliferations- beziehungsweise Differenzierungsrate beeinflusst werden (Boyce et Ham 1983, Tu et al. 1999). Es werden zudem Filamente produziert, die im Verlauf der Differenzierung im Stratum granulosum mit Filaggrin zu Makrofibrillen aggregieren und eine Art Hüllen bilden (Reichert et al. 1992). Gleichzeitig mit der Bildung dieser Hüllen, der cornified envelopes durch calciumabhängige Transglutaminasen findet die Apoptose des Keratinozyten statt. Es kommt zur DNA-Fragmentierung, zur Zerstörung von Zellorganellen

und zur Desintegration der Zellmembran. Das Stratum corneum bildet eine durchgehende Schicht aus „Ziegeln“ - den Corneozyten- und „Mörtel“ – der protein- und lipidreichen Interzellulärsubstanz (Schürer et al. 1991, Elias 1996).

2.1.3. Zellzyklus

Als Zellzyklus wird die Veränderung von Zellen bei Wachstum und Differenzierung beschrieben (Schiebler et al. 1991 S 5-31).

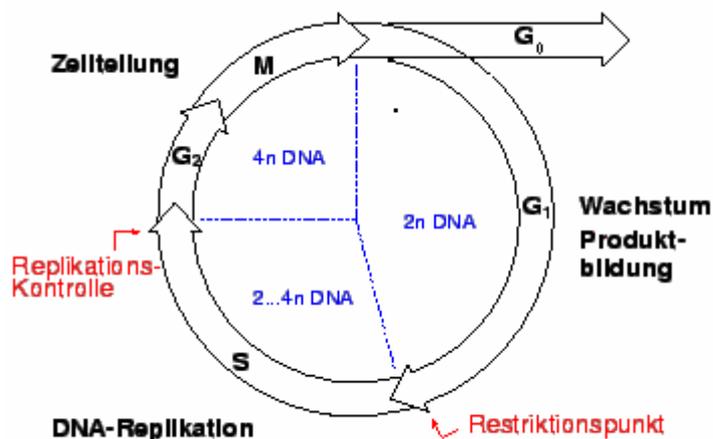


Abb.2: Zellzyklus modifiziert nach Vollmer et al. 2002: Die Zelle durchläuft die Phasen des Zellzyklus im Uhrzeigersinn (siehe Quellenachweis der Abb.)

Beim Durchlaufen dieses Zellzyklus spielt Calcium eine große Rolle. Für diese Arbeit wurden Untersuchungen an basalen, sich also zum Zeitpunkt der Untersuchung möglicherweise teilenden, Keratinozyten durchgeführt. Für die Messungen intrazellulären Calciums muß daher beachtet werden, daß es Vorgänge gibt, bei denen es zur Veränderung der intrazellulären Konzentration freien Calciums kommt, und die auch ohne Manipulation von außen vorkommen. In Abbildung 2 ist der Zellzyklus schematisch dargestellt. Prinzipiell wirkt Calcium über die Aktivierung von im Zellzyklus sequentiell produzierten zyklinabhängigen Phosphokinasen. Calciumoszillationen leiten die G₁-Phase ein, an deren Ende eine Mindestkonzentration externen Calciums (für Keratinozyten 0,05-0,1mM) zur Weiterführung der Zellteilung unumgänglich sind. Weitere Calciumanstiege initiieren S- und Mitosephase. Calcium-Spikes stimulieren den Transport der Chromosomen in Richtung Zentromer und den Abbau der DNA-kondensierenden Phosphokinasen, sind Signal für die Abschnürung der Tochterzellen (Whitfield et al. 1995, Funk et Kind 1997, Nicotera et al. 1994). Hinweis für die Wichtigkeit von Calcium im Zellzyklus ist, daß Calciumkanalblocker zu einer Proliferationsverlangsamung (G₁-Stop) an Keratinozyten führen (Wohlrab et Markwardt 1999).

Bei der Entscheidung, ob die Zelle sich erneut teilt, spielt die Haftung an der Basalmembran eine grundlegende Rolle (vgl. 2.1.2.). Die Differenzierung, die sie alternativ beginnen kann, ist ebenso wie die Apoptose calciumabhängig und wird über Phosphokinase C Isoenzyme gesteuert (Su et al. 1994, Chakravarthy et al. 1995, Li et al. 1996, Cho et Bikle 1997, Denning et al. 1995, Paramio et Jorcano 1997).

2.1.4. Keratinozyten der Zelllinie HaCaT

Zellen der HaCaT-Linie (Human adult low Calcium high Temperature) sind spontan immortalisierte menschliche Keratinozyten (Boukamp et al. 1988). Sie entstammen einem Vollhautpräparat aus der Rückenhaut eines 62jährigen Mannes und sind aus dem Sicherheitsabstand bei Melanomexzision entnommen. Eine makroskopische oder mikroskopische Veränderung der verwendeten Haut bestand nicht. Bei der in vitro Kultivierung kam es spontan zur Immortalisierung, die mit einer genetischen Veränderung im Sinne der Entwicklung eines hypodiploiden Chromosomensatzes einherging (später wurden auch hypotetraploide Klone detektiert) (Boukamp et al. 1988). Obwohl sich die entstandenen Zellen morphologisch von „normalen“ Keratinozyten unterschieden, waren sie doch in der Lage eine relativ unveränderte Epidermis mit beinahe normaler Verteilung von Differenzierungsmarkern zu bilden und blieben apoptosefähig sowie im Tierversuch nicht tumorigen (Boukamp et al. 1988). Im weiteren Verlauf der Kultivierung ließ die Differenzierungsfähigkeit jedoch nach, so daß es nach mehr als 300 Passagen in Einzelfällen zur Ausbildung benigner Tumoren nach subkutaner Injektion an nackten Mäusen kam (Fusenig et al. 1995, Bonnekoh et al. 1991).

2.1.5. Apoptose und Nekrose

Apoptose (griech. für das Abfallen welcher Blätter von Blumen oder Bäumen) ist ein in der lebenden Materie weit verbreitetes und unabdingbares Prinzip. Es stellt sicher, daß Zellen, die nicht mehr funktionstüchtig sind oder nicht mehr gebraucht werden, sterben, die Ressourcen weiterverwendet werden können und die Schädigung der Umgebung möglichst gering gehalten wird. Die Zelle „verpackt“ ihre Überbleibsel geordnet und „umweltschonend“ während sie stirbt. Der Begriff der Apoptose wurde erstmals von Kerr, Wyllie und Currie (1972) in Abgrenzung zum Zelltod durch Nekrose verwandt. Bei der Nekrose handelt es sich um eine Zellschädigung, die so schwer ist, daß die Zelle unmittelbar stirbt, ohne eine Apoptose durchlaufen zu können.

Bei der Apoptose löst sich die Zelle zunächst aus dem Gewebeverband und nimmt eine oft kugelige Form an. Wasser wird ausgeschleust, es bilden sich Ausstülpungen an der Zelloberfläche. Der Zellkern schrumpft, die DNA kondensiert und wird durch Endonukleasen gespalten. Nach der nun folgenden Kariolyse wird der Zellinhalt inklusive der DNA-Fragmente in membranumschlossene Vesikel verteilt. Es kommt nicht zur direkten Freisetzung von Zellbestandteilen. Die Vesikel werden von anderen Zellen, vor allem den darauf spezialisierten Makrophagen, phagozytiert und verstoffwechselt.

Bei der Zellnekrose ist eine Schädigung so stark, daß die Membranintegrität nicht aufrechterhalten werden kann. Der Zellinhalt tritt aus, es kommt zur Freisetzung von Botenstoffen, mit der Folge einer lokalen Entzündung, durch die auch umliegende Zellen betroffen sind (Paus et al. 1995).

Die Haut als Trennorgan des Organismus zur Außenwelt ist in besonderem Maße von Apoptose und Nekrose betroffen, da sie Umweltschädigungen besonders direkt ausgesetzt ist. Wie schon beschrieben, ist die Apoptose aber auch die „Bestimmung“ jedes sich differenzierenden Keratinozyten. Der Mitose schließt sich beim sich differenzierenden Keratinozyten eine Phase der Synthese spezifischer Keratinfilamente an, deren Expression abhängig vom Differenzierungsstadium der Zelle ist. In Basalzellen erfolgt vorwiegend eine Expression der Keratine 5 und 14 (Proliferationsmarker), bei Verlassen der Basalzellzone werden die Keratine 1 und 10 exprimiert, die ebenso wie Filaggrin, Loricrin und Keratinozytentransglutaminase als Marker für eine begonnene Differenzierung gesehen werden (Poumay und Pittelkow 1995, Yuspa et al. 1994). Daneben werden zu einem späten Zeitpunkt im Reifungsprozess (respektive Stratum granulosum Zellen) Proteine hergestellt, die wie Filaggrin mit Keratinen aggregieren und denen eine wichtige Rolle bei der Bildung der „cornified envelopes“ zugeschrieben wird (Ishida-Yamamoto et al. 1997). Daneben wurde gezeigt, daß in kultivierten Keratinozyten die Produktion von Profilaggrin zur Veränderung der Keratine, zur Karyolyse und zu einer Ablösung der adhärennten Zellen führen. Dies legt eine Bedeutung des Filaggrins bei der endterminalen Differenzierung, die als eine Art der Apoptose angesehen wird, nahe (Ishida-Yamamoto et al. 1999).

2.2. Fettsäuren und Fette

2.2.1. Physikalische Eigenschaften und Löslichkeitsverhalten freier Fettsäuren und Fette

Fettsäuren sind Monocarbonsäuren, die eine Kohlenstoffkette zwischen 4 und ca. 28 Kohlenstoffatomen besitzen. Bedingt durch ihre Biosynthese sind die meisten von lebenden Organismen produzierten Fettsäuren unverzweigt und enthalten eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen, meist 16 oder 18. In der Natur vorkommende ungesättigte Fettsäuren besitzen fast ausschließlich cis-Konfiguration (Stryer 1999). Fette oder Triglyceride sind Ester aus einem Molekül Glycerol und drei Fettsäuremolekülen. Die Vielfalt der Fette entsteht dabei durch die Variation der Fettsäuren. (Hauptmann et al. 1976).

Physikalische und chemische Eigenschaften der Fette werden durch Kettenlänge, Anzahl der Doppelbindungen und Verzweigungen wesentlich bestimmt. Fette, die vorwiegend aus gesättigten Fettsäuren bestehen, haben zum Beispiel einen sehr viel höheren Schmelzpunkt, als aus ungesättigten Fettsäuren gebildete. Fettsäuren kürzerer Kettenlänge schmelzen bei niedrigeren Temperaturen als längerkettige (Gurr et James 1971).

Tabelle 1: Fettsäuren modifiziert nach Gurr et James 1971

| Trivialname | Systematischer Name | Summenformel |
|---|--------------------------------------|---------------------|
| <i>Gesättigte Fettsäuren</i> | | |
| Laurinsäure | Dodecansäure | $C_{12}H_{24}O_2$ |
| Myristinsäure | Tetradecansäure | $C_{14}H_{28}O_2$ |
| Palmitinsäure | Hexadecansäure | $C_{16}H_{32}O_2$ |
| Stearinsäure | Octadecansäure | $C_{18}H_{36}O_2$ |
| Arachidinsäure | Eicosansäure | $C_{20}H_{40}O_2$ |
| Behensäure | Docosansäure | $C_{22}H_{44}O_2$ |
| <i>Einfach ungesättigte Fettsäuren</i> | | |
| Palmitoleinsäure | 9-cis-Hexadecensäure | $C_{16}H_{30}O_2$ |
| Ölsäure | 9-cis-Octadecensäure | $C_{18}H_{34}O_2$ |
| Vaccensäure | 11-cis-Octadecensäure | $C_{18}H_{34}O_2$ |
| Eicosensäure | 11-cis-Eicosensäure | $C_{20}H_{38}O_2$ |
| Erucasäure | 13-cis-Docosensäure | $C_{22}H_{42}O_2$ |
| <i>Mehrfach ungesättigte Fettsäuren</i> | | |
| Linolsäure | 9,12-all-cis-Octadecadiensäure | $C_{18}H_{32}O_2$ |
| α -Linolensäure | 9,12,15-all-cis-Octatriensäure | $C_{18}H_{30}O_2$ |
| γ -Linolensäure | 6,9,12-all-cis-Octatriensäure | $C_{18}H_{30}O_2$ |
| Arachidonsäure | 5,8,11,14-all-cis-Eicosatetraensäure | $C_{20}H_{32}O_2$ |

Nahrungsfette kommen in der Natur als Mischungen glycerolveresterter Fettsäuren vor. Hierbei wird die Zusammensetzung wesentlich von der Herkunft bestimmt. So enthalten zum Beispiel pflanzliche Fette einen höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren als tierische. Von den häufig genutzten Fetten besitzt zum Beispiel das Hammelfett mit 55°C den höchsten, das Nußöl mit minus 27°C den niedrigsten Schmelzpunkt, was durch den hohen Anteil an Stearin- und Palmitinsäure des Hammelfettes begründbar ist (Welzl et al. 1985).

Tabelle 2: Öle modifiziert (nach Welzl et al. 1985, Kerschbaum et Schweiger 2001) und physiologische Fettsäuremischung (Hennig 1993)

| Öl | Pflanze | Zusammensetzung (alle Anteile >1%) |
|----------------------------------|--------------------------|--|
| Olivenöl | <i>Olea europaea</i> | 66.3% Ölsäure 12.3% Linolsäure 8.9% Palmitinsäure 4.9% Eicosensäure 4.7% Palmitoleinsäure 2.4% Stearinsäure |
| Klettenöl | <i>Arctium lappa</i> | 61.7% Linolsäure 10.9% Ölsäure 8.3% Linolensäure 5% Palmitinsäure 1.7% Stearinsäure |
| Avocadoöl | <i>Persea americana</i> | 49.8% Ölsäure 19.5% Palmitinsäure 11.3% Linolsäure 9.8% Palmitoleinsäure 6.8% Vaccensäure |
| Nachtkerzenöl | <i>Oenothera biennis</i> | 71.1% Linolsäure 10.4% Linolensäure 7.2% Ölsäure 7.0% Palmitinsäure 1.9% Stearinsäure |
| Hanföl | <i>Cannabis sativa</i> | 57.8% Linolsäure 20.1% Linolensäure 10.4% Ölsäure 6.6% Palmitinsäure 2.4% Stearinsäure |
| Physiologische Fettsäuremischung | Hennig et al. 1993 | 37% Ölsäure 30% Palmitinsäure 16% Linolsäure 14% Stearinsäure 3% Arachidonsäure |

Die Zusammensetzung einiger ausgewählter pflanzlicher Fette, die in den Experimenten verwendet wurden, ist in Tabelle 2 dargestellt. Die physiologische Fettsäuremischung nach Hennig et al. 1993 nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Die Fettsäuren sind nicht glycerolverestert, jedoch durch ihre Mischung für die Zellen physiologischer als einzelne Fettsäuren.

Fette und Fettsäuren sind in Wasser sehr schlecht, in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Die Löslichkeit von Fettsäuren in Wasser wird häufig durch die kritische Mizellenbildungskonstante beschrieben (Mukerjee et Mysels 1971). Hierbei geht man davon aus, daß sich Fettsäuremoleküle, die nicht molekular gelöst werden können, in kugeligen Strukturen zusammenlagern, wobei die dem Wasser zugewandte Seite durch die Carboxylgruppen gebildet wird. Diese schirmen die apolaren Kohlenstoffketten somit ab. Für die Bildung von kleinen Mizellen im Gegensatz zu den viel größeren Fettsäurekristallen oder -aggregaten sind aber bestimmte Bedingungen notwendig: der pH-Wert muß im basischen Bereich liegen, unter pH 9 ist eine Mizellenbildung unwahrscheinlich. Eine weitere Voraussetzung für die Mizellenbildung ist eine ausreichend hohe Temperatur. Bei unseren Standardbedingungen (20°C, pH um 7) bilden die nicht molekular gelösten Fettsäuremoleküle amorphe, lamellär aufgebaute Aggregate, jedoch keine Mizellen (Cistola et al. 1988, Oberle 1999). Unser Ziel war es, möglichst kleine Aggregate zu erzeugen und somit eine „quasi-Lösung“ zu erhalten.

2.2.2. Bedeutung von freien Fettsäuren und Fetten für Haut und Schleimhäute

Keratinocyten brauchen essentielle Fettsäuren, insbesondere Linolsäure, für die Erzeugung einer kompetenten Barriere. Interessanterweise besteht bei den Keratinocyten sogar eine bevorzugte Aufnahme der Linol- im Vergleich zur Ölsäure, also einer essentiellen versus einer nicht essentiellen ungesättigten Fettsäure (Schürer et al. 1994). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, daß eine Diät, in der essentielle Fettsäuren fehlen, zu schweren Hautveränderungen führt. Kömüves et al. (2000) beschrieben eine Verdoppelung der Hautdicke mit extensiver Hyperproliferation und Akanthose sowie einer Verminderung von Differenzierungsmarkern auf mRNA-Ebene nach, die Barrierefunktion war stark gestört. Auch für die meisten *in vitro* kultivierten Keratinocyten spielt eine Linolsäuredefizienz eine wichtige Rolle. Vicanová et al. (1999) zeigten, daß mit Linolsäure supplementierte Keratinocyten *in vitro* langsamer proliferieren und damit nativen Keratinocyten ähnlicher wurden.

Ebenso wie der Linolsäure wird auch anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine direkte proliferationsmodulierende Wirkung zugeschrieben (Williams et al. 1998, Prescott 1999, Surette et al. 1996, Seegers et al. 1998, Das 1999, Chen et Auburn 1999). Diese ist wahrscheinlich über Peroxisome-Proliferator-Aktivierte Rezeptoren (PPAR) vermittelt (Huang et al. 2002, vgl. Kap. 4.6.3.). Eine gewisse Sonderrolle nimmt die Arachidonsäure als

Ausgangsprodukt der Synthese der proinflammatorischen Prostaglandine und Leukotriene ein (Marnett et al. 1999).

Auch Abbauprodukten von Fetten wird eine vielfältige biologische Aktivität zugeschrieben. So wirkt Lysophosphatidsäure proliferationsstimulierend, Hydroperoxide der Fettsäuren hingegen verlangsamen die Proliferation und können zytotoxisch sein (Van Corven et al. 1992, Jalink et al. 1995, Göhring et al. 2000).

Zudem besitzen verschiedene Fettsäuren einen direkten Einfluß auf Membranproteine (Tamura et al. 1985, Cavallini et al. 1996). Beispielsweise führen ungesättigte Fettsäuren in niedrigen Konzentrationen zu einer Aktivierung, in hohen zur Hemmung der Calcium-ATPase (Cheah 1981). Nitrolinolat verhindert über die Hemmung der Calciumfreisetzung eine Thrombozytenaggregation (Coles et al. 2002).

Polyungesättigten Fettsäuren wird sogar eine gewisse kardioprotektive Wirkung zugestanden, der Mechanismus ist jedoch unklar (Pepe et Lennan 2002).

Für tierische Organismen spielt die Mitaufnahme von fettlöslichen Vitaminen eine entscheidende Rolle. Bei Hypovitaminosen sind auch und in besonderem Maße Haut und Schleimhäute betroffen. So führt zum Beispiel ein Vitamin-A-Mangel neben Sehstörungen zu Mundwinkelrhagaden, perifollikulärer Hyperkeratose und Veränderungen der Zungenschleimhaut mit dem Symptom der „grauen, glatten Zunge“ (Rösch 1999).

2.2.3. Bedeutung von freien Fettsäuren für die Zellmembran

Membranen in eukariotischen Zellen bestehen aus Phospholipiden, Cholesterin und globulären Proteinen (Schiebler et al. 1991).

Bei den Phospholipiden ist im Vergleich zum Fett (Triacylglycerol) ein Acylrest durch einen Phosphatrest ersetzt, an den unterschiedliche weitere Moleküle gekoppelt sein können. Es kommt hierdurch zur Ausbildung eines hydrophilen Anteils in einem zuvor hydrophoben Molekül. So erklärt sich die Ausrichtung der Phospholipide in der Membran.

Dabei bilden die Membranen lebender Zellen keineswegs ein statisches System. Singer und Nicholson entwickelten bereits 1972 das Flüssigmosaikmodells zur Beschreibung von Zytomembranen. Es kommt innerhalb der Membranen ständig zu Seitwärtsbewegungen der Phospholipide (Fulbright et al. 1997) und der Membranproteine sowie zum Austausch innen - außen (flip -flop) (Kamp et al. 1995).

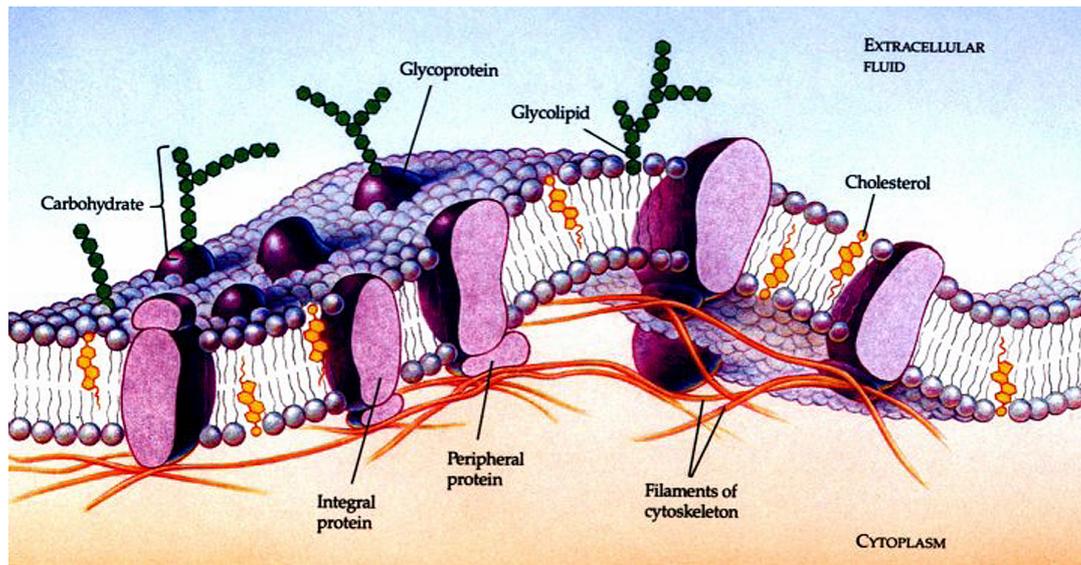


Abb.3: Modellzeichnung einer Zellmembran. Die Phospholipide (siehe unten) sind mit dem polaren Molekülteil zum Wasser hin, mit den unpolaren Fettsäureschwänzen zueinander ausgerichtet. Zwischen sie sind Cholesterinmoleküle eingelagert. Proteine können einseitig in die Membran integriert sein, diese durchdragen oder über einen Lipidanker mit ihr verbunden sein. Außengelegene Lipide und Proteine können glycosyliert sein. (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

Die „Flüssigkeit“ der Membran wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Membranen mit einem hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren in ihren Phospholipiden sind durch deren sterische Besonderheiten bei sonst gleichen Bedingungen analog natürlichen Fetten und Ölen flüssiger als Membranen mit niedrigem Anteil ungesättigter Fettsäuren. Zudem spielen die Kettenlänge der Fettsäuren sowie der Cholesterol- und Proteingehalt der Membran eine wesentliche Rolle. Die Membranfluidität selbst unterliegt einer strengen Kontrolle durch die Zelle und ist im Laufe des Zellzyklus zur Mitose besonders hoch (siehe auch Kapitel 2.3.2.). Die Membranen selbst stellen ein hydrophobes System in hydrophiler Umgebung dar. Für die Aufnahme der überwiegend hydrophoben Fettsäuremoleküle besteht daher die Möglichkeit, aufgrund ihrer apolaren Eigenschaften passiv in dieses System inkorporiert und integriert oder in das Zellinnere abgegeben zu werden (Zakim 1996). Durch Untersuchungen an Modellmembransystemen (Oberle 1999) wurde gezeigt, daß ein effizienter Fettsäuretransport durch Membranen auch ohne Vorhandensein von Transportproteinen erfolgt.

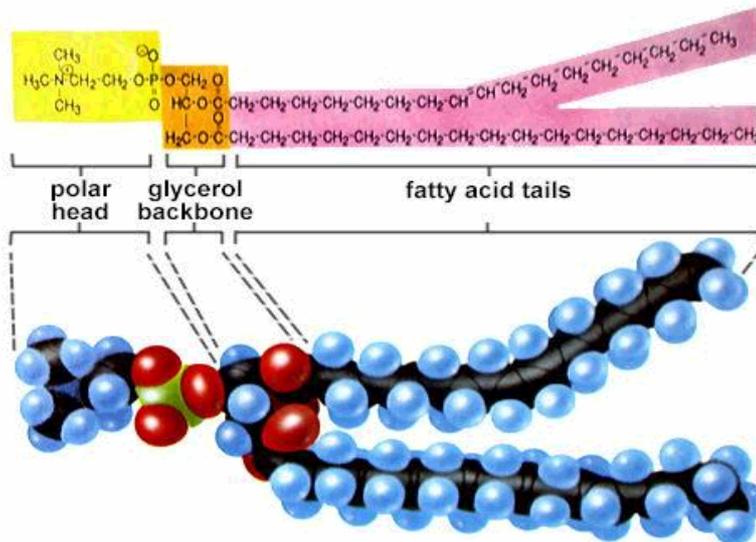


Abb.4: Phospholipid - hier Phosphatidylcholin oder Lecithin: Ein Molekül Glycerol ist mit zwei Fettsäuren –hier Ölsäure und Stearinsäure sowie einem Phosphatrest verestert. Der Phosphatrest seinerseits ist mit Cholin verestert. (aus: siehe Quellenachweis der Abb.)

Wegen der schlechten Löslichkeit von Fettsäuren in Wasser ist es für Zellen wichtig, um Aggregatbildung zu verhindern, einen „Lösungsvermittler“ zu finden. Hierbei sollen Fettsäuren und Fette nur sehr lokalisiert in Lösung gebracht werden, da eine allgemeine Fettlösung beispielsweise durch Tenside zum Zelltod durch Membrandesintegration führen würde. In biologischen Systemen übernehmen fettsäurebindende Proteine (FABP's- Fatty Acid Binding Proteins) diese Aufgabe. Die Fettsäuren werden in hydrophobe Bindungsstellen aufgenommen und so einer weiteren Verwendung durch die Zelle zugänglich gemacht. Ein extrazellulär ubiquitär verbreitetes lipidbindendes Protein ist das Albumin, das auch für in vitro- Versuche Anwendung findet (Trimborn et al. 1999). Für verschiedene Zellpopulationen wurde eine Vielzahl unterschiedlicher FABP's charakterisiert, die zumindest teilweise einen Transport von Fettsäuren durch zelluläre Membranen ermöglichen (Roulin et al. 1999, Harris et al. 1998, Siegenthaler et al. 1994). Einige dieser Transporter besitzen eine unterschiedliche Affinität für verschiedene Fettsäuren, so wird Linolsäure im Vergleich zur Ölsäure in Keratinozyten bevorzugt aufgenommen, ein Phänomen, das in Fibroblasten und einer humanen Hepatom- Zelllinie nicht nachgewiesen werden konnte (Schürer et al. 1994, Schürer et al. 1999). Eine Diffusion allein würde das nicht erklären können, besonders in Anbetracht der Tatsache, daß cis-ungesättigte Fettsäuren aufgrund ihrer sterischen Eigenschaften Membranen eigentlich schlechter passieren können (Heyliger et al. 1996).

Einige FABP's bilden Komplexe mit calciumbindenden Proteinen, was eine direkte Beeinflussung von Fettsäurebindung und Calciumkonzentration nahelegt (Hagens et al. 1999). Auf die Zytotoxizität von Fettsäuren scheinen die FABP's jedoch keinen Einfluß zu haben (Zimmerman et Veerkamp 2001). Von Strump et al. (2001) wird deshalb in

Anerkennung früherer Forschungsergebnisse ein Zusammenwirken beider Mechanismen - der aktiven und der passiven Fettsäureaufnahme - favorisiert.

2.2.4. Störung der Ionenhomöostase durch freie Fettsäuren

Seit längerer Zeit wurde die zytotoxische Wirkung freier Fettsäuren auf Zellen, in unserer Arbeitsgruppe am Beispiel der bovinen Linsenepithelzellen, erforscht. Man fand heraus, daß cis-ungesättigten Fettsäuren und hier insbesondere der Linolsäure eine starke zellschädigende Wirkung zukam. Durch Neutralrottests wurden Schädigungsraten ermittelt, es konnten große Unterschiede zwischen einzelnen Säuren detektiert werden. Gruner (1997) hatte die lokalisierte Anhäufung von Linolsäure in den blebs beschrieben. Man konnte die These widerlegen, daß Lipidperoxidationsprodukte der Fettsäuren die eigentlich schädigenden Substanzen sind (Faß 1997).

Es wurden weiterhin Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen charakterisiert, Hauptaugenmerk lag hierbei auf Natrium, Kalium, Calcium und Protonen. Die Applikation geringer Konzentrationen [10µM] von Linolsäure bewirkt einen gesteigerten Influx von Natriumionen in die Zelle, ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration wird aber durch Aktivierung der Na-K-ATPase kompensiert, solange im Medium ausreichend Kalium zur Verfügung steht. Erst bei höheren Konzentrationen [100µM] kommt es neben dem Natrium-Influx auch zur Inhibierung der Na-K-ATPase und in der Folge zum Anstieg der intrazellulären Natriumionenkonzentration (Nguyen et al. 2000).

Die Behandlung mit Fettsäuren kann in unterschiedlichem Maße zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und zum Abfall des pH-Wertes im Zellinneren führen. Hierbei ist ein Zusammenhang zwischen pH-Wert und Calciumionenkonzentration möglich: an Knochen konnte ein Calcium-Efflux durch Azidose nachgewiesen werden (Bushinski et al. 2001). Darüber hinaus bewirkt Calcium eine Aktivierung von Chlorid- und Kalium-Kanälen an HaCaT-Zellen (Kögel et Alzheimer 2001).

Das Interesse zur Untersuchung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Fettsäureapplikation hatte unterschiedliche Gründe: Wie schon angedeutet ist Calcium ein Messengerion mit vielfachen Aufgaben in Zellen im allgemeinen und in Keratinozyten im besonderen. Des weiteren zeigten Jaworski und Wistow 1996 eine überraschende Ähnlichkeit: Differenzierungsassoziierte fettsäurebindende Proteine in Linsenepithelzellen vom Rind sind mit denen menschlicher Keratinozyten eng verwandt.

Ob Calcium und Fettsäurebindung zusammengehören, beantworten die Zellen selbst: Siegenthaler et al. beschrieben 1997 die Bildung eines Enzymheterokomplexes mit Calcium- und Fettsäurebindungskapazität und einer direkten Beeinflussung der Fettsäurebindung durch die Calciumkonzentration der Umgebung.

2.3. Untersuchungsparameter

2.3.1. Untersuchungen zur Aufnahme von freien Fettsäuren in die Zellmembran

Für Studien zur Aufnahme in Zellen bedient man sich verschieden markierter Fettsäuren. Es kommen grundsätzlich radioaktiv markierte, fluoreszenzmarkierte und selbstfluoreszierende Fettsäuren in Betracht. Die Zuordnung radioaktiv markierter Fettsäuren zu bestimmten Zellkompartimenten erfordert eine Fixation der Zellen, bedeutet, daß eine zeitabhängige Betrachtung der gleichen Zellen nicht möglich ist. Die Fluoreszenzmarkierung von Fettsäuren wird durch die Kopplung eines fluoreszierenden Moleküls an ein Fettsäuremolekül realisiert. Ein Beispiel ist die 11-(Anthroyl-oxy)undecansäure (Stützer et al 1997). Problematisch ist hierbei, daß das entstehende Molekül sich in Form und Größe deutlich von der unmarkierten Fettsäure unterscheidet und dadurch möglicherweise Veränderungen in der Aufnahme zustande kommen. Eine Alternative bietet die Verwendung von Parinarsäure, einer langkettigen Fettsäure mit 4 konjugierten Doppelbindungen (Sklar et al. 1977), die außerdem kaum verstoffwechselt wird (Huang et al. 2002).

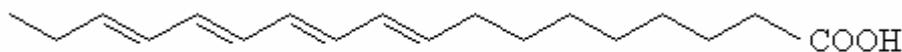


Abb. 5: Formel von trans-Parinarsäure

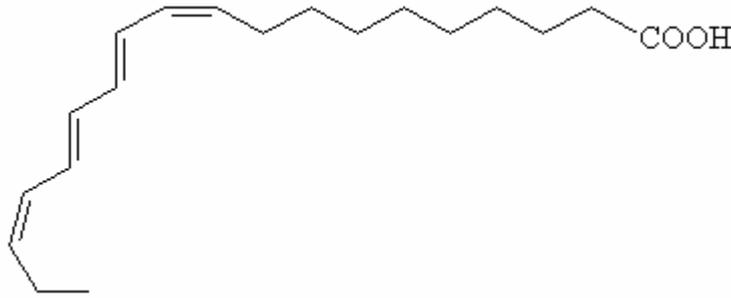


Abb.6: Formel von cis-Parinarsäure

In der folgenden Tabelle 3 sind Vorteile und Nachteile der Parinarsäure als Marker für die Fettsäureaufnahme in Membranen gegenübergestellt.

Tabelle 3: Vor- und Nachteile der Messung der Fettsäureaufnahme mittels Parinarsäure im Vergleich zur Verwendung markierter Fettsäuren (nach Oberle et al. 1997)

| Vorteile | Nachteile |
|---|--|
| Fettsäure ohne zusätzliche Molekülteile | Relativ kurze Halbwertszeit, besonders unter Lichteinfluß |
| Keine Radioaktivität | Veränderte Molekülbeweglichkeit im Vergleich zu anderen Fettsäuren |
| Eigenfluoreszenz in lipophiler Umgebung | |
| Keine nennenswerte Verstoffwechslung | |

2.3.2. Messung von Membranschädigungen durch freie Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren sind bei Raumtemperatur flüssig, gesättigte oft fest. Diese altbekannte und erklärte Feststellung ist für Zellen von immenser Wichtigkeit und unterliegt strenger Regelung: Ist der Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran zu hoch, so wird diese verflüssigt- sie kann ihre Barrierefunktion nicht mehr ausreichend wahrnehmen, Schädigung oder Tod der Zelle sind mögliche Folgen. Reicht der Anteil ungesättigter Fettsäuren nicht aus, so wird die Membran spröde. Intramembranale Proteine können in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, die Membran kann sogar rissig werden. In Bakterien wie zum Beispiel *Escherischia coli* stellt die Saturierung beziehungsweise Desaturierung der Membranlipide die wesentliche Regulationsmöglichkeit der Membranfluidität dar, in Eukaryonten wird sie daneben durch den Cholesterolgehalt reguliert (Stryer 1999). Dunham et al. (1996) zeigten bei Studien an *in vitro* kultivierten Keratinozyten den Gehalt an Linol- und Ölsäure als wichtige Determinanten der Membranfluidität. Im Gegenzug führt eine Verminderung der

Membranfluidität zum Beispiel durch eine Hemmung der Stearindesaturase durch Interferon führt zu einer Verminderung der Zell- und Oberflächenmobilität, zu einer Modulation der Rezeptorexpression sowie zu einer Hemmung der Zellteilung (Apostolov 1989).

Über Membranveränderungen im Sinne von Ausstülpungen der Plasmalemm als erstes morphologisches Merkmal der Zellschädigung berichtete Lewis bereits 1923. Diese Protrusionen oder „Blebs“ treten als Reaktion auf verschiedene Schädigungsmechanismen auf. Gruner wies 1997 nach, daß die blebs, die Linsenepithelzellen nach Behandlung entwickeln, mit Depots akkumulierter Linolsäure assoziiert sind und damit wahrscheinlich selbst durch direkte Linolsäureeinwirkung entstehen. Eine wichtige Frage war, ob die Membranveränderungen durch die Behandlung mit ungesättigten Fettsäuren so stark sein würden, daß man die folgenden Schädigungen damit erklären könnte. Erste Untersuchungen hierzu wurden von Oberle (1999) an Modellmembransystemen (Liposomen) durchgeführt. Er verwendete 6-Carboxyfluoreszein (6-CF), ein Fluorophor, das in hoher Konzentration selbstquenchend wirkt, also bei großer Moleküldichte nicht mehr fluoresziert. Mit der Permeabilisierung der Liposomenmembranen konnte 6-CF sich verdünnen und fluoreszieren. Da eine Beladung von Zellen mit selbstquenchenden Konzentrationen mit deren Überleben nicht vereinbar ist, mußte eine andere Methode gefunden werden. Die Zellen wurden von uns mit Cell Tracker Orange, einem Farbstoff auf Rhodaminbasis, angefärbt, das Außenmedium enthielt 6-CF in nicht selbstquenchender Konzentration.

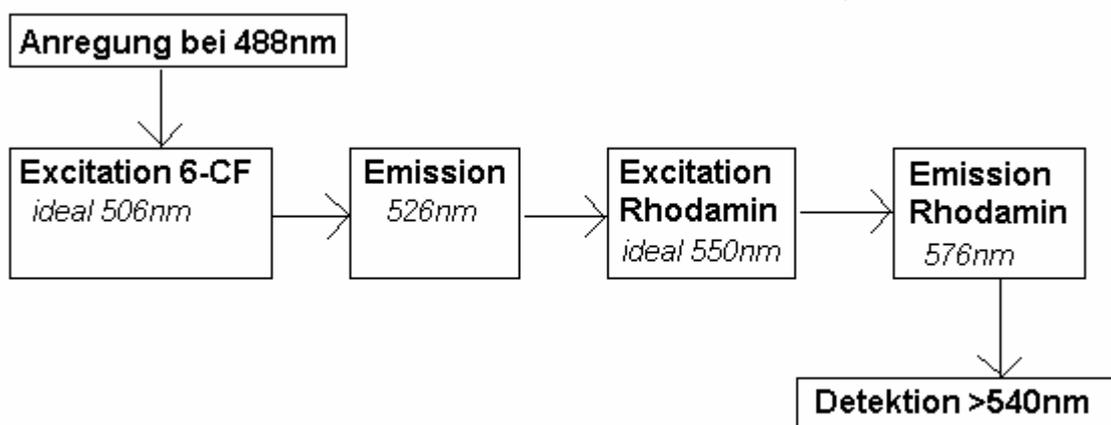


Abb.7: Flußdiagramm zum Resonanzenergietransfer, Wellenlängen nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes).

Bei enger räumlicher Beziehung zwischen 6-CF und Rhodamin kommt es, wie im Flußdiagramm (Abb. 7) dargestellt, zu einem Resonanzenergietransfer: Wenn die Zellmembran so durchlässig geworden ist, daß die großen, hydrophilen 6-CF-Moleküle sie passieren können, wird durch die Emissionsenergie das Fluoreszein angeregt, dessen Emission gemessen wird. Damit stellt die Methode ein gutes Werkzeug zur Messung von Membranpermeabilisierungen dar.

2.3.3. Prinzip der Messung intrazellulären freien Calciums und des pH-Wertes mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen

Um Konzentrationen von Substanzen in Zellen zu messen gibt es verschiedene Möglichkeiten: grundsätzlich kann man zwischen statischen und dynamischen Methoden unterscheiden. Bei den statischen Methoden wird die Zelle vorher fixiert oder aufgeschlüsselt, wie dies in unseren Versuchen zum Beispiel bei den Lipidextraktionen und beim Nachweis von Annexin an der Außenseite des Plasmalemm erfolgte. Im Gegensatz dazu stehen dynamische Methoden, bei denen eine Aussage über lebende, reagible Zellen gemacht wird. In Tabelle 4 sind einige Vor- und Nachteile von Messungen an vitalen und fixierten Zellmodellen gegenübergestellt.

Tabelle 4: Vergleich von statischen und dynamischen Messungen an Zellen

| Messung an fixierten Zellen | Messung an vitalen Zellen |
|---|---|
| Nachweis sehr geringer Mengen verschiedenster Substanzen, Substanzklassen und Makromoleküle möglich | Nachweis ist nur für bestimmte Substanzen/ Substanzklassen möglich, Kalibrierung oft problematisch |
| Eine Messung an einer Zelle/ Zellpopulation | Mehrere Messungen an einer bestimmten Zelle/Zellpopulation möglich- Zeitlicher Verlauf der Reaktion einer speziellen Zelle/ Zellgruppe wird methodenabhängig ermöglicht |
| Mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Abtöten der Zelle | Mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Schädigung der Zelle durch Meßinstrument |

Für die Messung des freien Calciums war es uns wichtig, den zeitlichen Verlauf der Reaktion der Zellen zu untersuchen. Für dieses Ion stehen unterschiedliche Meßmethoden zur Verfügung. Die heute am häufigsten genutzten sind die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und die Verwendung calciumsensitiver Mikroelektroden. Die erste Calciummessung an lebenden Zellen gelang Ridgeway und Ashley 1967. Das von ihnen verwendete Aequorin, das bei Kontakt mit Calcium luminisziert, findet sich in der Peripherie des Schirmes von Quallen der Art *Aequorea forskalea*. Aequorin muß wegen seiner Größe in die Zellen injiziert werden. Die Verwendung calciumsensitiver Mikroelektroden erlaubt die

Messung sehr schneller Konzentrationsänderungen. Ein Nachteil ist die Verletzung oder zumindest Störung der Zelle durch die Elektrode selbst. Die Methode geht von einer Gleichverteilung des Calciums im Zytosol aus, die jedoch aufgrund der behinderten Diffusion in gelartiger, strukturierter und kompartimentierter Umgebung nicht generell gewährleistet ist. Vielmehr kann mit Hilfe einer calciumsensitiven Elektrode nur eine sehr lokale Calcium-Messung erfolgen. Limitierend wirkt auch schlicht die Zellgröße: bei kleinen und sehr flachen Zellen stellt die Platzierung der Elektrode ein technisches Problem dar (Cobbold et Rink 1987).

Ein entscheidender Fortschritt in der Calciummessung war die Entwicklung fluoreszierender Calciumchelatoren durch Tsien 1982 und Grykiewicz 1985. Zunächst wurden Fluorophore hergestellt, die einer Anregung durch UV-Licht bedurften, z. B. Quin2, Fura-2 und Indo-1. Seit Beginn der neunziger Jahre sind auch Farbstoffe auf dem Markt, die mit sichtbarem Licht angeregt werden können (Fluo3, Fura-Red), was sowohl technisch als auch biologisch sinnvoll erscheint. Technisch, weil der Betrieb eines UV-Lasers schwieriger, kostenintensiver und energieaufwendiger ist, biologisch, weil UV-Strahlung selbst eine Zellschädigung hervorruft (Gniadecki et al. 1998).

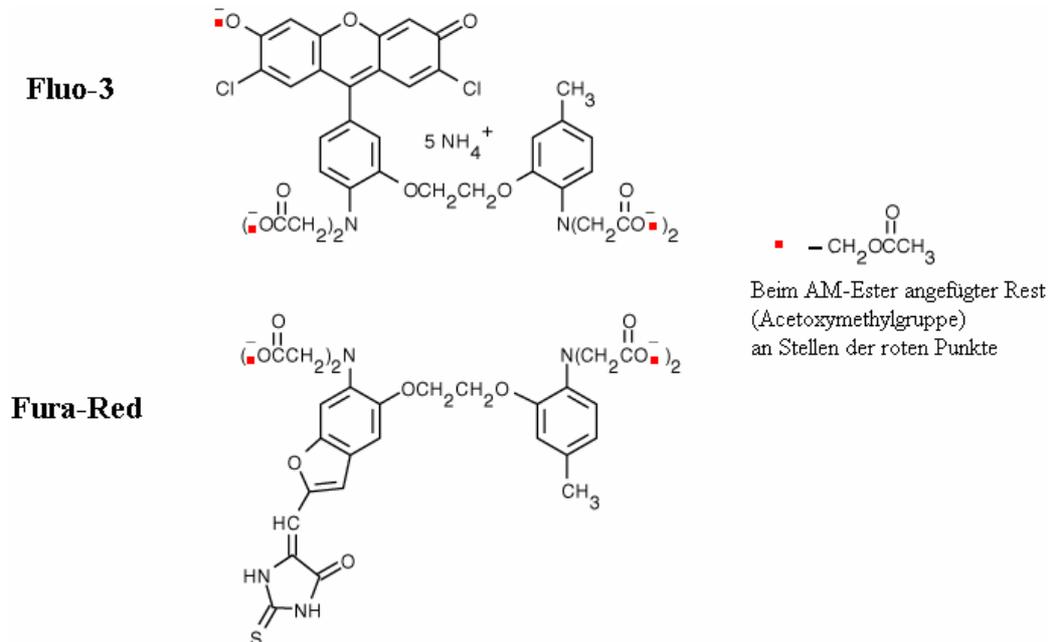


Abb.8: Dargestellt sind die Formeln der Calciumfluoreszenzfarbstoffe Fluo3 und Fura-Red. In Form der AM-Ester sind sie membrangängig, nach Verseifung durch Esterasen sind sie in der Zelle gefangen. Sie bilden mit Calcium Chelatkomplexe und ändern dadurch ihre Fluoreszenz. (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

Durch Veresterung der Acetyl- Seitenketten mit einer Acetoxymethylgruppe werden die zuvor stark negativen hydrophilen Farbstoffe in hydrophobe umgewandelt, die nicht fluoreszierend und membrangängig sind und nicht mehr in die Zelle injiziert werden müssen. Im Zellinneren werden die Esterbindungen enzymatisch gespalten, der Farbstoff ist in der Zelle „gefangen“ und kann auch erst jetzt, nach der Spaltung, bei Kontakt zu freiem Calcium fluoreszieren (Kao 1994, Molecular Probes Produktinformation 2002).

Calciumfluoreszenzfarbstoffe, die im Bereich des sichtbaren Lichts angeregt werden können, besitzen meist keinen Stokes shift, der zwischen der calciumgebundenen Form und der calciumfreien Form unterscheiden ließe. Ein Stokes shift liegt dann vor, wenn die Calciumbindung durch den Farbstoff eine Verschiebung des Emissionsspektrums bewirkt. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn die Fluoreszenz des Farbstoffes mit und ohne gebundenes Calcium am ehesten eine Frage der Intensität ist. Das Fehlen eines Stokes shifts ist insofern ein Problem, als sich örtliche Ungleichverteilungen von Farbstoff (z. B. Bewegungsartefakte bei Muskelzellen) und Artefakte durch Bleichen der Farbstoffe nicht von der Calciummessung trennen lassen. Abhilfe schafft eine von Lipp und Niggli 1993 vorgestellte Methode. Die Zellen werden mit einem Gemisch zweier unterschiedlicher Calciumfarbstoffe (hier Fluo3 und Fura-Red) beladen, analog zur Verwendung im UV-Bereich angeregter Farbstoffe wird aus den zwei erhaltenen Emissionen ein Quotient gebildet.

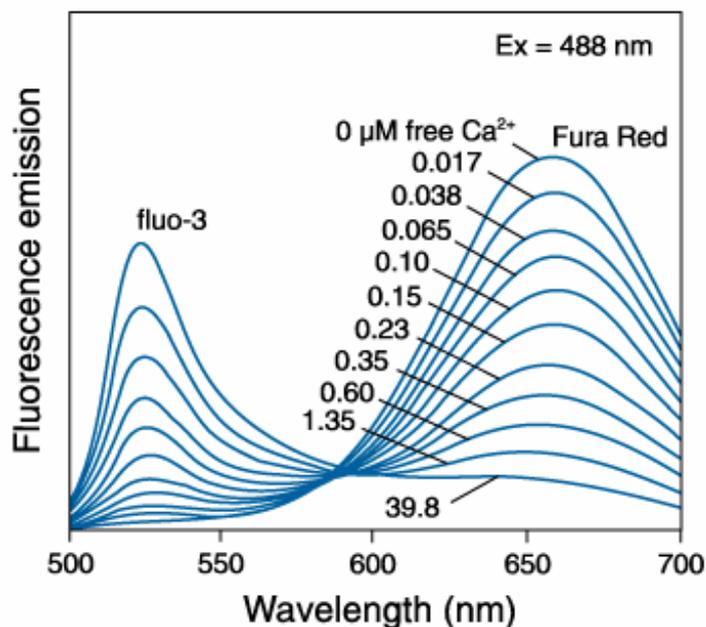


Abb.9: Fluoreszenzspektrum des Farbstoffgemisches Fluo3 und Fura-Red. Der resultierende Stokes shift ergibt sich aus der Tatsache, daß bei steigender Calciumkonzentration die Fluoreszenz von Fura-Red abnimmt, die von Fluo3 bei anderer Wellenlänge zu. (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

Voraussetzung ist ein ausreichender Unterschied in der Emissionswellenlänge, technisch günstig ist die Anregung bei gleicher Wellenlänge. Nachteile der Verwendung von

Fluoreszenzfarbstoffen gegenüber z. B. calciumsensitiven Elektroden sind die problematischere (und ungenauere) Kalibrierung, daneben erschweren Überstrahlungsartefakte die zellstrukturelle Zuordnung.

Der intrazelluläre pH-Wert ist ein weiterer, auf das genaueste geregelter Faktor im Ionenhaushalt der Zelle. Seine Bedeutung erschließt sich nicht zuletzt anhand der vielen Lokalisationen, an denen ein spezieller pH-Wert vom Organismus genutzt wird: klassische Beispiele sind der saure Magensaft, das leicht alkalische Dünndarmsekret und selbstverständlich der Säureschutzmantel der Haut. Eine niedriger pH-Wert begünstigt die Funktion einiger Enzyme, andere werden im sauren Milieu gehemmt. Dieser Regelkreis besteht auch in der Zelle. Fettsäuren sind schwache organische Säuren. In der Literatur werden Zusammenhänge zwischen Fettsäureaufnahme und pH-Wert beschrieben (Elsing et al. 1996). Die intrazelluläre pH-Messung lief in unseren Versuchen nach einem ähnlichen Prinzip wie die Calciummessung ab: Ein pH-sensitiver Farbstoff, bei unseren Untersuchungen SNARF1 wird in Form eines AM-Esters in die Zelle eingeschleust und zeigt nach Abspaltung des Azetoxymethylrests eine pH-Wert abhängige Fluoreszenz (Gonda et al. 1999).

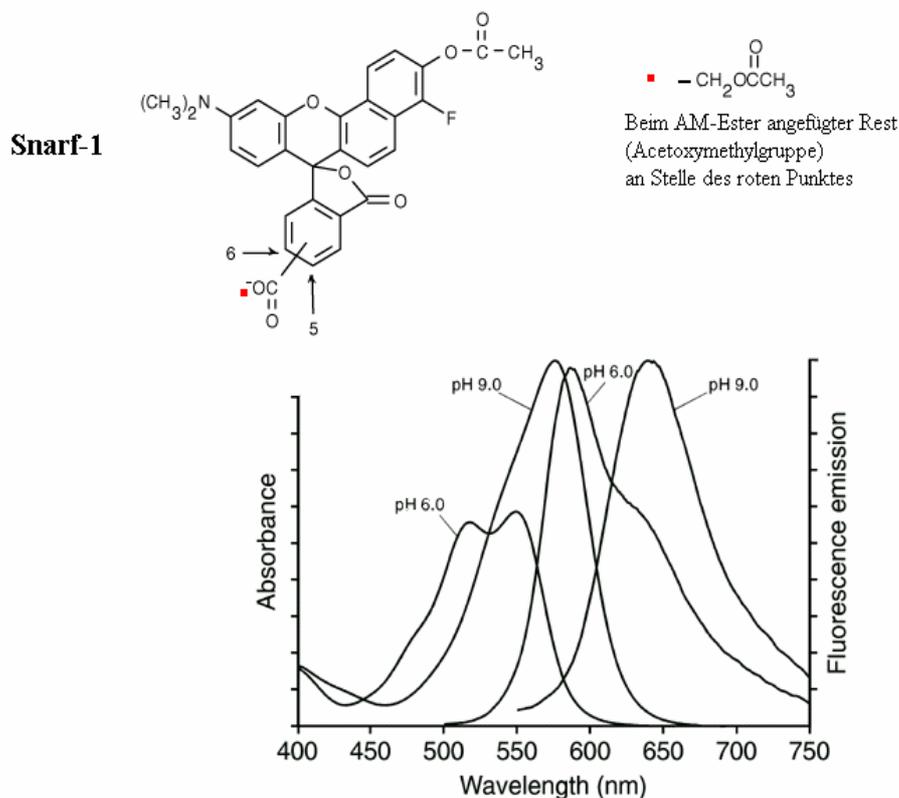


Abb.10: Formel von SNARF 1 und Spektrum in Abhängigkeit vom pH-Wert (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

2.3.4. Laser Scanning Mikroskopie

Die Laser Scanning Mikroskopie ermöglicht die detailgenaue Darstellung kleiner Objekte wie zum Beispiel von Zellen ohne diese notwendigerweise zu fixieren. Die Methode erlaubt unter Verwendung spezifischer Farbstoffe eine zeitabhängige Messung der intrazellulären Calciumkonzentration, ihrer Distribution und Dynamik. Die nachfolgende Tabelle bietet eine Übersicht über die Unterschiede zwischen der Laser-Scanning-Mikroskopie und einer anderen üblichen Methoden der Calciummessung an Keratinozyten mittels Fluoreszenzfarbstoffen, der Durchflußzytometrie.

Tabelle 5: Vergleich zwischen Durchflußzytometrie und Laser Scanning Mikroskopie

| Durchflußzytometrie | Laser-Scanning-Mikroskopie |
|---|--|
| Große Anzahl von Zellen im Bereich 10^6 pro Versuch | Kleine Zahl von Zellen im Bereich 10^1 pro Versuch |
| Verwendung nichtadhärenter Zellen | Verwendung adhärenter Zellen |
| Messung zeitlicher Änderungen eines Parameters in einer Zellpopulation | Messung zeitlicher Änderungen eines Parameters in ein und derselben Zelle |
| Verwendung von Größe und Vitalfärbung zum Ausschluß von Artefakten (Zelltrümmer, Zellverbände, tote Zellen) | Direkte Betrachtung der Zellen- visueller Ausschluß von Zelltrümmern möglich, Vitalfärbung |
| | Gleichzeitige Beobachtung morphologischer Veränderungen einer bestimmten Zelle möglich |

2.3.5. Apoptose - Nekrose - Methoden der Differenzierung

Wie bereits im Kapitel 2.1.5 beschrieben, handelt es sich bei Apoptose und Nekrose um verschiedene Arten des Zelltodes. Auch über die Folgen beider Mechanismen für umliegende Zellen wurde berichtet. Wie ist es also möglich, in Experimenten den geordneten vom unkontrollierten Zelltod zu unterscheiden?

Die Apoptose ist ein aktiver Prozeß. Die Zelle hat Zeit, aufzuräumen und ihre Hinterlassenschaft zu ordnen: Sehr zeitig treten Membranveränderungen auf. So verliert die Zellmembran ihre innen-außen-Asymmetrie. Zuvor streng an der Innenseite der Membran lokalisiertes Phosphatidylserin liegt jetzt auch an der Außenseite vor. Eine weitere Membranveränderung im Lauf der Apoptose ist die Unterbrechung des transmembranösen Membranpotentials der Mitochondrien. Wasser strömt aus der Zelle aus, Zytoplasma und Kern schrumpfen (Kernpyknose). Es kommt zur Kondensation des Chromatins, zur Kernfragmentation und zur Bildung apoptotischer Körperchen. Viele dieser Apoptosemerkmale sind heute mit verschiedenen Mitteln nachweisbar, welche eine breite

experimentelle Anwendung erfahren (Reinartz et al. 1996, Zhang et al. 1997, Necchi 2000, Zhu et Wang 1997). Zum Nachweis von außengelegenem Phosphatidylserin liegt Annexin V-FITC vor. Annexine sind calciumabhängige phospholipidbindende Proteine, Annexin V hat dabei eine große Affinität zu Phosphatidylserin. In kovalenter Bindung des Annexins an FITC und mit Propidiumiodid als nicht membrangängiger Gegenfarbstoff gelingt eine differentielle Anfärbung apoptotischer und nekrotischer Zellen (Clontech Product Information 1996, Van Heerde et al. 2000, Li et Tait 1998).

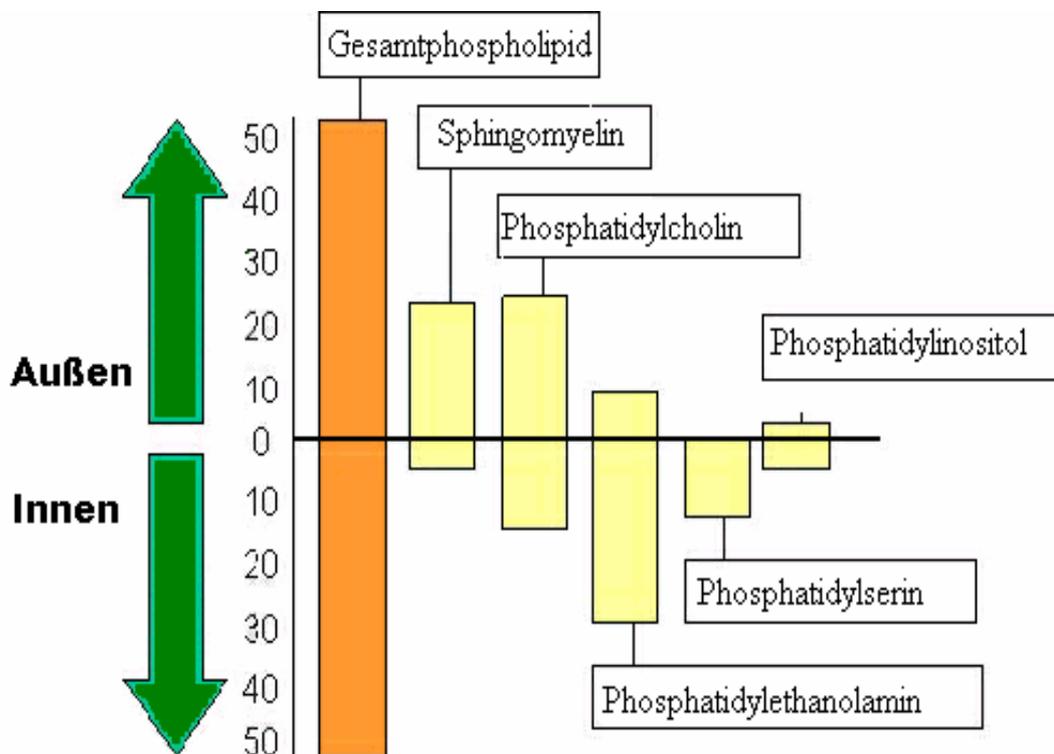


Abb. 11: Normale Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)



Normale Membran:

Phosphatidylserin ist nur an der Membraninnenseite



Zellmembran nach Beginn der Apoptose:

Phosphatidylserin gelangt jetzt auch an die Membranaußenseite



Apoptosedetektion:

Außengelegenes Phosphatidylserin wird mittels Annexin-FITC nachgewiesen



Abb.12: Phosphatidylserin ist bei gesunden Zellen streng an der Membraninnenseite lokalisiert. Bei Apoptosebeginn wird dieser Zustand nicht mehr aufrecht erhalten. Phosphatidylserin liegt jetzt auch an der Außenseite vor und kann durch Annexin V, ein phospholipidbindendes Protein mit großer Affinität zu Phosphatidylserin, gebunden werden. Zur Visualisierung dieser Bindung nutzt man fluoreszenzgekoppeltes Annexin V. (aus: siehe Quellennachweis der Abb.)

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose bildet die Messung der Kerngröße. Während es bei der Nekrose zur Kernschwellung und damit Kernvergrößerung kommt, läßt sich bei der Apoptose die Abnahme des Kernvolumens als typische Veränderung feststellen. Hierbei stellen Kernfarbstoffe wie zum Beispiel HOECHST 33342 durch Anfärbung des Chromatins ein verläßliches Mittel dar.

Zum Nachweis der mitochondrialen Veränderungen, der DNA-Degeneration sowie für zahlreiche bei der Apoptose gebildete Enzyme stehen Nachweismethoden, meist in Form spezifischer Antikörper, zur Verfügung.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

Verwendet wurden Keratinozyten der Linie HaCaT (**H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature). Diese Zelllinie entstammt einem Operationspräparat der Rückenhaut eines 62jährigen Mannes und wurde aus dem Sicherheitsabstand eines malignen Melanoms entnommen (Boukamp et al. 1988, vgl. 2.1.4.).

Die Zellen wurden in Keratinozyten SFM (Serum Free Media) unter Supplementierung mit 0.1-0.2 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) und 25µg/ml bovinem Hypophysenextrakt gezüchtet. Als antibiotischer Zusatz wurden 100U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin verwendet.

Nach einer Einsaat von einer Million Zellen pro Kulturflasche (20ml) wurden die Keratinozyten in 37°C und 10% Kohlendioxid für sieben Tage inkubiert, um dann ausgedünnt und in neue Kulturgefäße überführt zu werden. Für die Versuche wurden Zellen der 22. bis 35. Passage benutzt.

3.2. Herstellung der Effektorlösungen

Von den verwendeten Fettsäuren und Ölen (Arachidonsäure, Linolsäure, Ölsäure, Palmitinsäure, Myristinsäure, Laurinsäure, Stearinsäure, physiologische Fettsäuremischung, Olivenöl, Hanföl, Avocadoöl, Klettenöl und Nachtkerzenöl) wurden Stammlösungen in 96% Ethanol hergestellt, die für die Versuche in Medium (HBS- **H**epes **B**uffered **S**aline, Gläßer et al. 1986) weiter verdünnt wurden. Die maximale Ethanolkonzentration im Medium betrug 2,5%. Parallel durchgeführte Kontrollen zeigten, daß diese Ethanolkonzentration keinen Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration hatte.

Vor Versuchsbeginn wurden die Fettsäurelösungen im Ultraschallbad behandelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Vergleichsversuche erfolgten mit Zusatz von BSA (**B**ovine **S**erum **A**lbumin).

3.3. LSM

Wir benutzten das Laser Scan Mikroskop LSM 410. Das Gerät ermöglicht sowohl die konventionelle als auch die konfokalen Laser Scan Mikroskopie. Im Rahmen der konventionellen Mikroskopie kommen neben der einfachen Durchlichtmikroskopie auch die üblichen Kontrastverfahren wie Hellfeld, Dunkelfeld, differentieller Interferenzkontrast,

Phasenkontrast, Fluoreszenz und Polarisation zur Anwendung. Im Konfokalmodus werden Fluoreszenz oder Reflexion von Objekten im Auflicht dargestellt.

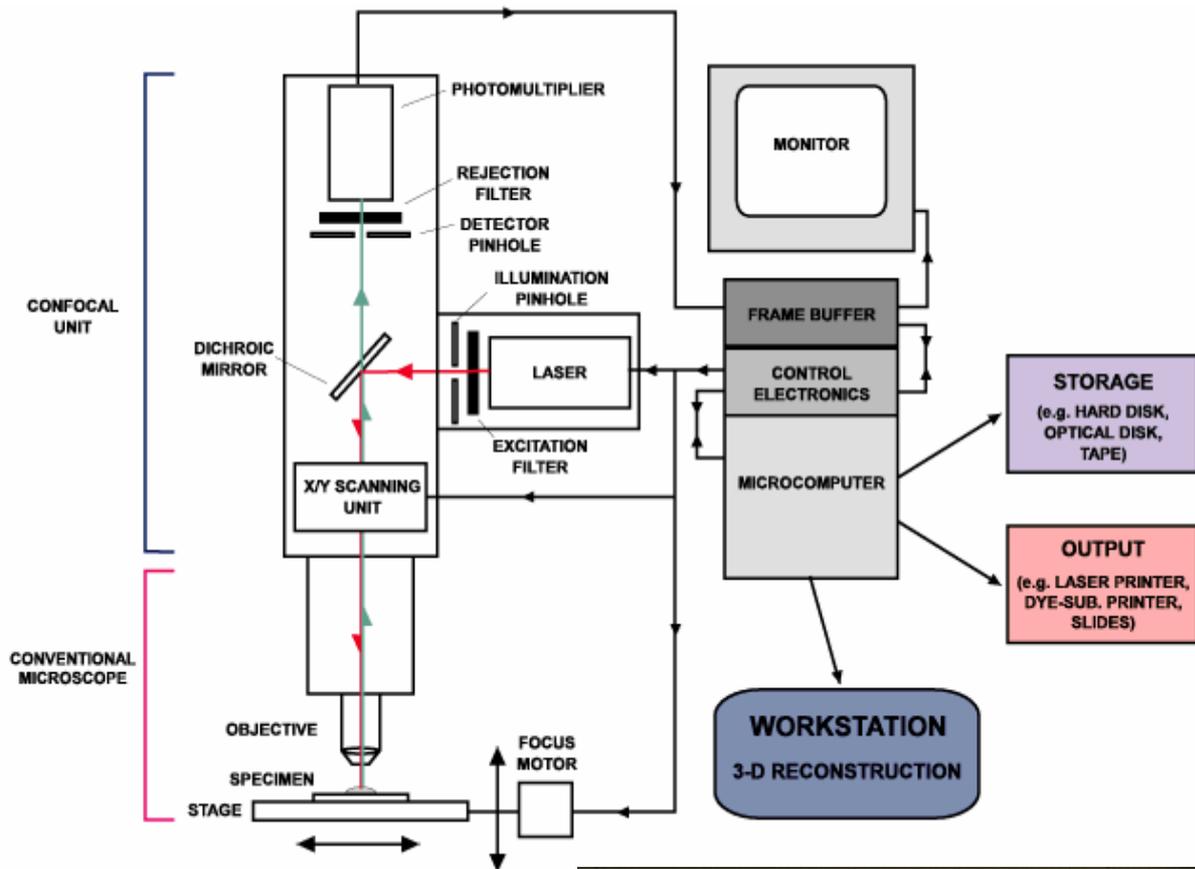
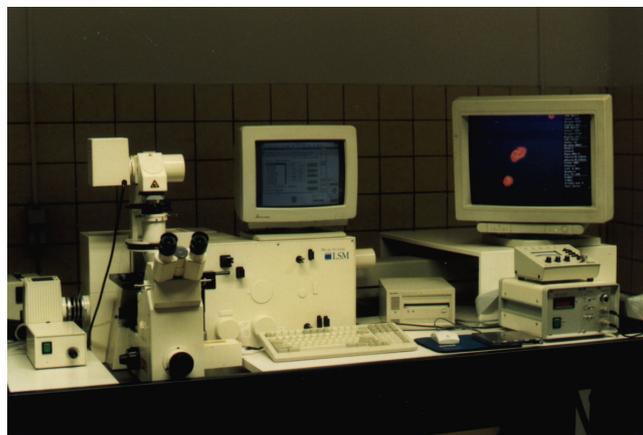


Abb.13: Prinzipskizze eines LSM nach Ladic 2002 (aus: siehe Quellennachweis der Abb.) und Foto des benutzten Systems



Zur Anregung standen drei verschiedene Laser; ein externer Argon-UV- Laser mit einer Emissionswellenlänge von 364nm, ein interner Argon-Laser der Wellenlänge 488nm und 514nm sowie ein interner Helium/Neon-Laser mit einer Emission bei 543nm zur Verfügung. Das System ermöglicht dabei eine Simultananregung mit bis zu drei Wellenlängen.

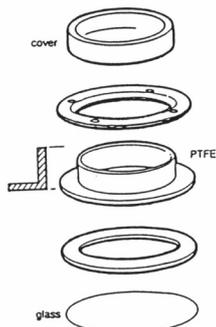
Die selektive Detektion des vom Objekt emittierten Lichts (Fluoreszenz/ Reflexion) wurde durch verschiedene Strahlenteiler und Filter realisiert. Das Prinzip des Strahlenteilers beruht auf einer Trennung der Wellenlängen, die sehr nahe an der Wellenlänge des verwendeten

Lasers liegen, und somit zu einer artefiziellen Überstrahlung führen könnten. Dabei bewirkt zum Beispiel der dichroitische Strahlenteiler FT 510 eine Trennung blauer und grüner Emissionen. Des Weiteren stellen Filter ein wirksames Mittel zur Minimierung störender Streustrahlung dar. So nutzten wir zum Beispiel den Bandpaßfilter BP 515-565 bei der simultanen Aufzeichnung von grün- und rot- Fluoreszenzen, Langpaßfilter, z.B. OG 550 zur Ausschaltung von Licht oberhalb einer Wellenlänge von 550 nm. Als Objektiv verwendeten wir das Ölimerensionsobjektiv Plan/ Neofluar 40x/1.3.

3.3.1. Vorbereitung der Zellen

Für die Messungen am LSM wurden 100 000 Keratinozyten auf Deckgläser in Petrischalen eingesät. Nach einer Kultivierung im Normalmedium (SFM, siehe oben) für zwei bis sieben Tage (in der Regel drei Tage, Abweichungen wurden gekennzeichnet) wurde das Kulturmedium entfernt und die adhärennten Zellen mit HBS gewaschen und überschichtet.

Die Keratinozyten wurden je nach Fragestellung gefärbt (siehe unten) und in eine POC-Kammer (Perfusion, Open and Closed Cultivation) eingespannt.



Angestrebt wurde die Messung kleinerer Zellcluster, bestehend aus weniger als zehn Zellen.

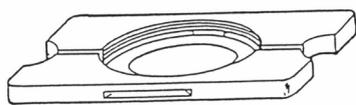


Abb.14: POC-Kammer: Die auf runden Deckgläsern gezüchteten Zellen werden vor Versuchsbeginn in die Kammer eingespannt. durch das dünne Glas und dadurch mögliche große Annäherung zwischen Objektiv und Objekt wird eine gute Fluoreszenzausbeute erreicht. (Quelle siehe Quellennachweis der Abb.)

3.3.2. Morphologie subkultivierter HaCaT Zellen

Zum Studium der Morphologie der HaCaT Zellen dienten Durchlichtaufnahmen der ungefärbten Zellen sowie Anfärbungen mit dem Farbstoff Calcium Green-AM- Ester, der aufgrund seines lipophilen Ankers externe Calciumionen in unmittelbarer Membrannähe detektiert. Die Zellen wurden für 10 min in Farbstoff angefärbt und dann für 10 min in HBS gewaschen. Die Anregung erfolgte hierbei mit einer Wellenlänge von 488nm, die Emission wurde bei 525nm detektiert.

3.3.3. Messung der Parinarsäureaufnahme

Die ungefärbten Zellen wurden mit einem UV-Laser ($\lambda=364\text{nm}$) angeregt, ihre Eigenfluoreszenz oberhalb 450nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge ist die Eigenfluoreszenz der Parinarsäure in hydrophober Umgebung (hier in Heptan) zirka viermal so stark wie in hydrophilem Lösungsmittel (Wasser) (Oberle et al. 1997). Dieser Umstand ermöglicht die Visualisierung des Übergangs von Parinarsäure von hydrophiler in hydrophobe Umgebung (Sklar et al. 1977) und damit am Modell Zelle die Aufnahme von Fettsäuren in Zellmembranen. Die Schnittebene lag dabei etwa in der Mitte der halbkugeligen Zellen. Nach zwei Minuten erfolgte die Zugabe der Parinarsäure. Die Änderung der Fluoreszenzintensität im Plasmalemm wie in Zellinnenmembranen wurden beobachtet. Gemessen wurde über 40min mit einem Abstand von 2min zwischen den Einzelscans (Oberle et al.1997).

3.3.4. Messung der Membranschädigung durch Fettsäuren mit Carboxyfluoreszein

Die Zellen wurden mit Cell Tracker Orange für 15min in einer Konzentration von 1mM unter Lichtabschluß in HBS inkubiert und dann in HBS gewaschen. Die Messung folgte nach Wechsel zu 6-Carboxyfluoreszein-haltigem Außenmedium. Die Anregung erfolgte bei 488nm, die Emission wurde bei $>540\text{nm}$ gemessen. Linolsäure wurde für eine Endkonzentration von $42,5\mu\text{M}$ 10min nach Versuchsbeginn zugegeben.

3.3.5. Messung des intrazellulären pH Wertes

Zur Messung des intrazellulären pH-Wertes wurden die Keratinozyten nach dem Waschen in HBS zuerst für 10min in SNARF-1-AM-Ester im Dunklen inkubiert, dann für 10min in HBS gewaschen. Die Messungen am LSM erfolgten bei einer Exzitation mit 488nm und einer Emission bei 660nm.

3.3.6. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Um die intrazelluläre Calciumkonzentration vitaler Keratinozyten zu bestimmen, verwendeten wir die Farbstoffe Fluo-3 und Fura-Red. Beide ermöglichen bei einer Exzitation mit 488nm eine Messung der Emission im Bereich des sichtbaren Lichts. Der große Stokes Shift erlaubt eine überlagerungsarme simultane Emissionsmessung bei 525nm (vorwiegend Fluo-3) und 660nm (vorwiegend Fura-Red).

Um Artefakte wie Ungleichverteilung und Bleaching der Fluoreszenzindikatoren als Fehlerquelle auszuschalten, bedienen wir uns des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten (Lipp et Niggli, 1993):

$$F[\textit{Quotient}] = F[525\textit{nm}] / F[660\textit{nm}]$$

Die Zellen wurden in Färbepuffer (HBS mit 2µM Fura-Red, 1µM Fluo3 und 3µl Pluronic 20% in DMSO) für 45min bei 37°C inkubiert, mit HBS gewaschen und dann 15min in HBS inkubiert. Die Messungen erfolgten bei obengenannten Wellenlängen am LSM.

3.3.7. Bestimmung der Kernretraktion mittels HOECHST 33342

Die Keratinozyten wurden auf Deckgläsern ausgesät und in HBS überführt. Jetzt erfolgte eine Vitalfärbung mit HOECHST 33342. Nach einer Inkubationszeit von 10min unter Lichtabschluß wurden die Zellen weitere 10min in HBS gewaschen und dann in Anlehnung an die Calciumfärbungen über 90min am LSM beobachtet. Die Applikation der Fettsäure erfolgte 10min nach Versuchsbeginn (Glanz et al. 1997).

3.3.8. Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose mittels Annexin-FITC Bindung

Im Gegensatz zu den Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration stellt die Detektion von Apoptose mittels Bindung von Annexin-FITC an Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran eine Untersuchung an toten Zellen dar. Für diese Experimente wurden die vitalen Keratinozyten für 1h mit der Effektorlösung inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation in HBS mit 2,5% Alkohol.

Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS (**Phosphate Buffered Saline**) gewaschen und dann in der POC-Kammer mit 400µl Bindungspuffer, 10µl Annexin V-FITC (20µg/ml) und 20µl Propidiumiodid (25µg/ml) für 15min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation hiermit ist so zytotoxisch, daß man im Folgenden von der Messung an toten Zellen ausgeht. Die Zellen wurden erneut in PBS gewaschen und dann am LSM vermessen (Exzitation bei 488nm, Emissionsmessung bei 525 und 660nm).

3.3.9. Bestimmung der Zellvitalität mit Trypanblau

Nach Versuchsende der Messung von intrazellulärer Calciumkonzentration oder des pH-Wertes wurden die zuvor beobachteten Zellen mit Trypanblau 1% angefärbt, um vitale von toten Zellen unterscheiden zu können (Benassi et al. 1997, Grando et al. 1996).

3.3.10. Langzeitinkubationen von Keratinozyten mit freien Fettsäuren

Nichtadhärente Keratinozyten in einer Zelldichte von 20.000/ml wurden in Chamber Slides mit 8 Kammern einer Kantenlänge von 5mm entsprechend einer Zellzahl von 5000 pro Well eingesät. Am dritten beziehungsweise siebenten Tag nach Einsaat erfolgte eine Dauerinkubation mit Effektorlösung (als Kontrolle mit Alkohol 2,5%) in Kulturmedium. Hierzu wurde analog zu den Inkubationen in HBS eine Stammlösung in Kulturmedium verdünnt. Die Zellen wurden bei Versuchsbeginn (Zugabe der Effektorlösung), nach einer, zwei, vier, acht, 24, 48 und 72h im Phasenkontrastmikroskop begutachtet und fotografiert. Es wurden die relative Zelldichte und die Morphologie der Keratinozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe beurteilt.

3.5. Lipidextraktionen

3.5.1. Lipidextraktion nach Inkubation mit ¹⁴C-markierter Palmitinsäure

Zur Lipidextraktion wurden adhärente Keratinozyten mit 10 µM ¹⁴C-Palmitinsäure 10, 30, 60min, 2, 4 und 24h in Kulturmedium (Keratinozytenmedium, serumfrei) inkubiert. Dabei entsprach die Radioaktivität 0,5µCi pro Ansatz, also 3µCi pro Versuch. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Lipide mit iso-Propanol/n-Hexan 2:3 herausgelöst. Das Lösungsmittel wurde unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand in 50µl Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen.

3.5.2. Lipidextraktion nach Inkubation mit unmarkierter Palmitinsäure

Analog zur in 3.5.1. beschriebenen Lipidextraktion wurden die Keratinozyten mit 10µM Palmitinsäure in serumfreiem Medium für 60min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 10%igem Trypsin abgelöst und die Trypsinierung durch Zugabe

von mit BSA versetztem Kulturmedium beendet. Die Zellsuspension wurde bei 5000*g zentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert und das Pellet zur Lipidextraktion mit Isopropanol/n-Hexan versetzt. Das Extrakt wurde unter Stickstoff eingedampft und in Chloroform/Methanol aufgenommen.

3.5.3. Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden MTPLC-Fertigplatten (Kieselgel 40W). Das Extrakt wurde mittels Dünnschichtchromatographie mit Chloroform/Methanol/Wasser 60:35:8 mit 0,2% Calciumchlorid im Wasseranteil als Laufmittel aufgetrennt. Die radioaktiven Lipide wurden durch Autoradiographie (Expositionszeit eine Woche) nachgewiesen. Bei der Versuchsanordnung mit unmarkierter Fettsäure wurden die Banden in der Iodkammer sichtbar gemacht und direkt weiterverarbeitet. Außerdem wurden ausgewählte Substanzen des Fettsäurestoffwechsels als Standards aufgetragen. Wir verwendeten hierbei Stearinsäure, Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol. Die Laufmittelfront wurde ausgekratzt, mit Chloroform/Methanol extrahiert und erneut auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Laufmittel war in diesem Fall iso-Propanol/n-Hexan 2:3.

Zur dauerhaften Detektion der Banden bei den Versuchen mit unmarkierter Palmitinsäure wurde Phosphomolybdänsäure-Sprühreagenz (2,5% Phosphomolybdänsäure und 1% Cersulfat in 12%iger Schwefelsäure) genutzt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Kamera-Video-Computereinheit unter Verwendung des Programms BASys 1D nach Helligkeitskriterien.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Calciumfluoreszenzmessungen erfolgte mittels mehrfaktorieller einseitiger Varianzanalyse. Hierbei wurden Mittelwerte aus jeweils mehreren Zellen in mehreren Versuchen (genaue Angaben bei den jeweiligen Abbildungen) verglichen. Das α -Niveau wurde auf 0,05 festgelegt.

Für die Versuche zur Apoptosedetektion mittels Annexin-V-FITC-Bindung wurden Häufigkeitsvergleiche mit χ^2 -Tests für k-fach gestufte Merkmale angewandt.

Die Signifikanzprüfung bei den Kernpyknoseuntersuchungen beruht auf Ausgangs- und Endwertmittelwertvergleichen mittels t-Test für abhängige Stichproben.

3.7. Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien

| 3.7.1. Chemikalien | Hersteller |
|---|--|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| FCS (FetalCalf Serum) | C. C. Pro, Karlsruhe, BRD |
| Keratinocyten SFM (Serumfreies Medium), | GIBCO Life Technologies, Eggenstein, BRD |
| Zusätze zu Keratinocyten SFM | GIBCO Life Technologies, Eggenstein, BRD |
| Penicillin | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Streptomycin | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| BSA (Bovine Serum Albumin) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Trypsin | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetic acid) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| EGTA(Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Pluronic F 127 | Calbiochem-Novabiochem Bad Soden, BRD |
| Fluo3-AM | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Fura-Red-AM | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Calcium Green-AM | Molecular Probes, Eugene, USA |
| SNARF 1-AM | Molecular Probes, Eugene, USA |
| 6-Carboxyfluoreszein | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| HOECHST 33342 | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Trypan Blau | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit | Clontech, Palo Alto, USA |
| Cell Tracker Orange | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Parinarsäure (cis- und trans-) | MOBITECH, Göttingen, BRD |
| Fettsäuren (Myristin-, Laurin-, Stearin-, Palmitin-, Öl, Linol- und Arachidonsäure) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| 14-C-Palmitinsäure | NEN, Köln, BRD |
| Avocadoöl | Bombastus, Freital, BRD |
| Hanföl | Korena, Kroppenstedt, BRD |
| Olivenöl | Luccese, San Alessio, Italien |
| Nachtkerzenöl | Kattus, Maisach, BRD |
| Leinöl | Kunella, Cottbus, BRD |
| Klettenöl | Prof. Aizetmüller, Bundesanstalt für Getreide-Kartoffel- und Fettforschung/ Institut für Chemie und Physik der Fette, Münster, BRD |
| Phosphatidylcholin, Lysophosphatidylcholin, Phosphatidsäure, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| ATP (Adenosinriphosphat) | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Digitonin | Molecular Probes, Eugene, USA |

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| CCCP | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| C2-Ceramid | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| Ionomycin | SIGMA, Deisenhofen, BRD |
| A23187 (Calcimycin) | Molecular Probes, Eugene, USA |
| Alle anderen Chemikalien | SIGMA, Deisenhofen, BRD |

| 3.7.2. Geräte und Hilfsmittel | |
|--|-------------------------------|
| LSM 410 invert | Zeiss, Oberkochen, BRD |
| Ölimersionsobjektiv Plan/ Neofluar 40x/1.3 | Zeiss, Jena, BRD |
| POC-Kammer | Bachhofer, Reutlingen, BRD |
| Brutschrank | WTB Binder, Tuttlingen, BRD |
| Brutschrank | VEB Labortechnik Ilmenau, DDR |
| BASys 1D | Signum Computer GmbH, BRD |
| SPSS 10.0 für Windows | SPSS Inc., USA |
| Office 97 | Microsoft Inc., USA |
| Chamber Slides 2x4 | Bachhofer, Reutlingen, BRD |
| Deckgläser | Bachhofer, Reutlingen, BRD |
| MTPLC-Platten Kieselgel 40W | Merck, Darmstadt, BRD |
| Kulturflaschen | Greiner, Frickenhausen, BRD |

| 3.7.3. Zusammensetzung verwendeter Pufferlösungen | |
|--|--|
| PBS (Phosphate Buffered Saline) | 58mM Natriumhydrogenphosphat 17mM Natriumdihydrogenphosphat 68mM Natriumchlorid pH=7,4 |
| HBS (HEPES buffered saline) nach Gläber et al. 1986 | 5mM Glucose 140mM Natriumchlorid 5mM Kaliumchlorid 0,2mM EDTA 1mM Calciumionen 1mM Magnesiumionen 5mM HEPES 200.000 IU/l Penicillin G pH=7,4 |

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Untersuchungen zur Aufnahme von Fettsäuren in Zellen unter Verwendung von Parinarsäure als Modellschubstanz

Um festzustellen, wie freie Fettsäuren in Keratinozyten aufgenommen werden, setzten wir Parinarsäure ein. Diese besitzt eine Eigenfluoreszenz, die in hydrophober Umgebung um ein Vielfaches stärker ist, als in hydrophiler und ist daher als Modellschubstanz zur Darstellung des Überganges von Fettsäuren von hydrophiler in hydrophobe Umgebung geeignet (Sklar et al. 1977). Voruntersuchungen waren an Liposomen erfolgt (Oberle et al. 1997). In Zellen stellen Membranen die überwiegenden hydrophoben Bestandteile dar. Bei der Untersuchung am LSM konnte man hierbei zwischen Plasmalemm und intrazellulären Membranen differenzieren. Überlagerungen mußten jedoch in Kauf genommen werden, da die Fluoreszenzausbeute für Schichtbildaufnahmen mit geringer Schichtdicke nicht ausreichte.

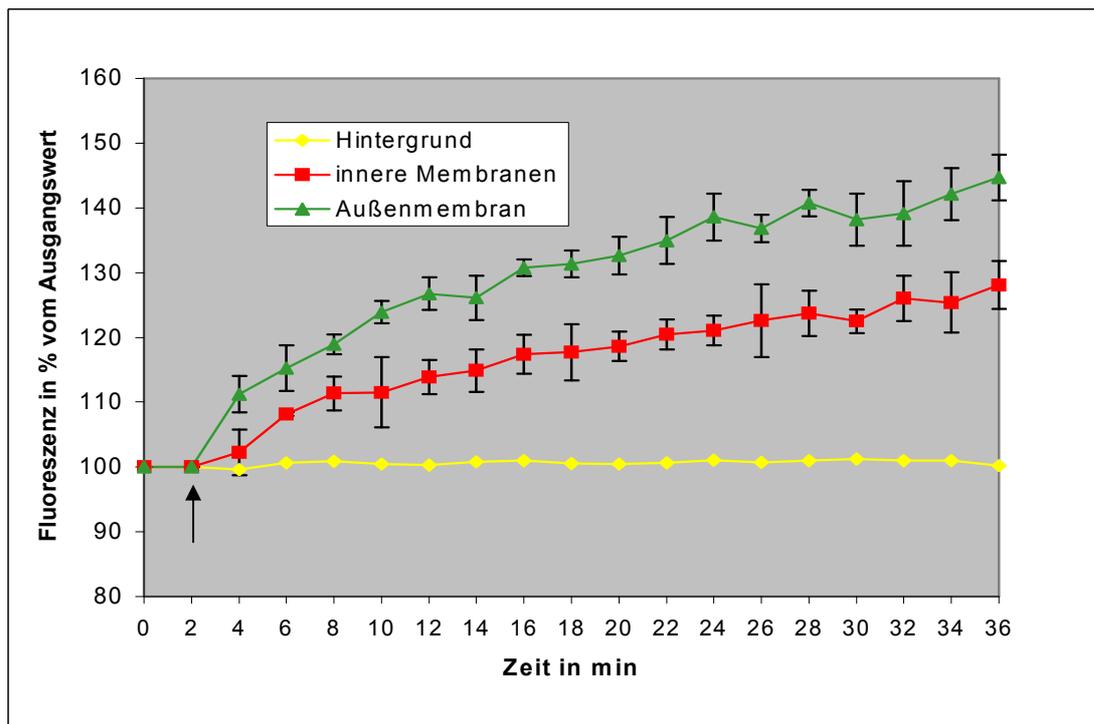


Abb.15a: Diagramm zur Aufnahme von *cis*-Parinarsäure. Dargestellt ist ein Einzelversuch mit Mittelwert bei Messung an sechs Zellen mit Standardabweichung unter Standardbedingungen (20°C, HBS-Medium), Exzitation bei 364nm, Detektion bei >450nm. Fluoreszenz in Prozent vom Ausgangswert (Eigenfluoreszenz der Keratinozyten) Zugabe von *cis*-Parinarsäure- Endkonzentration 100µM (Pfeil).

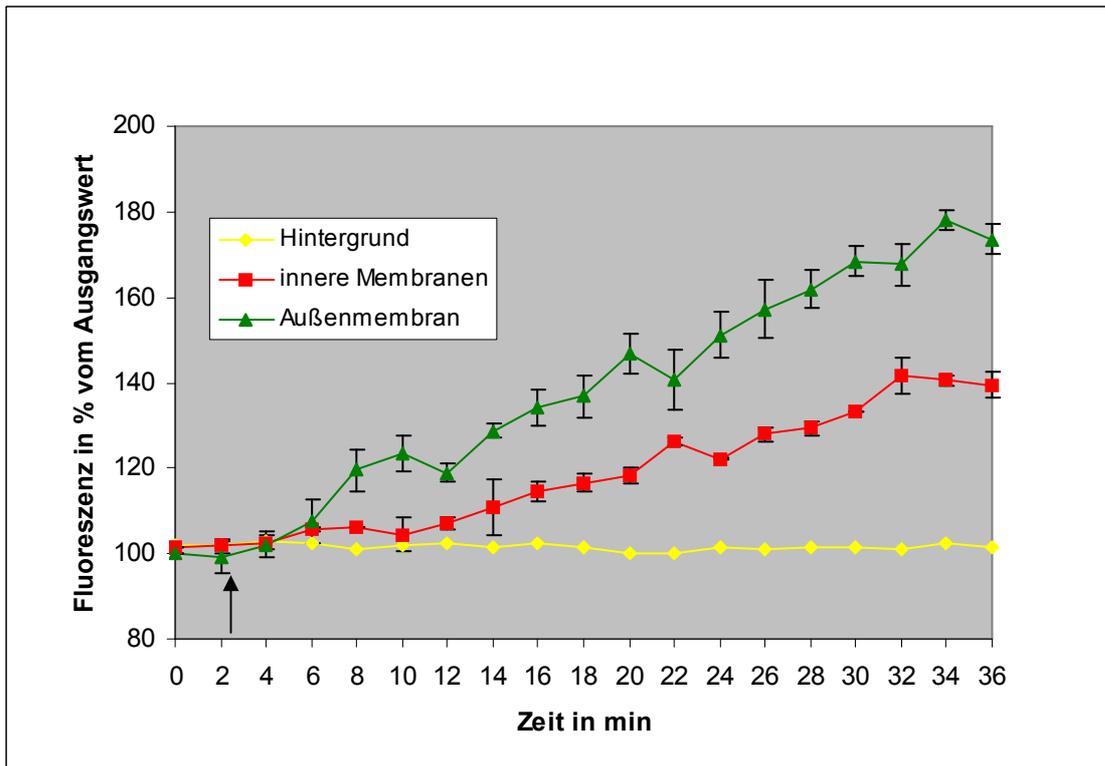


Abb.15b: Diagramm zur Aufnahme von trans-Parinarsäure. Gezeigt ist ein Einzelversuch mit Mittelwert bei Messung an fünf Zellen und Standardabweichung unter Standardbedingungen (siehe 15a), Zugabe von trans-Parinarsäure-Endkonzentration $100\mu\text{M}$ (Pfeil).

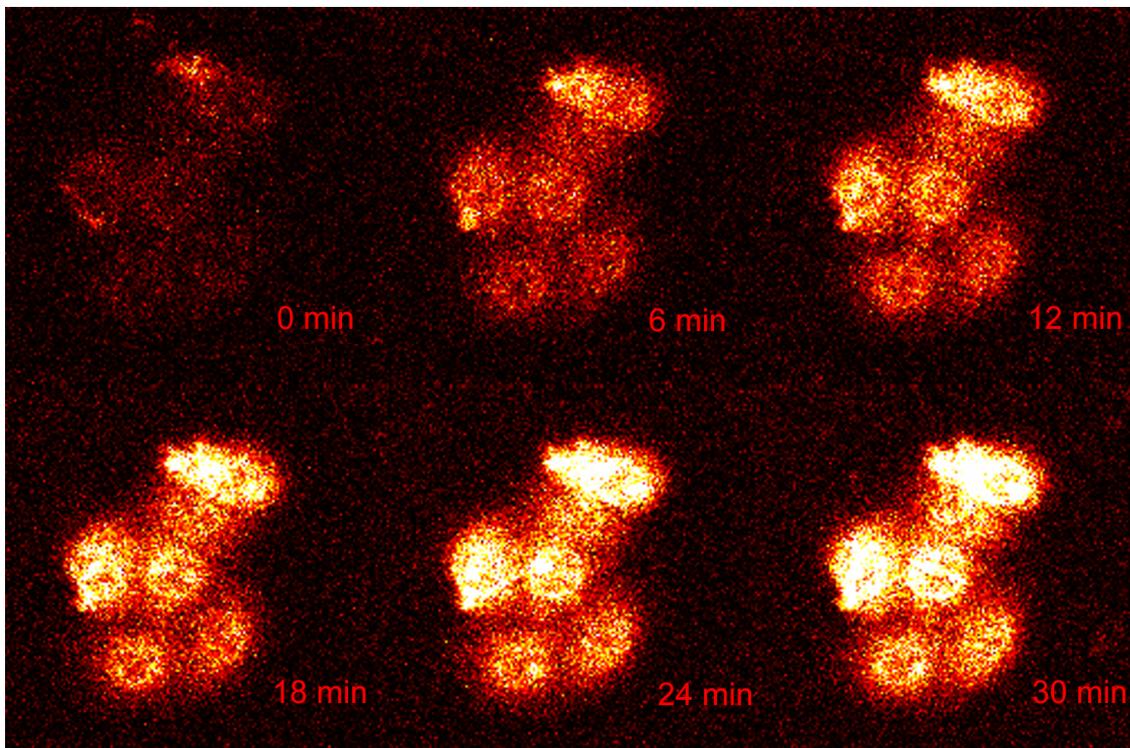


Abb.15c: Zeitlicher Verlauf der Parinarsäureaufnahme: Das erste Bild zeigt die Eigenfluoreszenz der Keratinozyten, danach wurde cis-Parinarsäure (Endkonzentration $100\mu\text{M}$) zugegeben. Die weiteren Bilder sind im Abstand von jeweils sechs Minuten aufgenommen.

In den Diagrammen (Abb.15a und b) und im Bild (Abb. 15c) sind entsprechende Versuche dargestellt. Die Fluoreszenzzunahme ist ein Maß für den Übergang der Parinarsäure in hydrophobe Umgebung, also in der Hauptsache in Membranen. Erwartungsgemäß kam es zu einem schnelleren und stärkeren Anstieg der Fluoreszenz im Plasmalemm und zeitlich versetzt zu einer Fluoreszenzzunahme in Zellinnenmembranen. Dabei bestand eine Überlagerung der Zellinnenmembranen durch das Plasmalemm. Die höhere Fluoreszenzzunahme in der Zellmembran kann verschiedene Ursachen haben: zum Einen ergibt sich aus der Tatsache, daß nur Parinarsäure, die vorher die Zellmembran passiert hat, in Membranen in intrazelluläre Membranen umverteilt werden kann, ein Konzentrationsgefälle. Dabei ist die Konzentration im Medium zumindest anfangs weit höher, als die im Zytosol. Zum Zweiten kann die Fluoreszenzintensität durch die Überlagerung durch Zytoplasma (Filterwirkung) abgeschwächt sein. Eine im Vergleich sehr geringe Fluoreszenzzunahme im Zytosol und im Karyoplasma ist durch die Fluoreszenz von Parinarsäure bei Bindung an FABP's (fatty acid binding proteins) zu erwarten (Tan et al. 2002).

In den gezeigten (Abb. 15a und b) wie in weiteren durchgeführten Versuchen unterschied sich die Aufnahme von *cis*- und *trans*- konfiguriertes Parinarsäure wenig. Tendenziell wurde *trans*-Parinarsäure besser aufgenommen. Entsprechende Versuche müßten, um verlässlichere Daten zu erheben, jedoch an größeren Zellpopulationen, eventuell mit einer anderen Methode, wie zum Beispiel der Durchflußzytometrie, verifiziert werden. Grundsätzlich erscheint eine bevorzugte Aufnahme von *trans*-Parinarsäure wegen ihrer gestreckten Form jedoch, zumindest was den passiven Transport angeht, wahrscheinlicher. Im Diagramm (Abb. 15a) kommt es nach einem initial stärkeren Anstieg zu einer Verringerung der Fluoreszenzzunahme. Es bliebe zu klären, ob dies der Annäherung an eine Sättigung entspricht oder ob eine verminderte Konzentration der Parinarsäure im umgebenden Medium (durch Zerfall und/ oder eine Präzipitation größerer Aggregate) dies bewirkt. Eine Verstoffwechslung ist im Beobachtungszeitraum nicht in nennenswertem Umfang zu erwarten (Huang et al. 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Aufnahme von Parinarsäure als Modellfettsäure ein schneller Prozeß ist, wobei eine verlässliche Aussage zur Bevorzugung einer der Konfigurationen weiterer Untersuchungen bedarf. In jedem Fall wird die Parinarsäure zunächst in das Plasmalemm aufgenommen und dann auf intrazelluläre Membranen umverteilt. Eine genaue Zuordnung zu bestimmten Zellkompartimenten ist nicht möglich, es scheint jedoch eine Anreicherung in Zellmembran und perinukleären Membranen und Kernmembran zu geben.

4.2. Zeitabhängiger Umbau applizierter freier Palmitinsäure in HaCaT- Zellen

In den theoretischen Grundlagen wurde auf eine Eigenschaft der Parinarsäure hingewiesen, die für die Aufnahmeversuche von Vorteil war: sie wird von der Zelle kaum abgebaut oder anderweitig in ihrer chemischen Struktur verändert (Huang et al. 2002). Was also passiert mit den Fettsäuren, die die Zelle verarbeiten kann?

Hierzu inkubierten wir HaCaT- Zellen mit ^{14}C -Palmitinsäure und trennten die extrahierten Lipide dünnschichtchromatographisch auf. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographien (siehe Abb. 16).

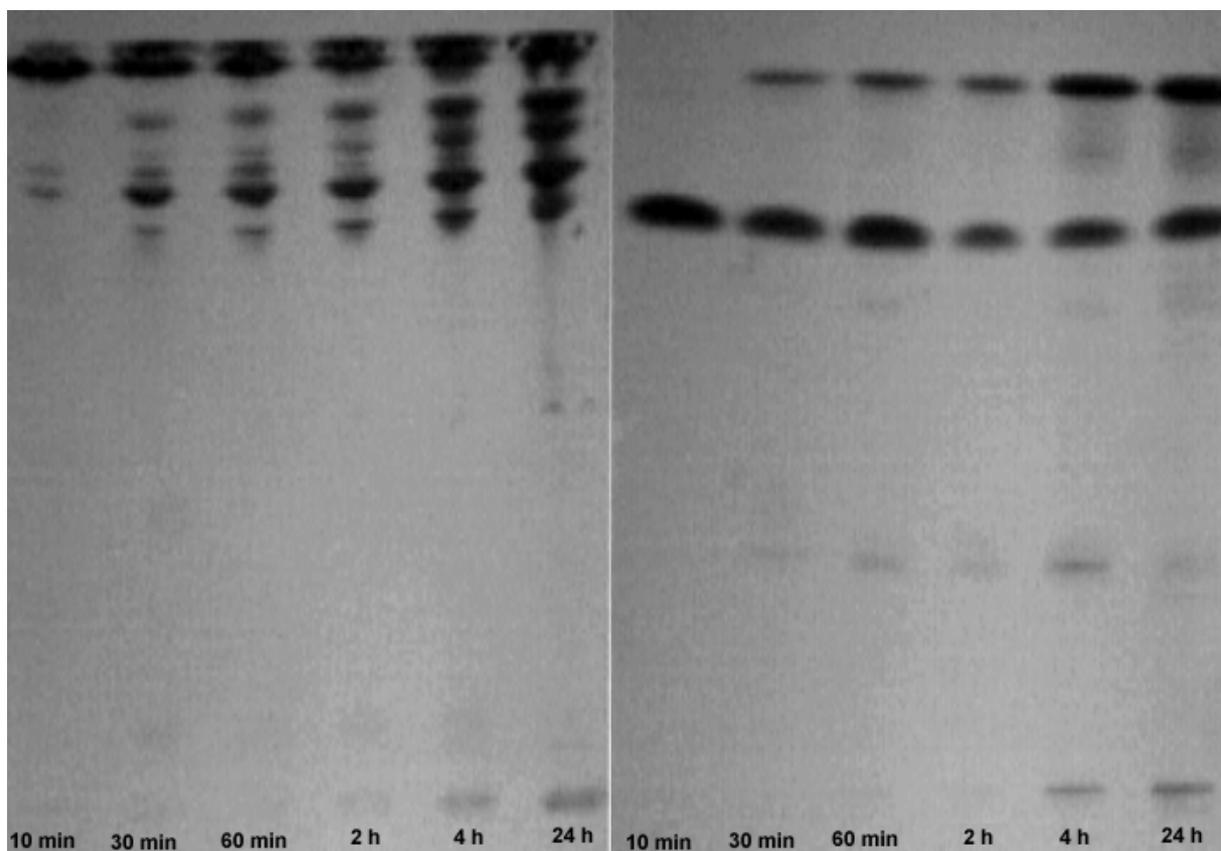


Abb.16a

Abb.16b

Abb.16: Radiographien: Keratinozyten in Normalmedium wurden mit ^{14}C -markierter Palmitinsäure ($10\mu\text{M}$, à $0,5\mu\text{Ci}$, 37°C) inkubiert. Die Inkubation wurde (in jeder Radiographie Säulen von links nach rechts) nach 10min, 30min, 60min, 2h, 4h, 24h abgebrochen, die Lipide wurden extrahiert und auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Zunächst erfolgte eine Auftrennung in Chloroform/Methanol/Wasser als polarem Laufmittel (Abb. 16a), anschließend wurden die Laufmittelfront und die oberste Bande (Iodkammer) ausgekratzt und unter Verwendung von iso-Propanol/n-Hexan als unpolarem Laufmittel erneut aufgetrennt (Abb. 16b.). Die Inkubationen wurden bei 37°C , Extraktion und Dünnschichtchromatographie bei 22°C und Normaldruck durchgeführt.

Tabelle 8: Es sind die Rf-Werte der detektierten Banden und die Pixel pro Bande in der Radiographie als Maß für die aufgenommene Radioaktivität festgehalten. Die in der Spalte „Standards“ enthaltenen Lipide wurden als Standards in der Lipidextraktion mit nicht markierter Palmitinsäure aufgetragen und unter gleichen Bedingungen chromatographiert. Die Detektion erfolgte mit Phosphomolybdän-Sprühreagenz.

| Auftrennung in polarem Laufmittel (Chloroform/Methanol/Wasser) | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|------------|------------------------|
| Rf-Werte | 10min | 30min | 60min | 2h | 4h | 24h | Standards |
| 0,05 | | | | 303 | 363 | 396 | |
| 0,1 | 258 | 248 | 232 | | 276 | 192 | |
| 0,14 | | 399 | 537 | 737 | 451 | | |
| 0,28 | | 762 | | | | | |
| 0,5 | | | | | 525 | 324 | Lysophosphatidylcholin |
| 0,61 | | | | | | | Phosphatidylinositol |
| 0,66 | | | | | | | Phosphatidylcholin |
| 0,68 | | | | | | | Phosphatidsäure |
| 0,73 | 494 | 1245 | 1348 | 1341 | 1239 | 839 | |
| 0,77 | 799 | 1470 | 1664 | 1731 | 714 | 1404 | |
| 0,8 | 799 | 772 | | 577 | 1623 | 1595 | |
| 0,82 | | | | | 545 | | |
| 0,83 | 610 | 404 | 665 | 927 | 1373 | 1622 | |
| 0,87 | 305 | 714 | 986 | 1256 | 1304 | 1577 | |
| 0,931 | 2730 | 1684 | 1438 | 1812 | 1396 | 879 | |
| Auftrennung in unpolarem Laufmittel (iso-Propanol/n-Hexan) | | | | | | | |
| Rf-Werte | 10min | 30min | 60min | 2h | 4h | 24h | Standards |
| 0,08 | 88 | 422 | 661 | 684 | 1310 | 1430 | |
| 0,12 | | | | | | | Fettsäure |
| 0,165 | | | | | 378 | 686 | |
| 0,25 | 1458 | 1316 | 1539 | 1484 | 1102 | 1327 | |
| 0,35 | | | 46 | 60 | 35 | 191 | |
| 0,65 | | 41 | 140 | 119 | 239 | 113 | |
| 0,69 | | | | | | 138 | |
| 0,92 | | | | | 131 | 352 | |
| Summe der | 7541 | 9477 | 9256 | 11031 | 13004 | 13065 | |
| aufgenommenen | | | | | | | |
| Radioaktivität | | | | | | | |

Die Radiographien zeigen, daß die Palmitinsäure schon nach zehnminütiger Inkubationszeit zu einem erheblichen Teil von den Zellen verstoffwechselt wird. Die Palmitinsäure selbst entspricht wahrscheinlich der Bande bei Rf 0,25 in der Abb. 16b, da dies die Bande ohne zunehmende Tendenz über die Zeit im unpolaren Lösungsmittel ist, auch wenn sie nicht die

gleiche Laufstrecke wie in der unmarkierten Extraktion hat. Eine Zuordnung zu bestimmten Zelllipiden ist nicht möglich. Auch wenn der normale Gehalt an den unterschiedlichen Phospholipiden in Keratinozyten bekannt ist, so ist doch die Aufnahme applizierter Fettsäure in unterschiedliche Phospholipide so unterschiedlich, daß sich eine Zuordnung auch auf diesem Wege nicht treffen läßt (Shvedova et al. 2001). Anhand der Ergebnisse läßt sich aber aussagen, daß die Aufnahme und die Verstoffwechslung von Fettsäuren in den Keratinozyten ein schneller Prozeß ist, wobei die Menge der aufgenommenen Radioaktivität in mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt und in ihrer Summe nach 24h fast doppelt so hoch ist, wie nach 10 min. Ebenso nimmt die Zahl der Stoffwechselprodukte, die Radioaktivität enthalten, ständig zu, und zwar von 11 Banden nach zehnminütiger auf 20 abgrenzbare Banden bei 24stündiger Inkubation.

4.3. Membranschädigung durch freie ungesättigte Fettsäuren

In zahlreichen Versuchen besonders mit hohen Konzentrationen freier ungesättigter Fettsäuren konnten lichtmikroskopisch zunächst Vorwölbungen der Plasmamembran gesehen werden. Diese Protrusionen oder „blebs“ nahmen im Verlauf des jeweiligen Experimentes an Größe zu, oft konnte eine Membranruptur und ein Auslaufen des Zytoplasmas in die Umgebung beobachtet werden. Die beschriebenen Veränderungen traten regelmäßig bei hohen Konzentrationen (170 μ M) von Arachidonsäure und Linolsäure auf. 170 μ M Ölsäure sowie 42,5 μ M Linol- und Arachidonsäure führten zum Teil zu reversibler „bleb“-Bildung, in einigen Fällen aber auch zur Membranruptur. Die Einwirkzeit der genannten Fettsäuren, bevor es zum Auslaufen des Zytoplasmas kam, war hierbei variabel. Entsprechende Veränderungen traten meist später als 30 min nach Zugabe der Fettsäure auf, in Einzelfällen, besonders bei Inkubation mit hohen Konzentrationen von Arachidon- und Linolsäure jedoch auch schon nach zehnminütiger Inkubation. Die Abbildung 17 zeigt eine entsprechende Durchlichtaufnahme.

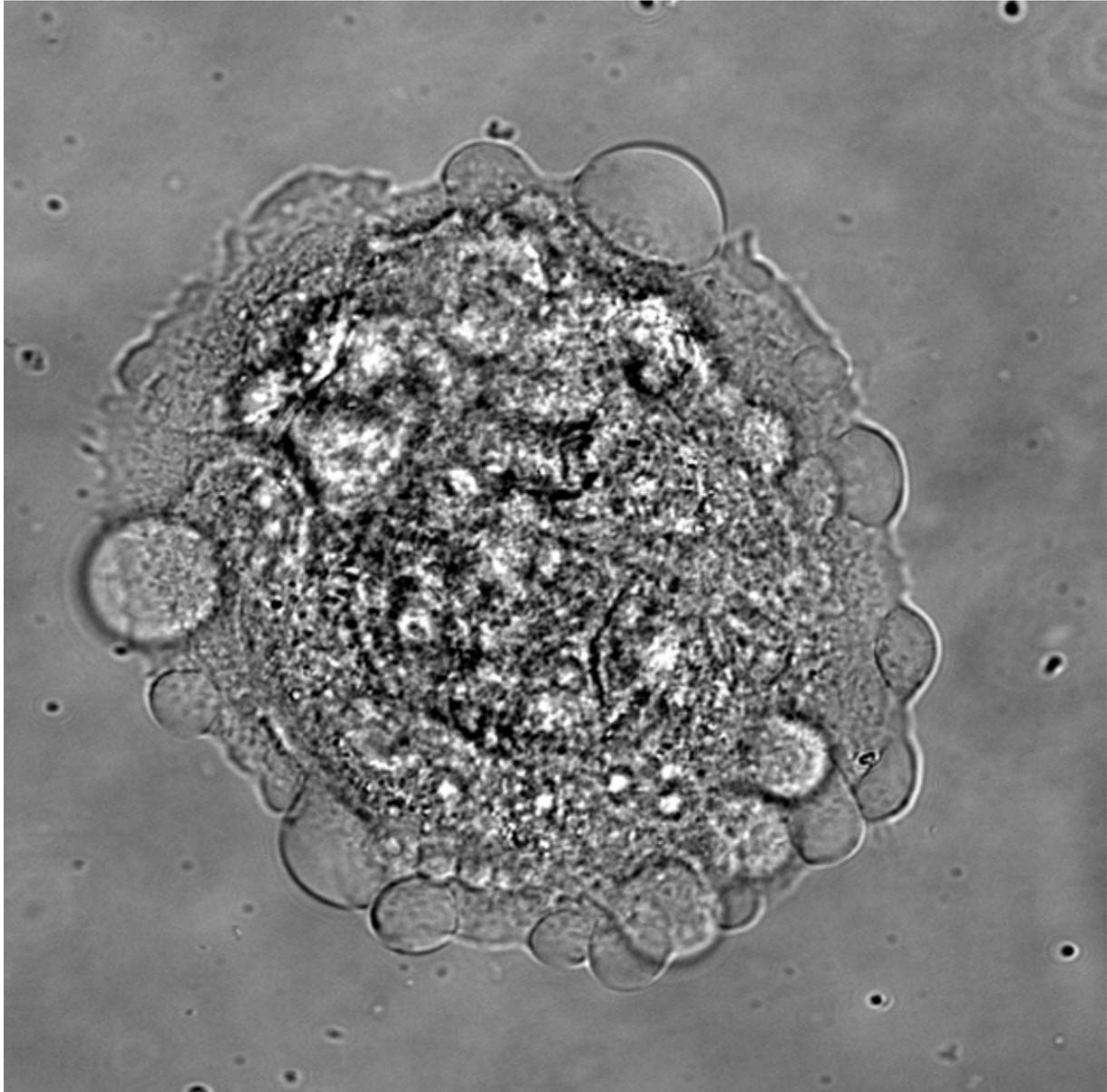


Abb.17: Auslaufen des Zytoplasmas: Zellcluster mit Zeichen schwerster Membranschädigung nach Inkubation mit Arachidonsäure $90\mu\text{M}$ über 45 min (22°C , HBS-Medium)

Weitere Versuche sollten klären, ob es neben lokaler Membranruptur auch zu Veränderungen der Membranpermeabilität für größere Moleküle kommt. Im Kapitel 2.3.2. wurden die theoretischen Grundlagen für die Versuche mit 6-Carboxyfluoreszein (6-CF) beschrieben. Nach Vorversuchen mit Linsenepithelzellen testeten wir die Methode an Keratinozyten. In Abbildung 18 ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität von Rhodamin (Cell Tracker Orange) bei Anregung des 6-Carboxyfluoreszeins, das sich zunächst nur im Außenmedium befand, dargestellt. Nach der Applikation der Linolsäure kam es zu einer deutlichen intrazellulären Fluoreszenzzunahme, die durch räumliche Annäherung der Fluorophore

Rhodamin und Fluoreszein, also durch das Eindringen von 6-CF in die Zellen zustandekommt. Für das 6-Carboxyfluoreszein ist kein Carrierprotein beschrieben, es liegt also nahe, daß das große, hydrophile 6-CF-Molekül über Membrandiskontinuitäten in die Zelle gelangt ist.

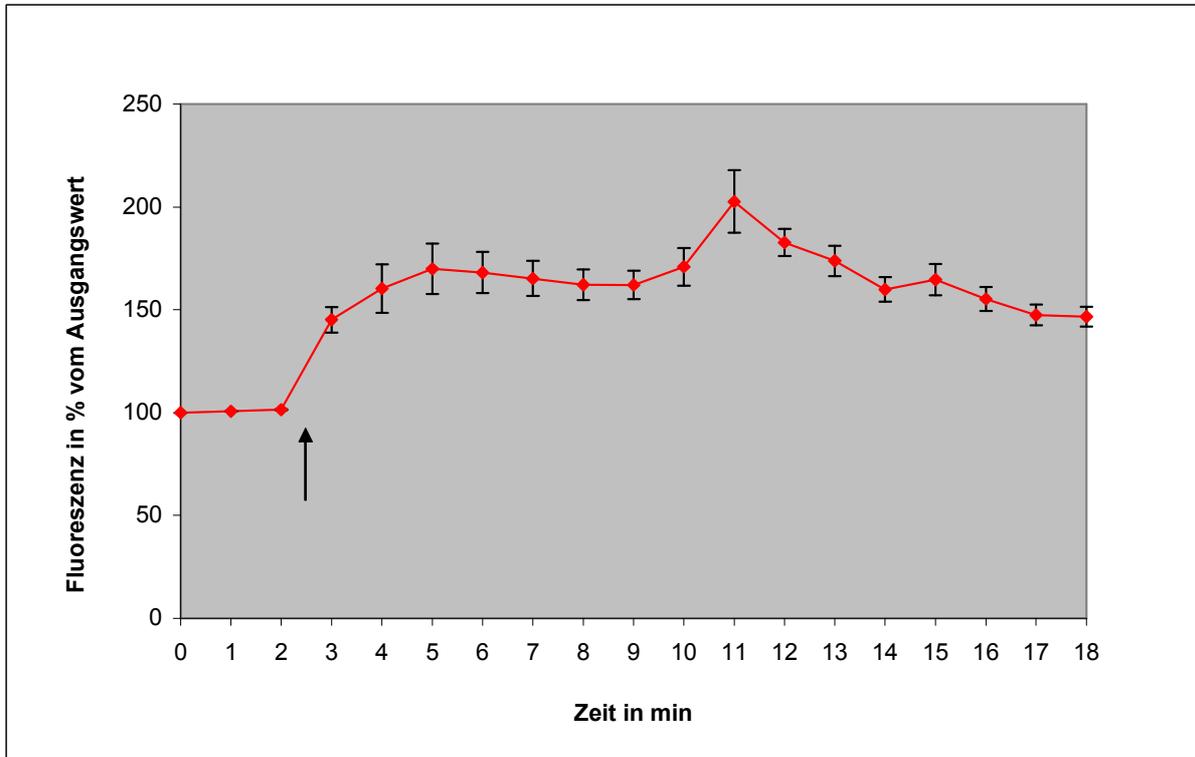


Abb.18: Membranpermeabilisierung: Dargestellt ist ein Versuch mit Mittelwert bei Messung an fünf Zellen und Standardabweichung. Mit Cell Tracker Orange angefärbte Zellen wurden in 6-Carboxyfluoreszeinhaltiges Medium überführt und dann mit Linolsäure 42,5µM inkubiert (Pfeil). Der Anstieg der Fluoreszenz bedeutet eine Permeabilisierung, der Abfall in der zweiten Versuchshälfte (ab 11 min) beruht auf einem Leck des Cell Tracker Orange aus der Zelle (Ausfließen von Zytoplasma).

4.4. Wirkung freier Fettsäuren auf den intrazellulären pH Wert

Freie Fettsäuren können den intrazellulären pH-Wert von Zellen beeinflussen. (Chen et al. 2001, Elsing et al. 1996). Die Frage, die sich uns stellte, war, ob dies auch für Keratinozyten gilt, die naturgemäß große Mengen von Fettsäuren aufnehmen, tolerieren und nicht zuletzt auch brauchen (vgl. Kap. 2.2.2.).

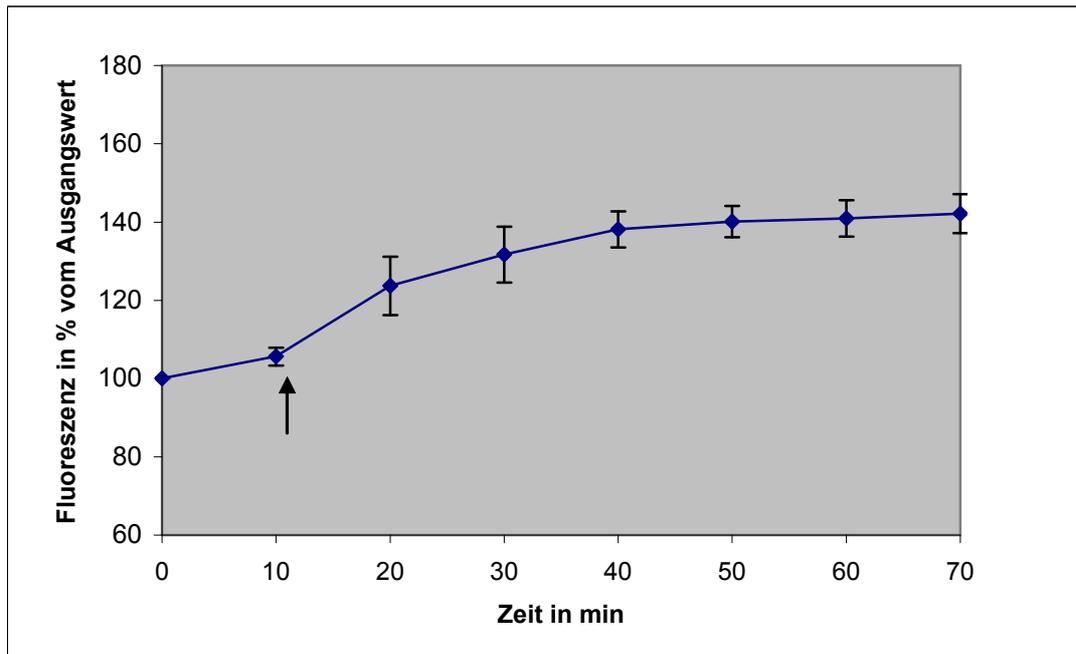


Abb.19: Änderung des intrazellulären pH-Wertes nach Zugabe von Linolsäure $17\mu\text{M}$ (Pfeil) Abtragung von Mittelwert über vier Zellen eines Versuches und Standardabweichung (Balken). Die Zunahme der Fluoreszenz ist ein Maß für die Abnahme des pH-Wertes.

Das Diagramm (Abb. 19) zeigt, daß selbst geringe Konzentrationen von Linolsäure eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration, dargestellt durch die Fluoreszenzänderung des pH-sensitiven Farbstoffes SNARF 1, bewirken. Der Anstieg der Fluoreszenz bedeutet eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration und damit eine Senkung des pH-Wertes. Eine Abhängigkeit von der Konzentration der Fettsäure bestand hierbei nicht (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, daß Fettsäurekonzentrationen, die, wie im folgenden beschrieben, noch nicht zu einer schweren Zellschädigung respektive zum Zelltod führen, eine vergleichbare pH-Änderung hervorrufen wie stark zytotoxische Konzentrationen, legt die Vermutung nahe, daß die pH-Änderung zumindest für Keratinozyten nicht der entscheidende Schädigungsfaktor ist.

4.5. Wirkung freier Fettsäuren und nativer Öle auf die intrazelluläre Konzentration freien Calciums

4.5.1. Auswertung der Versuche nach Lipp et Niggli und Berechnung der Konzentration intrazellulären freien Calciums nach Gryniewicz

Auf die Grundlagen der Calciummessung in Zellen wurde in Kapitel 2.2.4.-2.3.3. eingegangen. Ob man gemessene Fluoreszenzen auf Calciumkonzentrationen kalibrieren sollte, wird in der Literatur diskutiert. Grundsätzlich ist hierfür, wie bei Gryniewicz 1985 publiziert, neben der im jeweiligen Versuch gemessenen zell- und effektorbedingten Fluoreszenzintensität, eine minimal und eine maximal mögliche Fluoreszenzintensität zu messen. Die minimal meßbare Fluoreszenz sollte einer gegen Null gehenden Calciumkonzentration, die maximale der Calciumsättigung des Farbstoffes entsprechen. Lipp et Niggli beschrieben 1993 die Möglichkeit, den Fluoreszenzquotienten von Fluo3 und Fura-Red unter Verwendung einer scheinbaren Dissoziationskonstante zur Berechnung der tatsächlichen Calciumkonzentration heranzuziehen. Dies dient dazu, Fehler durch Ungleichverteilung eines Farbstoffes und durch Bleichen zu verhindern.

In Abbildung 20 und der folgenden Rechnung ist ein entsprechender Versuch dargestellt. Zunächst wurden die Keratinozyten mit Linolsäure inkubiert und die Fluoreszenz als Maß für die Änderung intrazellulären freien Calciums gemessen. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Zugabe von Ionomycin und CCCP permeabilisiert und gleichzeitig das freie Calcium durch den Chelator EGTA gebunden. Dadurch kommt es zu einer Verarmung des intrazellulären Raumes für freie Calciumionen. Man kann die Fluoreszenz der Farbstoffe in nahezu calciumfreiem Milieu messen. Um die maximal mögliche Fluoreszenz zu messen, muß erneut Calcium in großer Menge zur Verfügung gestellt werden. Wir führten hierzu einen Mediumswechsel durch, um eine Bindung des Calciums an EGTA zu verhindern. Die Calciumionenkonzentration des benutzten HBS-Mediums war mit 1mM um mehrere Zehnerpotenzen höher als übliche Konzentrationen intrazellulären freien Calciums, so daß wir ohne weitere Zusätze arbeiteten. Durch Digitoninzugabe erreichten wir eine weitere Permeabilisierung der Zellmembranen, die nach einigen Minuten regelmäßig zur Membranruptur führte.

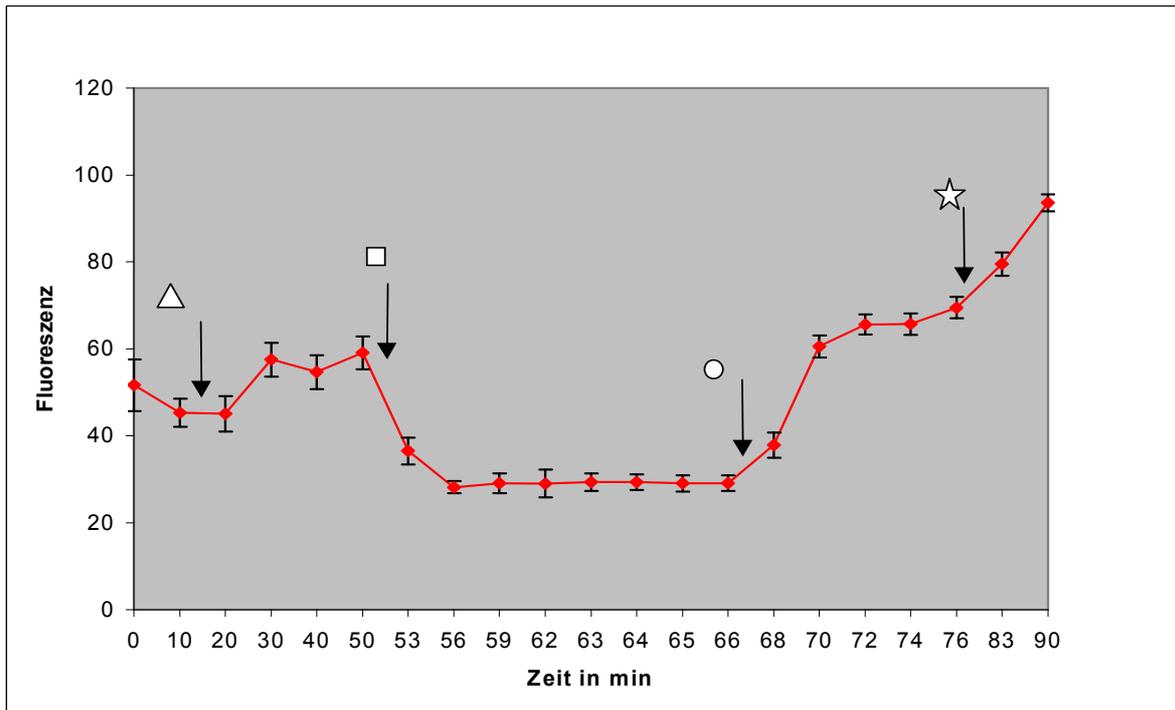


Abb.20: Versuch zur Kalibrierung der Fluoreszenzintensitäten zur entsprechenden Berechnung nach Grynkiewicz (1985) und Lipp et Niggli 1993. Die Einteilung der Abszisse ist nicht ordinal.

| | |
|---|--|
| △ | Zugabe von Linolsäure Finalkonzentration 30µM |
| □ | Zugabe von CCCP 6µM und Ionomycin 30µM zur Membranpermeabilisierung und EGTA 10 mM zur Bindung freien Calciums zur Messung der minimalen Fluoreszenzintensität R_{Min} |
| ○ | Mediumswechsel zu HBS ohne EGTA |
| ☆ | Zugabe von Digitonin 0,6 mg in HBS zur weiteren Membranpermeabilisierung, die im HBS-Medium vorhandene hohe Calciumionenkonzentration wird wegen der Membranpermeabilisierung auch in der Zelle erreicht und ermöglicht die Messung der maximalen Calciumfluoreszenz R_{Max} |

| | |
|---------------|---|
| $[Ca^{2+}]_i$ | Konzentration intrazellulären freien Calciums |
| K_D | scheinbare Dissoziationskonstante des Farbstoffgemisches aus Fluo3 und Fura-Red nach Lipp et Niggli 1993) |
| R | Tatsächliche Fluoreszenz |
| R_{Min} | Minimale Fluoreszenz (geringstmögliche Konzentration intrazellulären freien Calciums) |
| R_{Max} | Maximale Fluoreszenz (Sättigung der Farbstoffe mit Calcium) |

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D * (\text{R}-\text{R}_{\text{Min}})/(\text{R}_{\text{Max}}-\text{R})$$

$$K_D = 381 * 10^{-9} \text{ mol/l}$$

$$\text{R} = 55,06$$

$$\text{R}_{\text{Min}} = 28,12$$

$$\text{R}_{\text{Max}} = 93,12$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 381 * 10^{-9} \text{ mol/l} * (55,06 - 28,12) / (93,56 - 55,06)$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 266,5 \text{ nmol/l}$$

Die ermittelten Calciumkonzentrationen entsprechen in ihrer Größenordnung den in der Literatur beschriebenen (Hennings et al. 1989, Thio et al. 1994).

Die Versuche mußten wegen Austreten von Zytoplasma aus den Zellen abgebrochen werden, obwohl sich noch kein Gleichgewicht eingestellt hatte. Dies ist eine mögliche Fehlerquelle bei der Berechnung der Konzentration freien intrazellulären Calciums. Die tatsächliche Konzentration freien intrazellulären Calciums wäre dabei kleiner als die von uns angegebene, was den Literaturangaben in der Tendenz entspricht. Darin besteht ein wesentliches Manko der Kalibrierungsversuche im Allgemeinen und für unsere Versuche im Besonderen. Wenn die Membranen der Zellen schon vor Beginn der Kalibrierung rupturierte Bezirke mit Zytoplasmaustritt aufweisen, ist eine weitere Untersuchung und Kalibrierung gar nicht möglich. Kommt es während der Bestimmung der maximalen Fluoreszenz zur Lyse der Zelle, sind die Ergebnisse anzuzweifeln (Lipp und Niggli 1993, Diliberto et al. 1994, Erdahl 1995).

Beim Gleichsetzen der Fluoreszenz mit einer absoluten Calciumkonzentration ergeben sich aber noch weitere Probleme: Die Konzentration freien Calciums in Zellen ist eine streng regulierte Größe. Es findet ein ständiger und schneller Austausch zwischen gebundenem und freiem Calcium in der Zelle sowie eine Beeinflussung des intrazellulären Calciums durch äußere Faktoren statt (z. B. extrazelluläres Calcium, Membranschäden, die zur Veränderung des transmembranären Calciumgradienten führen). Dabei kann eine Veränderung der Calciumkonzentration aufgrund der gelartigen und inhomogenen Zusammensetzung des Zytoplasmas durchaus lokal begrenzt sein. Dies sollen Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung der Calciumkonzentration nicht nur anzeigen, sie dürfen dieses System gleichzeitig nicht stören, zum Beispiel durch Bindung des Calciums in relevantem Ausmaß. Um absolute Calciumkonzentrationen verlässlich messen zu können, dürfen die Farbstoffe selbst nicht

nennenswert in der Zelle verändert werden beziehungsweise Bindungen eingehen, was sie aber in gewissem Maße tun.

Wir entschlossen uns, die prozentuale Fluoreszenzänderung als Versuchsergebnis zu bewerten und die Korrelation mit absoluten Calciumkonzentrationen wegen hoher Fehlerraten beziehungsweise Undurchführbarkeit der intrazellulären Kalibrierung nicht generell anzustreben.

4.5.2. Der Einfluß freier Fettsäuren auf die Konzentration intrazellulären freien Calciums ist konzentrationsabhängig

In zahlreichen Publikationen wurde auf die differentielle Zytotoxizität verschiedener freier Fettsäuren eingegangen (Gläßer et al. 1996, Williams et al. 1998, Seegers et al. 1998, Tamura et al. 1985, Gamberucci et al. 1997).

Aufgrund der Tatsache, daß Linolsäure als essentielle Fettsäure besonders für Keratinozyten und die Haut eine herausragende Rolle spielt und für den Aufbau einer funktionierenden Barriere notwendig ist, stellte sich die Frage, ob Keratinozyten im gleichen Maße wie zum Beispiel Linsenepithelzellen durch Linolsäure geschädigt werden. Wir erwarteten einen geringeren zytotoxischen Effekt und orientierten uns in der Wahl der Fettsäurekonzentrationen an den in der Literatur verwendeten (Schürer et al. 1994). Die höchste Fettsäurekonzentration war 170µM, daneben inkubierten wir mit 42,5 und 17µM und ausgewählt mit abweichenden Konzentrationen, die bei den jeweiligen Abbildungen angegeben sind. Die Versuche mit nativen Ölen wurden hauptsächlich mit 170µM (Berechnung über das Molekulargewicht der Mischung) durchgeführt.

In den Abbildungen 21, 22 und 23 sind die Fluoreszenzänderungen als Folge der Applikation ausgewählter Fettsäuren dargestellt.

Die Abbildung 21 zeigt Fluoreszenzaufnahmen, bei denen Keratinozyten mit Linolsäure behandelt wurden. Die zunehmende Verfärbung ins Blaue steht für eine Zunahme der Konzentration freier Calciumionen im Zellinneren. Sie wird als Abnahme der Fluoreszenz von Fura-Red und Zunahme der Fluoreszenz von Fluo-3 gemessen. In einigen Versuchen, wie in der hier gezeigten Serie, kommt es schon bei Applikation relativ geringer Konzentrationen von Linolsäure (30µM) neben der Erhöhung der Konzentration intrazellulären freien Calciums zur Membranstörung, die sich in einem ganz besonders starken Anstieg der Konzentration intrazellulären freien Calciums äußert. Grund dafür ist, daß die Membran nicht mehr in der Lage ist, einen Calciumgradienten aufrechtzuerhalten: Calcium aus dem Außenmedium diffundiert in die Zelle. Gleichzeitig oder mit kurzer Verzögerung kann man

häufig ein Austreten von Zytoplasma beobachten. Wir nehmen an, daß der starke Calciumanstieg nicht Auslöser des Austretens von Zellinhalt ist, sondern eher Folge der beidem zugrunde liegenden Membranruptur. Die Verzögerung des Austritts von Zellinhalt ist wahrscheinlich Folge der Viskosität des Zytoplasmas.

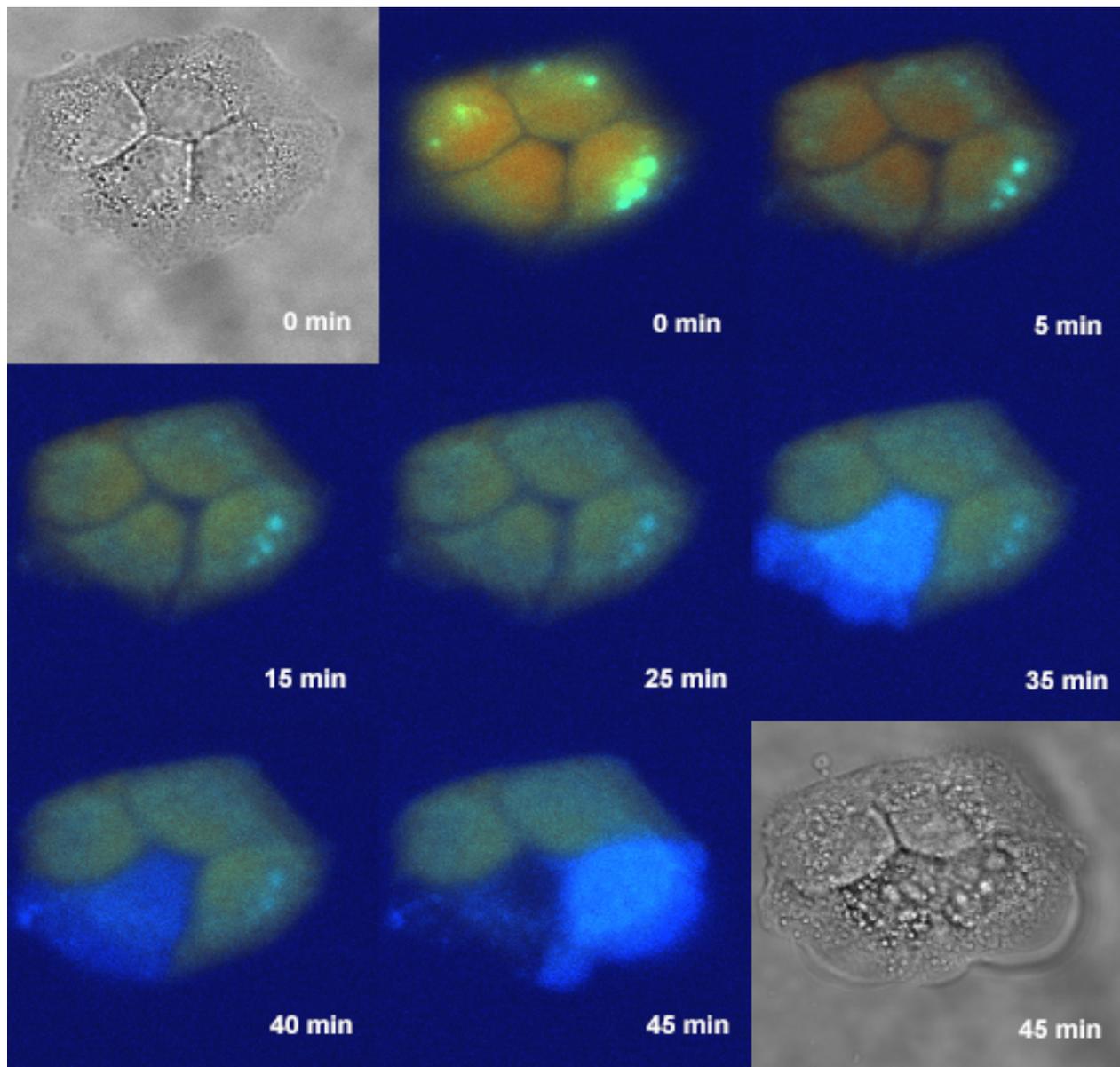


Abb.21: Zeitabhängige Fluoreszenzänderung bei einem Cluster von vier Zellen: Ausgewählte Bilder von Keratinozyten bei Behandlung mit Linolsäure $30\mu\text{M}$ (20°C , HBS-Medium, Anfärbung mit Fluo3 und Fura-Red, Exzitation 488nm , Detektion bei 525nm und 660nm). Das erste und das letzte Bild zeigen Durchlichtaufnahmen vor Versuchsbeginn und nach dessen Ende, die übrigen sind Fluoreszenzbilder. Die Zugabe der Linolsäure erfolgte zum Zeitpunkt Null nach Aufnahme der gezeigten Bilder. Bei zwei Zellen kommt es erst zu einem starken Calciumanstieg (Blaufärbung) und dann zum Austreten von Zytoplasma..

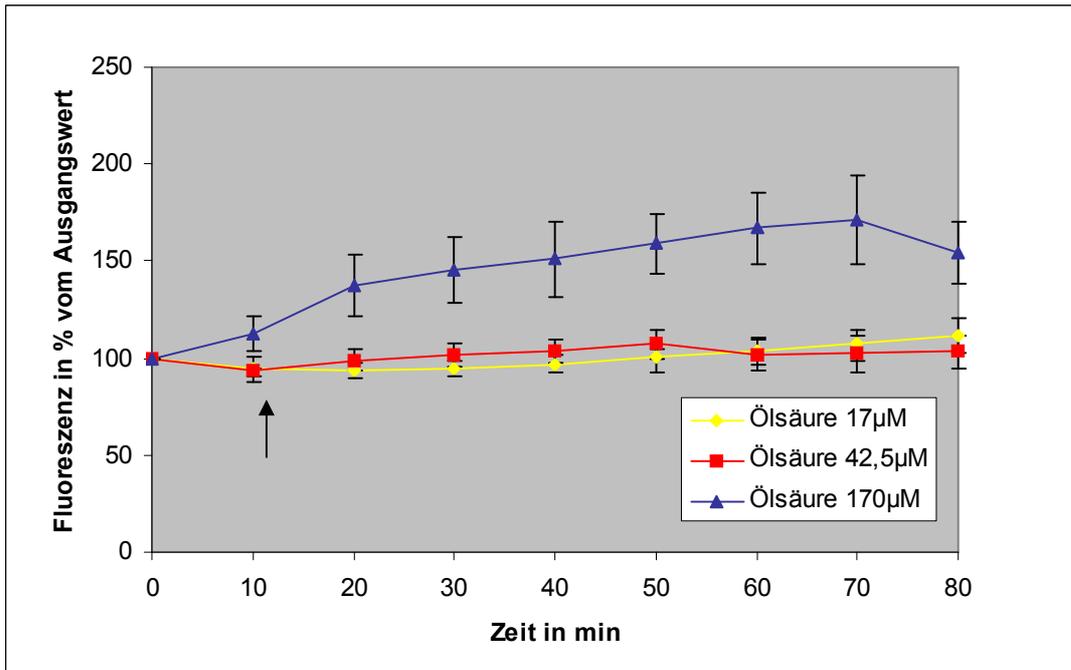


Abb.22: Konzentrationsabhängiger Einfluß der Applikation von Ölsäure auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Keratinozyten. (20°C, HBS-Medium, Anfärbung mit Fluo3 und Fura-Red, Exzitation 488nm, Detektion bei 525nm und 660nm). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung (Balken) auf der Grundlage von 17µM: zwei Versuche mit 2 und 4 Zellen, 43µM: 2 Versuche mit 2 und 3 Zellen, 170µM: drei Versuche mit 2, 3 und 3 Zellen. ($p < 0,001$ ab $t < 10$ min)

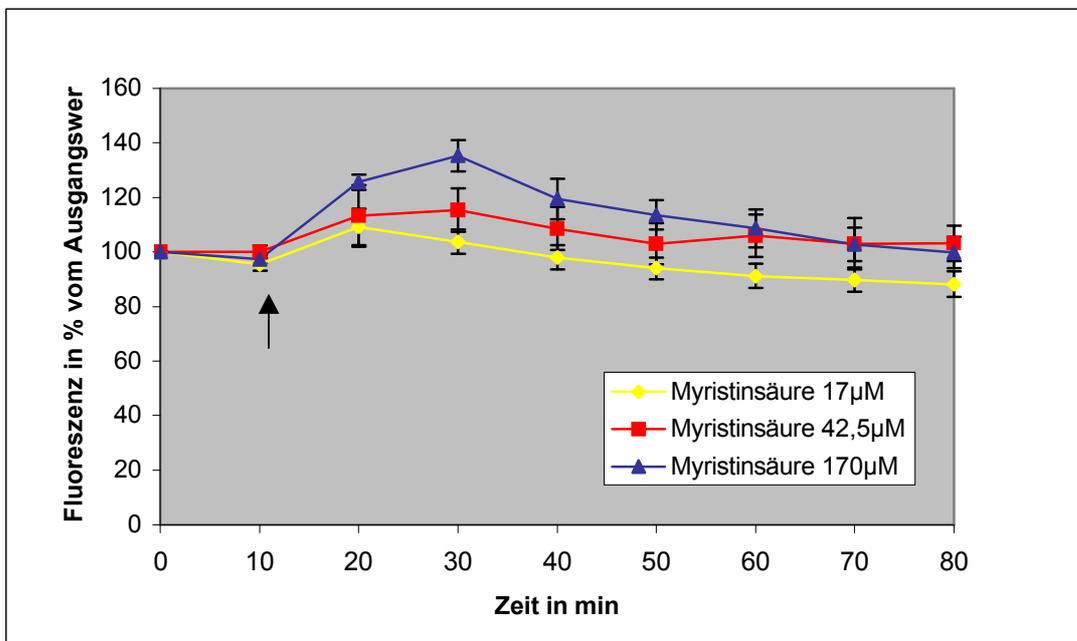


Abb.23: Konzentrationsabhängiger Einfluß der Applikation von Myristinsäure auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Keratinozyten. (Versuchsanordnung analog Abb. 22) Angegeben sind von Mittelwerte aus 2 Versuchen pro Konzentration mit Messungen an je zwei bis fünf einzelnen Zellen und Standardabweichung (Balken). ($p > 0.05$)

Am Beispiel der Ölsäure (Abb. 22) ließen sich Unterschiede im Anstieg der Calciumionenkonzentration auf hohe und niedrige Fettsäurekonzentrationen Unterschiede nachweisen. Signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen $17\mu\text{M}$ und $42,5\mu\text{M}$ einerseits und $170\mu\text{M}$ andererseits. Analog durchgeführte Experimente mit Arachidon- und Linolsäure führten zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt). Bei Applikation hoher Konzentrationen waren starke Anstiege der intrazelluläre freien Calciumkonzentration zu verzeichnen, während niedrige und mittlere Konzentrationen freier Fettsäuren kaum einen Einfluß hatten, es sei denn, es kam zur Zellyse. Bei der Myristinsäure (Abb. 23) sind diese Unterschiede, wie bei Stearin- Palmitin- und Laurinsäure, weniger ausgeprägt und nicht signifikant.

In Anbetracht der Tatsache, daß die bei den Versuchen beobachteten Zellanzahlen sehr gering sind, erwies sich eine statistische Auswertung als problematisch. Wir können jedoch schlußfolgern, daß es einen Trend gibt, nachdem hohe Konzentrationen von (speziell ungesättigten) freien Fettsäuren eine stärkere Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem freien Calcium bewirken als mittlere oder niedrige, die ihrerseits kaum einen Einfluß haben.

4.5.3. Einfluß der Kettenlänge und des Sättigungsgrades freier Fettsäuren auf die intrazelluläre Konzentration freien Calciums

Die Versuche zeigten unterschiedliche Reaktionen der Keratinozyten auf verschiedene Fettsäuren. Diese Erkenntnis sollte an Beispielen systematisch bearbeitet werden. Haben also Eigenschaften wie Kettenlänge oder Sättigungsgrad einen direkten Einfluß auf das Ausmaß der Calciumkonzentrationsänderung? Die Abbildungen 24 und 25 zeigen die zugehörigen Diagramme.

Wir untersuchten (Abb. 24) die Wirkung von Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure auf die intrazelluläre, freie Calciumkonzentration. Auch in hoher Konzentration ($170\mu\text{M}$) hatten alle diese Fettsäuren kaum einen Einfluß, sie führten nur zu einer geringen Zunahme der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Unterschiede in der Beeinflussung der Calciumkonzentration waren nicht nachzuweisen.

Anders ist das, wenn man freie Fettsäuren unterschiedlichen Sättigungsgrades betrachtet (Abb. 25). Wir führten Inkubationen mit Fettsäuren gleicher Kettenlänge, die keine, ein oder zwei Doppelbindungen im Molekül aufweisen, (Stearin-, Öl- und Linolsäure) durch. Es zeigte sich, daß mit zunehmender Zahl der Doppelbindungen die Erhöhung der freien

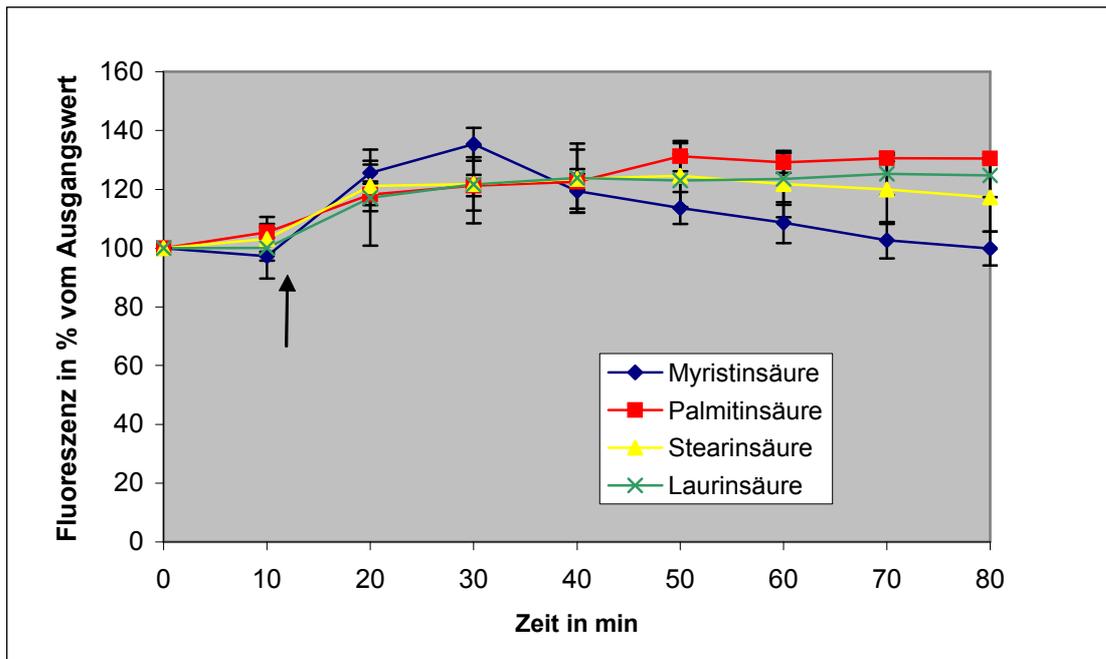


Abb.24: Einfluß der Kettenlänge der verwendeten Fettsäuren (Endkonzentration $170\mu\text{M}$, Pfeil) auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Keratinozyten. Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung (Balken) Laurinsäure: 2 Versuche je 5 einzelne Zellen, Myristinsäure: 2 Versuche 3 und 4 einzelne Zellen, Stearinsäure: 2 Versuche 6 und 2 einzelne Zellen, Palmitinsäure: 2 Versuche 3 und 5 einzelne Zellen. Versuchsanordnung ansonsten analog Abb. 22. ($p > 0.05$)

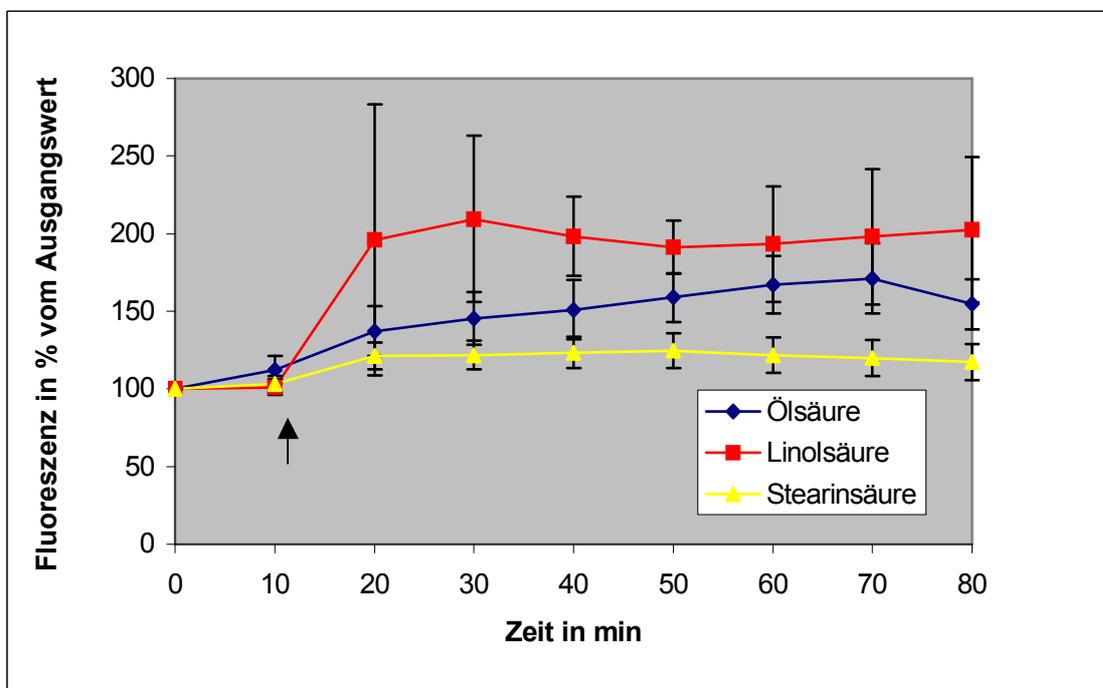


Abb.25: Einfluß des Sättigungsgrades der verwendeten Fettsäuren (Endkonzentration $170\mu\text{M}$, ab Pfeil) auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Keratinozyten.. Abtragung von Mittelwert und Standardabweichung (Balken).) Stearinsäure: 2 Versuche 6 und 2 einzelne Zellen, Ölsäure: 3 Versuche 2, 2 und 3 einzelne Zellen, Linolsäure: 2 Versuche je 5 einzelne Zellen. Versuchsanordnung ansonsten analog Abb. 22. ($p < 0,009$ ab $t < 10$ min)

intrazellulären Calciumionenkonzentration stärker ausfiel, wobei man auch hier die Aussage wegen der geringen Zellanzahl kritisch sehen muß. Auf ein weiteres Problem wurde bereits im Kapitel 4.5.1. eingegangen. Bei sehr hohen Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren kann man davon ausgehen, daß viele Zellen nach kürzerer oder längerer Inkubationszeit so stark geschädigt werden, daß sie dies nicht überleben. Es kommt im Zuge der Membrandesintegration zu einem starken Calciumanstieg. Hier kann man wahrscheinlich nicht mehr allein von einer Reaktion auf die Fettsäureapplikation sondern eher von einer Folge der Membranstörung sprechen. Dabei spielt die relative Höhe und der genaue Zeitpunkt des Anstieges der Calciumkonzentration für die Zelle keine Rolle mehr. Da nicht alle Zellen zur gleichen Zeit eine Membranruptur durchmachen, kommt es auch zu den teilweise sehr hohen Standardabweichungen. Ungleichmäßige Veränderungen der Calciumkonzentration von Keratinozyten wurden auch von Bíró et al. (1998) bei Behandlung mit Adenosintriphosphat beschrieben. Dennoch lassen sich bei gleicher Kettenlänge signifikante Unterschiede in der Wirkung in Abhängigkeit von der Zahl der Doppelbindungen erkennen. Hiernach wird eine Fettsäure besser toleriert, je gesättigter sie ist.

4.5.4. Einfluß eines physiologischen Fettsäuregemisches auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Gesättigte freie Fettsäuren führten auch in hohen Konzentrationen nur zu geringen und meist transienten Erhöhungen der intrazellulären Calciumionenkonzentration, während Doppelbindungen im Molekül der freien Fettsäuren eine stärkere Erhöhung bewirkten. In der Literatur gibt es Hinweise, daß freie Fettsäuren im physiologischen Gemisch weniger zellschädigend wirken (Hennig et al. 1993). Wir verwendeten die dort publizierte Zusammensetzung. Dabei fiel auf, daß das physiologische Fettsäuregemisch, das im Anteil 95µM ungesättigte Fettsäuren enthält (siehe Kap. 2.2.2. Tab. 2) eine geringere Wirkung auf die Calciumhomöostase hatte, als 90µM einer einzelnen ungesättigten Fettsäure (Vergleich mit Linolsäure in Abb. 26).

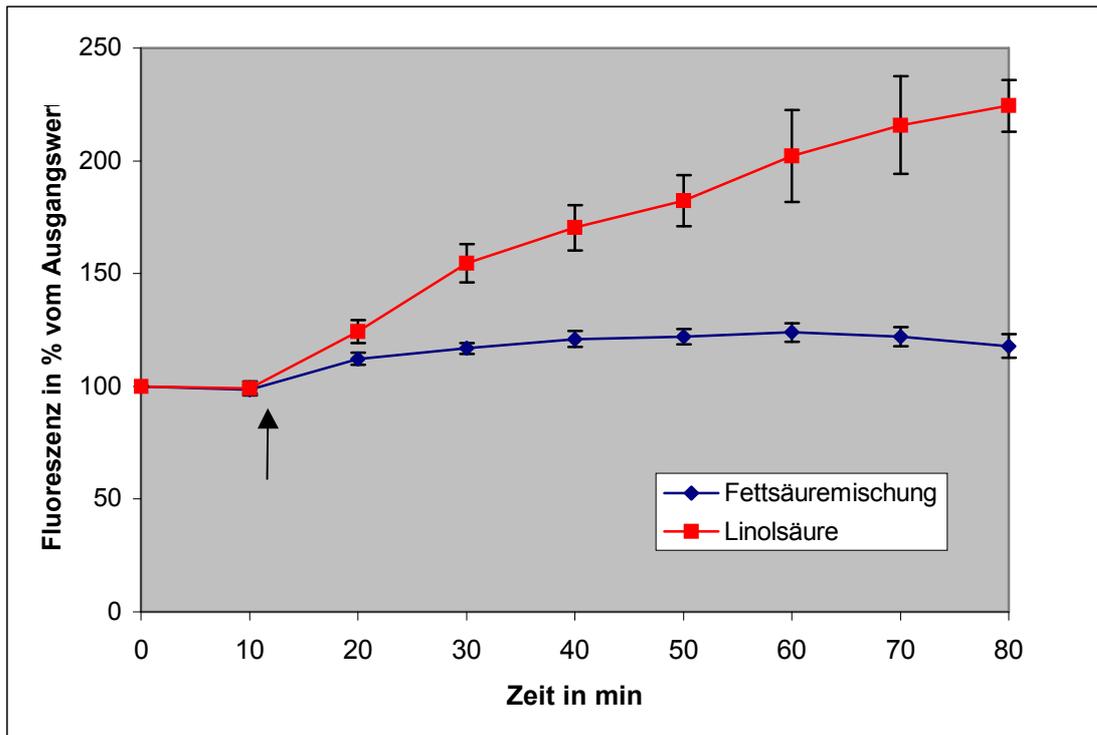


Abb. 26: Vergleich des Einflusses freier Linolsäure und eines physiologischen Fettsäuregemisches auf die intrazelluläre Konzentration freien Calciums. Untersucht wurden Keratinozyten analog Abb. 22. Als Effektoren wurden Linolsäure $90\mu\text{M}$ und ein physiologisches Fettsäuregemisch $170\mu\text{M}$ (Anteil ungesättigter Fettsäuren von 56%) eingesetzt. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Linolsäure: 2 Versuche 2 und 3 Zellen, Fettsäuremischung: 2 Versuche je 5 Zellen. ($p < 0,005$ ab $t = 20\text{min}$))

4.5.5. Vergleich zum Einfluß von freien Fettsäuren, einem physiologischen Fettsäuregemisch und pflanzlichen Ölen auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Öle spielen in der Hautpflege eine große Rolle, obwohl sie oft sehr hohe Anteile an ungesättigten, zytotoxischen Fettsäuren enthalten (vgl. Tabelle Öle Kap. 2.2.2.). Anscheinend wirkten sie verestert mit Glycerol (Esterbindungen werden durch membranständige Esterasen nach und nach gespalten) und im Gemisch weniger oder gar nicht zellschädigend.

Um dies zu überprüfen, führten wir Untersuchungen mit ausgewählten Pflanzenölen durch und vergleichen sie hier mit entsprechenden Versuchen mit gesättigten und ungesättigten freien Fettsäuren. In der Literatur finden sich Hinweise, daß zum Beispiel veresterte und freie Linolsäure zumindest partiell gegensätzliche Wirkungen auf Keratinozyten haben. Liu und Belury beschrieben 1998, daß freie Linolsäure die intrazelluläre Arachidonsäurekonzentration

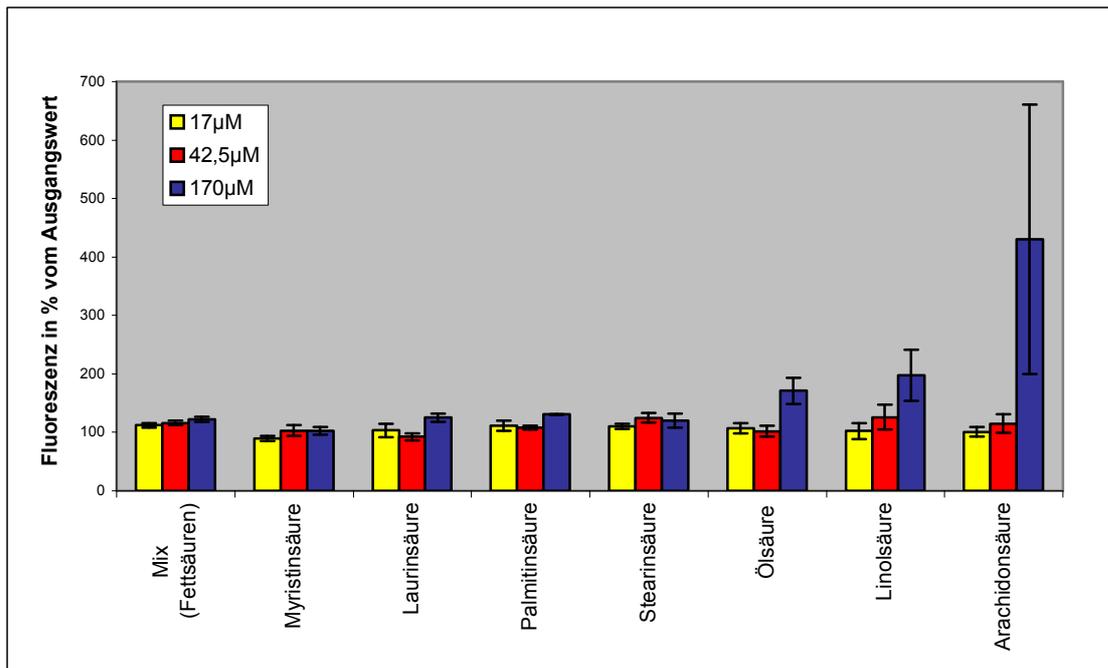


Abb.26: Zusammenstellung der Fettsäure- und Ölversuche mit Calciummessung: Dargestellt ist die Höhe der Fluoreszenz mit calciumsensiblen Farbstoffen (analog Abb. 22.) nach einstündiger Inkubation mit der entsprechenden Fettsäure bzw. dem physiologischen Fettsäuregemisch nach Hennig et al. 1993. Mittelwerte über jeweils 2-4 Versuche mit Messungen an je 2-6 einzelnen Zellen. (signifikanter Unterschied zwischen Öl-, Linol- und Arachidonsäure 170µM und allen anderen Säuren in allen Konzentrationen $p < 0.01$)

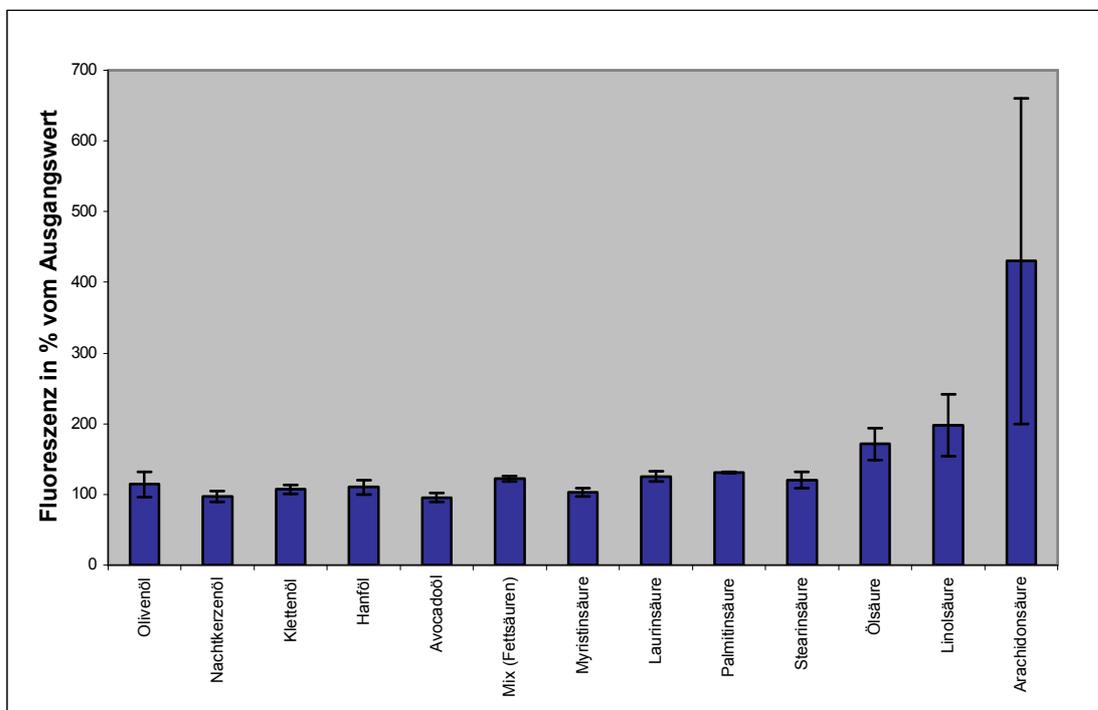


Abb. 27: Zusammenstellung der Fettsäure- und Ölversuche: Messung der Konzentration des intrazellulären freien Calciums (analog Abb. 22). Die Zellen wurden eine Stunde mit der Fettsäure/ dem Öl inkubiert (170µM). Dargestellt sind die Mittelwerte über jeweils 2-4 Versuche mit Messungen an je 2-6 einzelnen Zellen. (signifikanter Unterschied zwischen Öl-, Linol- und Arachidonsäure 170µM und allen anderen Säuren in allen Konzentrationen $p < 0.01$)

erhöhte, während sie durch gebundene verringert wurde. Dies ist für eine mögliche praktische Anwendung insofern von Bedeutung, als Arachidonsäure Ausgangssubstanz für proinflammatorische Eicosanoide ist, denen eine große Rolle in der Ausbildung von Entzündungsreaktionen der Haut zukommt (Podhaisky et Wohlrab 2002).

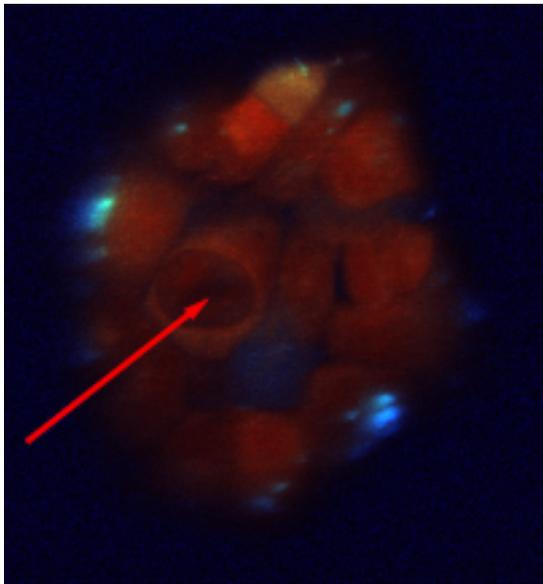
Die Diagramme Abb. 27 und 28 zeigen eine Zusammenstellung der Reaktionen auf alle verwendeten Fettsäuren in je drei Konzentrationen und einen Vergleich aller verwendeter Fettsäuren und Öle bei einer Konzentration von $170\mu\text{M}$ nach einstündiger Inkubation.

Eine signifikant stärkere Beeinflussung der intrazellulären freien Calciumkonzentration fanden wir nur bei Behandlung mit hohen Konzentrationen ungesättigter freier Fettsäuren im Vergleich zu allen übrigen eingesetzten Effektoren. Diese ihrerseits hatten zwar zum großen Teil eine signifikante Erhöhung der Calciumkonzentration zur Folge, unterschieden sich in dieser jedoch nicht signifikant voneinander.

Obwohl Zytotoxizität und Störungen der Calciumhomöostase nicht aneinander gekoppelt sind, stellt eine Beeinflussung der Calciumkonzentration doch Streß dar und ist mit zusätzlichem Energiebedarf zur Erreichung des Normalzustandes verbunden. Die Vermutung, daß die Änderung der Calciumkonzentration durch Öle geringer ausfallen würde, konnten wir belegen und schlossen daraus, daß Gemische von Fettsäuren für die Zellen besser tolerierbar sind. Dabei ist eine geringere Störung des intrazellulären Gehalts an verschiedenen Fettsäuren eine mögliche Erklärung.

4.5.6. Einfluß des Kulturalters auf die fettsäureinduzierte Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration

Keratinocyten ändern sich in vivo in Form, Gestalt, Kontakt zur Umgebung und Aufgaben. Ebenso ändert sich (oder ändern sie) ihre Umgebung selbst. Auf die differenzierungsbedingte Änderung der extrazellulären Calcium- und Fettsäurekonzentration wurde im Kapitel 2.1. eingegangen. Da HaCaT- Zellen ihre Differenzierungsfähigkeit trotz Immortalisierung erhalten haben, waren Effekte des Kulturalters der Zellen bei den Versuchen in Betracht zu ziehen. Hinweise hierfür finden sich bei Poumay und Pittelkow 1995. Sie beschreiben eine rapide Abnahme der Proliferationsrate und eine zunehmende Nachweisbarkeit von Differenzierungsmarkern bei Erreichen der Konfluenz. Cho und Bikle fanden 1997 eine



Kulturalterabhängigkeit der Calcium-ATPase-Aktivität. Watt et al. beschrieben 1991 das Auftreten von weniger abgeflachten Zellen in Monolayerkulturen, die auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren einen geringeren transienten Calciumanstieg zeigten, als umgebende Zellen. Auch wir fanden in subkonfluenten Keratinocytenkulturen - mit zunehmendem Kulturalter häufiger - größere Einzelzellen, die, wie in der Abb. 28 zu sehen, dem typischen Bild der Basalzelle nicht mehr entsprachen.

Die Reaktionen der Zellen auf Fettsäuren waren ebenfalls verändert. Insgesamt kann man sagen, daß die Keratinocyten (siehe Diagramme Abb. 29 und 30) mit zunehmendem Kulturalter resistenter gegenüber Fettsäuren wurden.

Abb.28: Abgekugelte Zelle (Pfeil), die dem Bild der üblichen Basalzelle nicht mehr entspricht. Oben Anfärbung mit Fluo-3 und Fura-Red, unten Durchlichtaufnahme. (Keratinocyten über 4 Tage in SFM kultiviert und in HBS überführt)

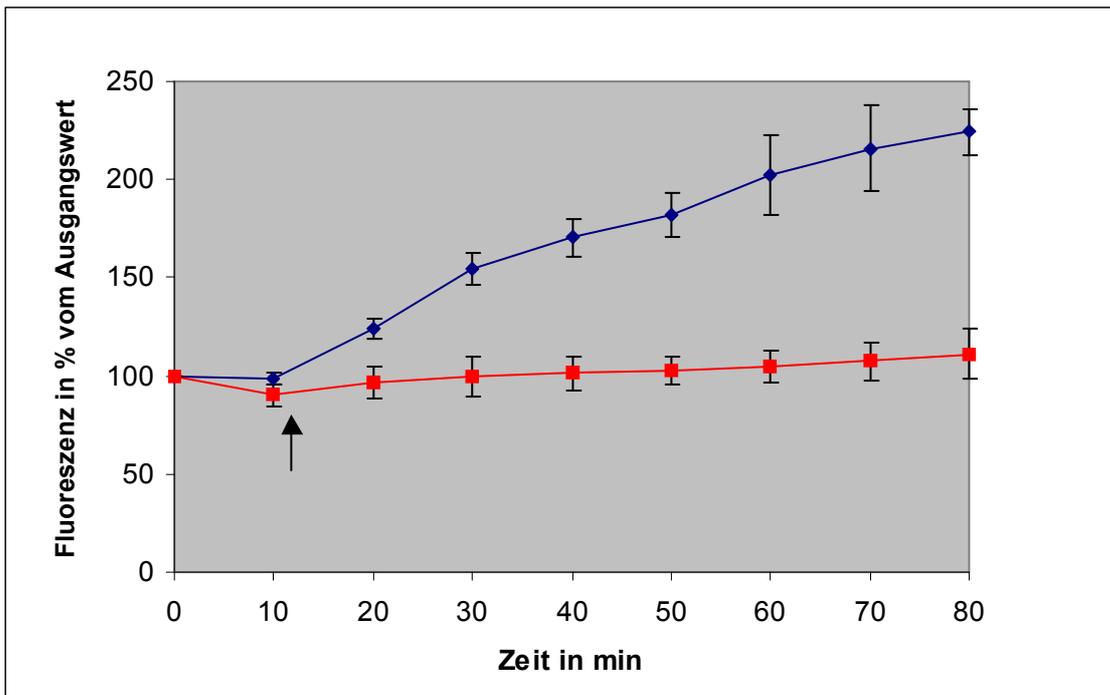


Abb.29: Abhängigkeit der Änderung der intrazelluläre Calciumkonzentration auf Linolsäure 90 μ M vom Kulturalter. (20°C, HBS-Medium, analog Abb. 22) Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Blauer Graph 3 Tage alte Zellen (2 Versuche, 2 und 4 Zellen), roter Graph 4 Tage alte Keratinozyten (2 Versuche, 3 und 4 Zellen). ($p < 0,001$ ab $t = 20$ min)

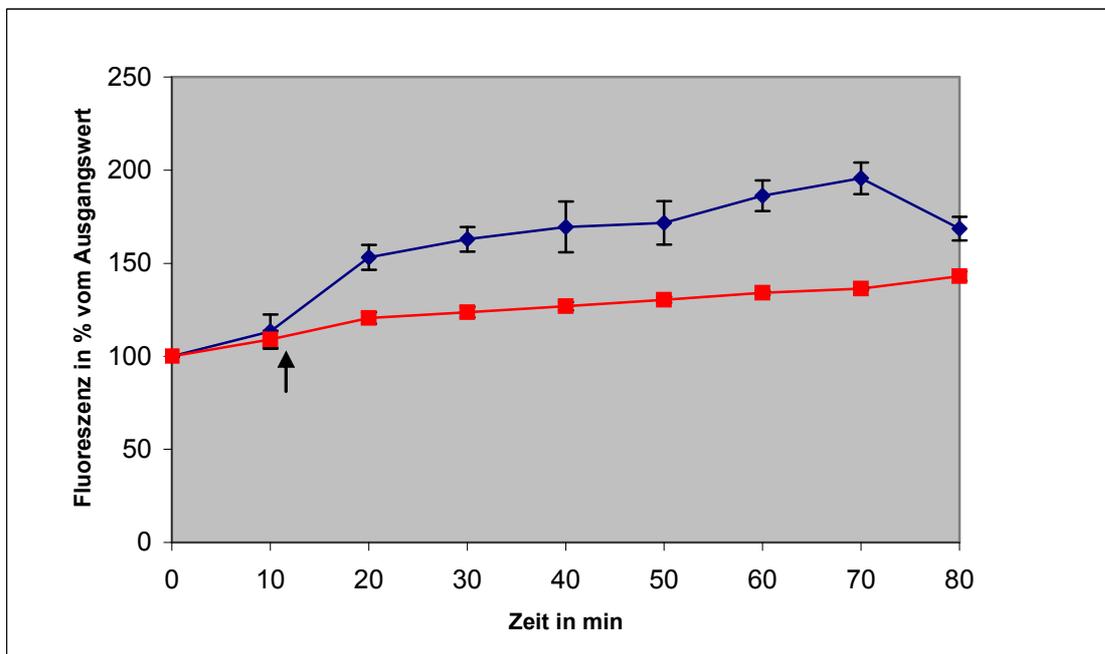


Abb.30: Abhängigkeit der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration auf Ölsäure 170 μ M vom Kulturalter. (20°C, HBS-Medium, analog Abb. 22) Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Blauer Graph 2 Tage alte Zellen (2 Versuche, 2 und 3 Zellen), roter Graph 4 Tage alte Keratinozyten (2 Versuche, à 3 Zellen). ($p < 0,001$ ab $t = 20$ min)

Die Reaktion auf die Fettsäuren war am 2. und 3. Kulturtag etwa gleich, ab dem 4. Tage war eine rapide Abnahme der Sensibilität gegenüber ungesättigten freien Fettsäuren nachweisbar. Die Ergebnisse gehen konform mit der Determination der Keratinozyten im Sinne der Differenzierung, Produktion von Fettsäuren und Fetten und der Aufrechterhaltung eines Calciumgradienten in der Haut in vivo und sprechen im Umkehrschluß für die Nähe des Modells HaCaT- Keratinozyten zu seinen „normalen“ Verwandten.

Nicht ganz ausgeschlossen ist auch eine parakrine Beeinflussung der Zellen untereinander. So fanden wir, daß Zellhaufen mit einer abgekugelten Zelle häufig sehr viel geringere Reaktionen zeigten als solche, die morphologisch homogen aussahen. Es war uns sogar möglich, das Ausmaß der Reaktion auf Fettsäuren in Abhängigkeit von der Entfernung von einer „Kugelfelle“ im gleichen Zellhaufen zu messen.

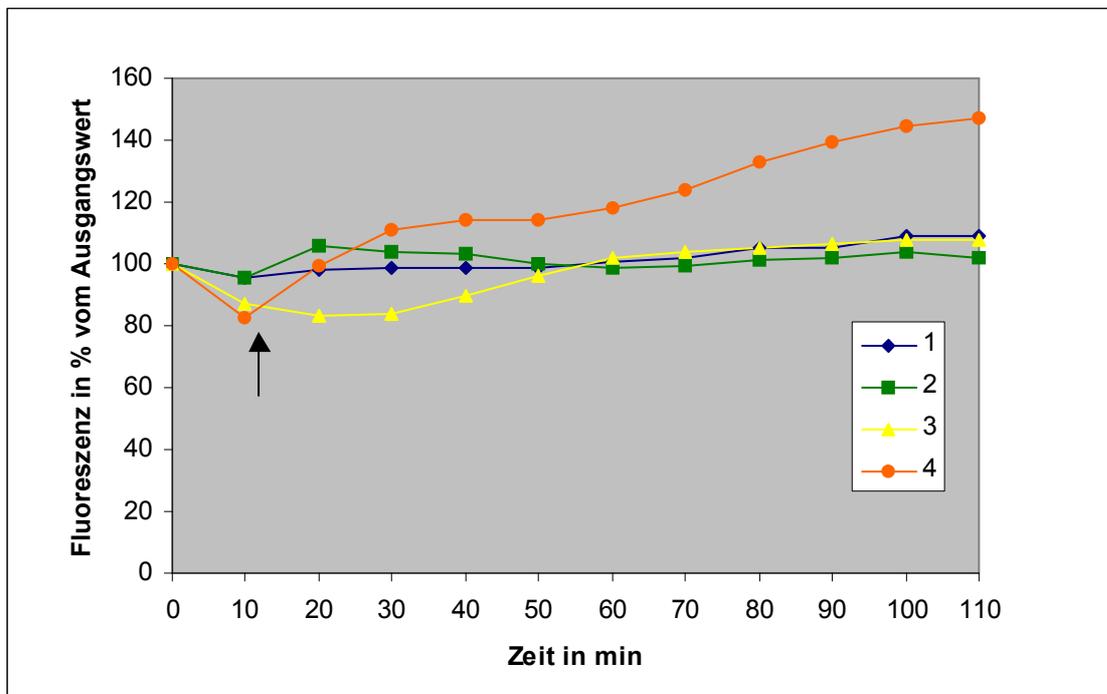


Abb.31: Diagramm eines Einzelversuches: Vier Tage alte Keratinozyten wurden mit $90\mu\text{M}$ Linolsäure inkubiert (Pfeil). (20°C , HBS-Medium, analog Abb. 22) Zelle 1 ist die abgekugelte Zelle, Zelle 4 ist die im Beobachtungsfeld weitestmöglich davon entfernte (siehe Abbildung 32).

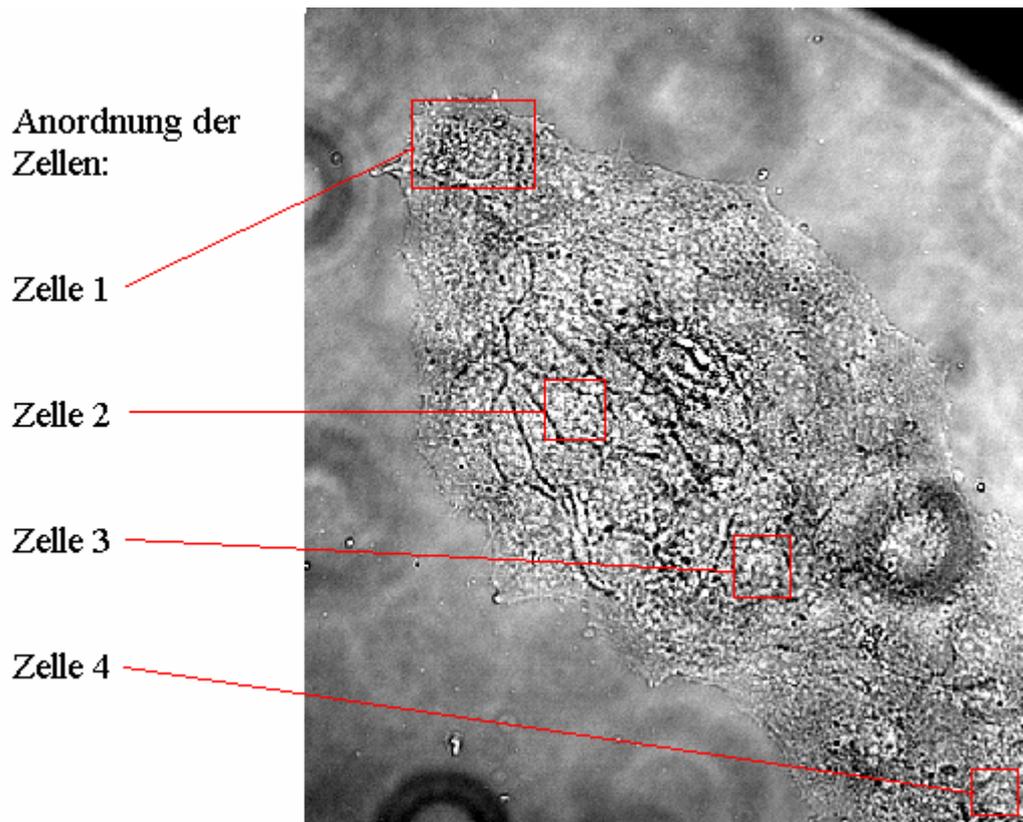


Abb.32: Bild der Zellen. Die für das Diagramm (Abb. 31) ausgewählten Areale sind eingezeichnet.

Im Diagramm ist die Reaktion von vier Tage alten Keratinozyten auf Linolsäure dargestellt. Wie im Bild beschrieben, sind Zellen 2-4 in Hinblick auf zunehmenden Abstand zu Zelle 1 ausgewählt. Es zeigt sich, daß Zelle 4 empfindlicher auf die Linolsäure reagiert als Zelle 2. Es scheint, daß der Abstand zu der Zelle 1 ein Faktor für die Reaktionsstärke ist. Möglicherweise ist die morphologische Veränderung dieser Zelle Ausdruck für eine Differenzierung. Diese Vermutung muß jedoch noch in weiteren Versuchen überprüft und geklärt werden, ob die beschriebenen Formveränderungen differenzierungsbedingt sind.

Versuche wurden auch in calciumarmem (HBS ohne Calcium) und calciumfreiem (HBS ohne Calcium mit EDTA) Medium durchgeführt. Die Verwendung von calciumarmem Medium hatte kaum Einfluß auf die Höhe des Calciumsignals (Daten nicht gezeigt), unter calciumfreiem Medium kam es bei vielen Zellen zur Ablösung vom Untergrund, wodurch die Versuche nicht mehr auswertbar wurden (vgl. Thiele 1995).

Da auch hohe Konzentrationen von Fettsäuren Keratinozyten in kurzer Zeit zwar schädigen, aber nicht zum Tod aller Zellen führten, stellte sich uns die Frage, inwieweit einige Zellen diese Behandlung längere Zeit überleben können. Hierzu wurden Dauerinkubationen mit verschiedenen Fettsäuren durchgeführt und mit unbehandelten Zellen gleichen Alters

verglichen. Da man davon ausgehen kann, daß die meisten Keratinozyten eine Langzeitinkubation mit 170µM Linolsäure nicht überlebt haben, spricht es für die große Anpassungsfähigkeit der übrigen, daß nach fünftägiger Inkubation lichtmikroskopisch nicht wesentlich veränderte, vitale Zellen nachweisbar waren (Anfärbung mit Trypanblau negativ). Eine Erklärung findet sich bei van der Lee et al. 2000: An Kardiomyozyten konnten durch die Inkubation mit Fettsäuren fettsäurebindende und –abbauende Proteine induziert werden. Daneben besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß es sich bei den überlebenden Zellen um in der Differenzierung weiter fortgeschrittene Zellen handelt. Rein optisch ließen sich außer der geringeren Zellanzahl jedoch keine Unterschiede zu den mit nicht zytotoxischer Stearinsäure inkubierten Zellen feststellen. Dies müßte in weiterführenden Studien untersucht werden.

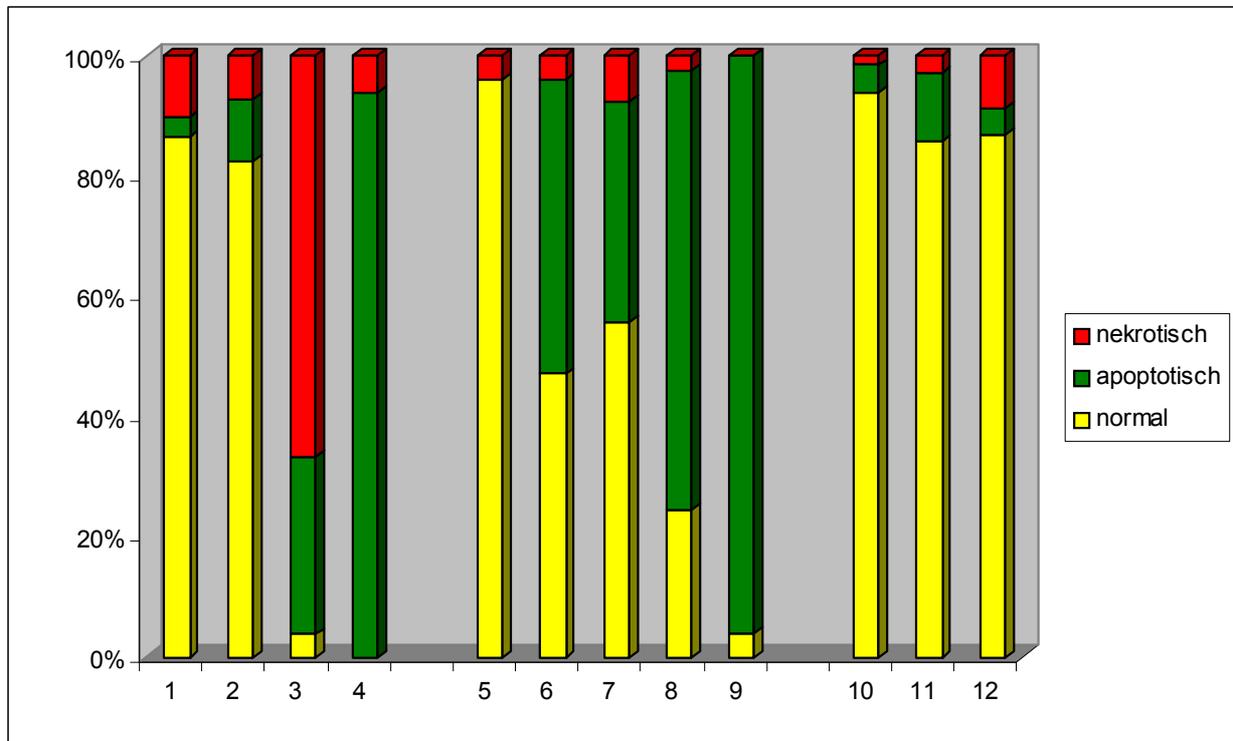
4.6. Apoptose und Nekrose als Antwort auf die Applikation von freien Fettsäuren

4.6.1. Apoptosedetektion mittels Bestimmung externalisierten Phosphatidylserins

Daß ungesättigte freie Fettsäuren in zellabhängig verschieden hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken ist ein allgemein anerkannter Fakt. Es wurde auch vermutet, daß die Zellen vorwiegend apoptotisch und nicht nekrotisch werden. Die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen, wird folgendermaßen erreicht: Zellen, bei denen die Apoptose begonnen hat, zeigen im Bild eine Anreicherung von Grünfluoreszenz in der Zellmembran durch Anlagerung von AnnexinV-FITC an externalisiertes Phosphatidylserin. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid färbt Zellen mit schwerer Membranschädigung (große Löcher) rot. Zellen, die vor der Färbung vital waren, nehmen kaum (idealerweise keinen) Farbstoff auf und zeigen sich hier nur in der Durchlichtmikroskopie (vgl. Abb. 34).

In vergleichender Weise wurden Studien zur Apoptoseinduktion an HaCaT Zellen auch von Fröde (1998) am Durchflußzytometer durchgeführt. Trotz etwas variierten Versuchsdesigns stimmen die Ergebnisse mit unseren gut überein. Der Vorteil der Laser Scanning Mikroskopie liegt hierbei vor allem in der direkten Beurteilbarkeit von Einzelzellen und dem geringeren Fehler durch Vernachlässigung von „leeren Zellhüllen“, solange diese am Objektträger haften bleiben. Ein Nachteil bleibt die geringe Zellanzahl.

Insgesamt kommen wir, wie in Abb. 33 dargestellt, zu dem Ergebnis, daß ungesättigte Fettsäuren in konzentrationsabhängiger Weise zur Auslösung der Apoptose führen. Bei den Säulen Nummer 1-4 handelt es sich um Kontrollen: zur Nekroseinduktion wurde



| Säule | Inkubation mit | Kommentar |
|----------|---|-------------------|
| Säule 1 | Kontrolle unbehandelt | |
| Säule 2 | Alkohol 25% | |
| Säule 3 | Hypoosmolare Lösung (Medium : Aqua = 1:2) | Nekroseauslösung |
| Säule 4 | C2-Ceramid 10µM | Apoptoseauslösung |
| Säule 5 | Linolsäure 17 µM | |
| Säule 6 | Linolsäure 42,5 µM | |
| Säule 7 | Linolsäure 170 µM | |
| Säule 8 | Linolsäure 340 µM | |
| Säule 9 | Linolsäure 510 µM | |
| Säule 10 | Palmitinsäure 170 µM | |
| Säule 11 | Physiologische Fettsäuremischung 170 µM | |
| Säule 12 | Hanföl 170 µM | |

Abb.33.: Im Diagramm ist die Wirkung unterschiedlicher Substanzen (siehe Tabelle) auf die Einleitung von Apoptose und Nekrose dargestellt. Die Zellen wurden eine Stunde mit der jeweiligen Substanz inkubiert (20°C, in HBS-Medium) und dann mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid angefärbt. Die Auswertung erfolgte am LSM (Exzitation 488nm, Messung der Emission bei 525nm und 660nm. Auszählung von jeweils 50-100 Zellen aus je 2 Versuchen); Signifikanztestung Säulen 5-9 $\chi^2_{(4/95)}=67,92 (>9,49)$, Signifikanztestung Säulen 7, 10-12 $\chi^2_{(3/95)}=112,37 (>7,81)$

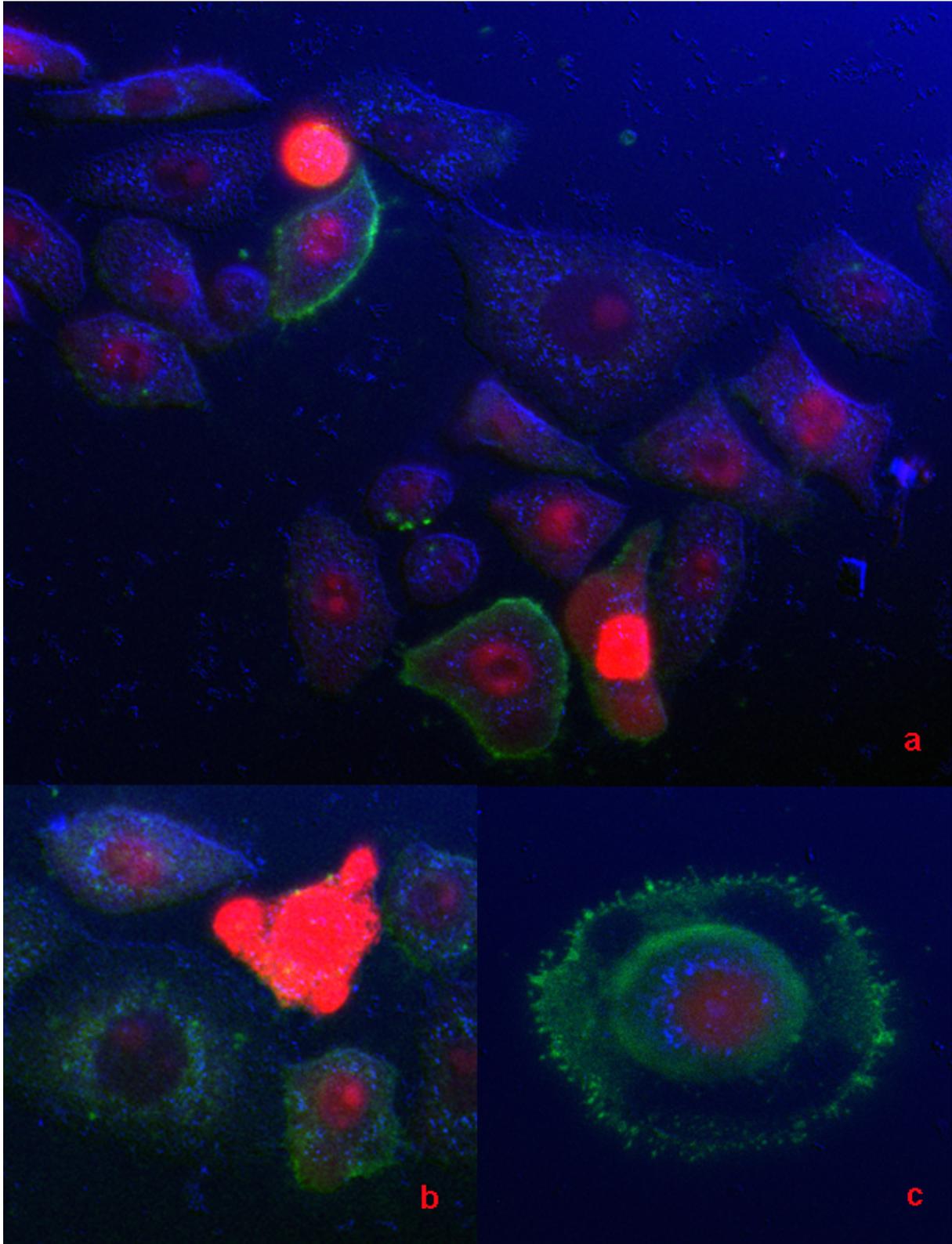


Abb.34: Ausgewählte Bilder der mit Fettsäuren inkubierten Keratinozyten. Grüne Membranfärbung kennzeichnet die Apoptose, starke Rotfärbung der gesamten Zelle zeigt die Nekrose bzw. sehr späte Apoptose an. Die Zellen wurden für eine Stunde inkubiert mit (a) Linolsäure $42,5\mu\text{M}$, (b) und (c) Linolsäure $170\mu\text{M}$ (in HBS, 20°C). Anschließend Färbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid (Exzitation bei 488nm , Messung der Emission bei 525 und 660nm)

hypoosmolares Medium (ein Teil HBS mit zwei Teilen Wasser), zur Apoptoseauslösung Ceramid (Gniadecki et al. 1998) verwendet.

Analog wurden Versuche mit Arachidonsäure durchgeführt. Wie bei der Linolsäure kommt es bei hohen Konzentrationen zur Apoptose praktisch aller Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen der Wirkung von Linolsäure gegenüber Palmitinsäure, der physiologischen Mischung und Hanföl und zwischen verschiedenen Linolsäurekonzentrationen.

Die Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, daß neben der proapoptotischen extrazellulären Calciumkonzentration möglicherweise auch die Umgebung der Zellen mit hohen Konzentrationen freier ungesättigter Fettsäuren und nachfolgend deren steigenden intrazellulären Konzentrationen zur normalen Differenzierung und folgenden Apoptose von Keratinozyten in der Epidermis notwendig sind. Diese These wird gestützt durch zahlreiche neuere Forschungen auf dem Gebiet der fettsäurebindenden Proteine (FABP) und der Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR's). Hohoff et al. gelang 1999 die Charakterisierung eines rekombinanten epidermalen FABP, dessen Struktur eine Präferenz für langkettige Fettsäuren nahelegt. Huang et al. beschrieben 2002 den Transport freier zytoplasmatischer Fettsäuren durch FABP's in den Kern, wo sie (Tan et al. 2002) in Beziehung zu PPAR's treten und den gemeinsamen Agonisten, natürlicherweise langkettige Fettsäuren, übergeben. Die Aktivierung der PPAR's führt zur Konvertierung in aktive Transkriptionskomplexe (Vanden Heuvel 1999) und über weitere Zwischenschritte schließlich zu Proliferationshemmung und Differenzierung (Westergaard et al. 2001), wobei die Verteilung der PPAR-Subtypen in gesunder Haut nicht gleichmäßig ist- ein weiterer Hinweis auf die enge Verzahnung mit der Differenzierung der Keratinozyten. Dabei konnte von Sheu et al. 2002 gezeigt werden, daß die Aktivierung der PPAR selektiv für bestimmte Fettsäuren ist. Während Linolsäure zur Aktivierung führte, blieb diese bei Behandlung mit Stearinsäure aus. Im dort publizierten Aufbau war die Behandlung von Mäusen mit chronisch entzündlichen Hautveränderungen im Sinne eines Modells für Kontaktdermatitis, gemessen an der Abnahme der Hautverdickung und des Gehalts an entzündlichen Zellen, ausgesprochen erfolgreich. Die von uns gezeigt Apoptoseauslösung durch ungesättigte Fettsäuren ist möglicherweise durch in basalen Keratinozyten vorkommende PPAR α vermittelt.

Die Trennung zwischen den beiden sich teilweise bedingenden Phänomenen der direkten Zytotoxizität von Fettsäuren und der calciuminduzierten Zellschädigung bleibt Gegenstand weiterer Forschungen.

4.6.2. Nachweis der Kernpyknose

Da es in der Literatur Hinweise gibt, daß die Externalisierung von Phosphatidylserin in einigen Fällen das einzige Apoptosemerkmal ist und daß es zum weiteren Durchlaufen der Apoptose nicht kommt (Shvedova et al. 2002), führten wir punktuell weitere Versuche zur Absicherung der angenommenen Apoptoseinitiation durch. Wie im Kapitel 2.3.5. beschrieben, ändert sich die Kerngröße von Zellen bei Apoptose und Nekrose abhängig vom Zelltodmechanismus. Wir behandelten die Keratinozyten wahlweise mit Linol- oder Arachidonsäure und maßen den Kerndurchmesser. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt, die Abb. 36 zeigt ausgewählte Zellen zu Versuchsbeginn und –ende. Auf die Behandlung mit Linolsäure und Arachidonsäure

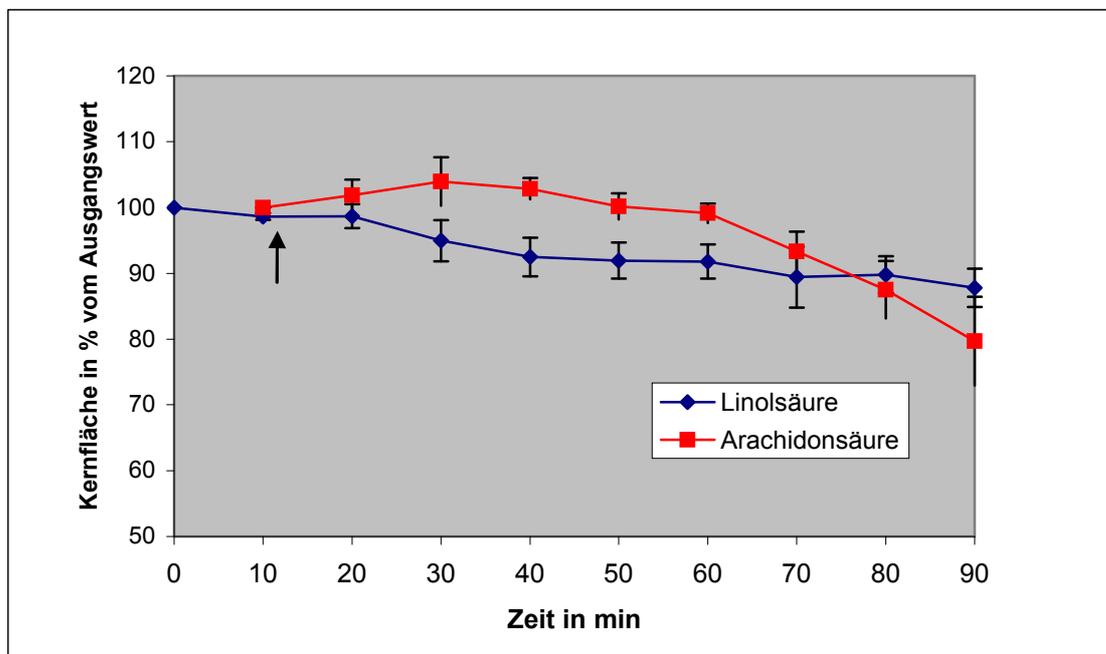


Abb.35: Beobachtung der Kernpyknose nach Behandlung mit Linolsäure und Arachidonsäure $42,5\mu\text{M}$ (Pfeil) (HBS-Medium, 20°C). Anfärbung mit HOECHST 33342 und Messung der Kernfläche. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Versuche mit 4 (Linolsäure) und 5 (Arachidonsäure) Zellen. ($p=0.03$ zwischen Anfangs- und Endgröße; signifikante Unterschiede zwischen Arachidonsäure- und Linolsäurewirkung bestehen nicht.)

reagierten die Zellen mit Kernflächenverringerng. Da die Fluoreszenz pro Fläche hierbei nicht zunimmt, kann man von Kernpyknose im Gegensatz zu einer Flächenverringerng durch Formveränderung (Abkugeln) des Zellkerns sprechen. Die Kerne schrumpfen im Laufe der Experimente signifikant, was für einen Eintritt der Keratinozyten in die Apoptose spricht. Eine Differenzierung im Ausmaß der Kernpyknose zwischen Linol- und Arachidonsäure war nicht möglich. Die nahezu lineare Schrumpfung der Kerne gegen Ende der Beobachtung nach Arachidonsäureapplikation läßt jedoch eine stärkere Wirkung der Arachidon- versus der

Linolsäure vermuten. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Annexin-FITC-Versuche (siehe Kapitel 4.6.1.), bei denen die gleichen Säurekonzentrationen häufig zur Apoptose führten.



Abb. 36: Kernpyknose. Ausgewählte Zellen vor (oben) und 80min nach (unten) Applikation von Linolsäure 42,5 μ M (in HBS, 20°C, Anfärbung mit HOECHST 33342)

5. Zusammenfassung

Keratinocyten sind Einflüssen der Umgebung unmittelbar ausgesetzt. Die durchgeführten Untersuchungen sollten Einblicke in Aufnahme, Verstoffwechslung, Wirkung und eventuelle Schädigung von Zellen durch freie und in Ölen gebundene Fettsäuren am Beispiel von HaCaT- Keratinocyten unter *in-vitro*-Bedingungen geben.

Die Aufnahmestudien wurden unter Verwendung der selbstfluoreszierenden Parinarsäure durchgeführt. In den Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß Parinarsäure zunächst in die Zellmembran aufgenommen wird und sich später und in geringerem Ausmaß in Membranen im Zellinneren ansammelt. Eine Sättigung der Parinarsäureaufnahme war in unseren Versuchen nicht nachzuweisen.

Die Verstoffwechslung von Fettsäuren wurde mittels Lipidextraktion nach Inkubation mit radioaktiv markierter Palmitinsäure untersucht. Aufnahme und Ein- beziehungsweise Abbau der Palmitinsäure ist in Übereinstimmung mit an anderen Zellen gewonnenen Ergebnissen ein schneller Prozeß. Bereits nach zehn Minuten war ein großer Teil der Radioaktivität nicht mehr als Palmitinsäure selbst nachzuweisen, die Zahl der entstandenen Produkte stieg dabei mit zunehmender Inkubationsdauer kontinuierlich an.

In zahlreichen Studien wird über die zytotoxische Wirkung von ungesättigten Fettsäuren im Gegensatz zu gesättigten Fettsäuren berichtet. Da Keratinocyten Kontakt zu hohen Konzentrationen von freien Fettsäuren und Ölen haben, stellte sich die Frage, wie sensibel sie auf diesen Reiz reagieren. Hierzu führten wir Untersuchungen zur Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch, weil deren Anstieg als Auslöser von Differenzierung, aber auch von Apoptose gilt. Tatsächlich stieg die intrazelluläre Calciumkonzentration bei Inkubation mit ungesättigten Fettsäuren in konzentrationsabhängiger Weise an. Bei der Behandlung mit gesättigten Fettsäuren kam es allenfalls zu einem geringen Anstieg. Zusätzlich untersuchten wir die Wirkung einer Reihe ausgewählter nativer Öle, die in der Kosmetik eine Rolle spielen. Viele davon enthalten einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren in Veresterung mit Glycerol (vgl. Kap. 2.2.1.). Fette werden durch extra- und intrazellulär vorkommende Lipasen gespalten, ein Teil der Fettsäuren wirkt also in freier Form. Daher ist es erstaunlich, daß selbst Öle wie Nachtkerzenöl oder Hanföl mit Anteilen ungesättigter Fettsäuren um 90% keinen starken Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration verursachen.

Auf das Ausmaß des Anstieges der intrazellulären freien Calciumionenkonzentration besonders nach Behandlung mit ungesättigten Fettsäuren hatte das Kulturalter einen Einfluß und außerdem bestand ein Zusammenhang mit bestimmten morphologischen Besonderheiten einzelner Zellen, die vermutlich differenzierungsbedingt waren. Daneben konnte eine Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes durch Fettsäuren nachgewiesen werden.

Bei diesen Versuchen fiel auf, daß die Keratinozyten auf hohe Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren häufig mit schwerwiegenden morphologischen Veränderungen reagieren. Dies ließ vermuten, daß ein Teil der Zytotoxizität ungesättigter Fettsäuren auf Membranschädigungen beruht. Untersuchungen von Oberle (1999) bewiesen eine Permeabilisierung von Modellmembranen durch Fettsäuren. In gemeinsamen Experimenten wurde dies mit geändertem Versuchsdesign auch an Keratinozyten nachgewiesen. Unter Inkubation mit einer mittleren Linolsäurekonzentration kommt es zu einer Permeabilisierung der Zellmembran, die sogar großen, hydrophilen Molekülen inklusive Hydrathülle eine Passage ins Zellinnere erlaubt.

Als Mechanismus der Zytotoxizität ungesättigter Fettsäuren wird die Apoptose favorisiert. Wir wiesen nach, daß selbst hohe Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren nicht zur Nekrose der Keratinozyten führen. Jedoch kommt es in Abhängigkeit von der Konzentration der ungesättigten Fettsäure zur Apoptose. Bei Inkubation mit gesättigten Fettsäuren, einer physiologischen Fettsäuremischung mit einem Anteil ungesättigter Fettsäuren von 56% und von Ölen wurde selbst bei Verwendung hoher Konzentrationen (170µM) keine Apoptose induziert. Für die Fettsäuremischung ist dies besonders bemerkenswert, als es bei mittleren Konzentrationen (42,5µM) von Linolsäure allein bereits zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate kam.

Untermauert werden diese Ergebnisse durch den Nachweis der Kernpyknose als Reaktion auf ungesättigte Fettsäure am Beispiel von Arachidon- und Linolsäure.

Insgesamt konnten wir zytotoxische, genauer proapoptotische Wirkungen freier ungesättigter Fettsäuren an Keratinozyten belegen. Besonders die apoptoseinduzierende Wirkung mittlerer Konzentrationen von Linolsäure an hyperproliferativen (Bonnekoh et al. 1991) *in-vitro* kultivierten humanen Keratinozyten läßt eine *in-vivo* Testung zur topischen Therapie bei hyperproliferativen Hauterkrankungen sinnvoll erscheinen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Naser MB: Differential effects on melanocyte growth and melanization of low vs. high calcium keratinocyte-conditioned medium. *Brit J Dermatol* 140 (1999) 50-55
2. Almaden Y, Canalejo A, Ballesteros E, Anon G, Canadillas S, Rodriguez M: Regulation of arachidonic acid production by intracellular calcium in parathyroid cells: effect of extracellular phosphate. *J Am Soc Nephrol* 13/3 (2002) 693-8
3. Apostolov K, Barker W, Galpin SA, Habib NA, Wood CB, Kinchingto D: Syncytia formation in HIV-1 infected cells is associated with increase in cellular oleic acid. *FEBS Lett* 250/2 (1989) 241-244
4. Arenhoevel D, Deissler A, Vögtle A (Eds): Die Bibel: Die heilige Schrift des Alten und Neuen Bundes, Deutsche Ausgabe mit den Erläuterungen der Jerusalemer Bibel. St Benno, Leipzig 1970 2. Mose (Exodus) 30, 22-34
5. Avocado fruit facts: <http://www.crfg.org/pubs/ff/avocado.html> (2002)
6. Benassi L, Ottani D, Fantini F, Marconi A, Chiodino C, Gianetti A, Pincelli C: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, transforming growth factor β 1, Calcium, and ultraviolet B radiation induce apoptosis in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 109 (1997) 276-282
7. Benson RSP, Sidhu SS, Jones MN, Case RM, Thompson DG: Fatty acid signalling in a mouse enteroendocrine cell line involves fatty acid aggregates rather than free fatty acids. *J Physiology* 538 (2002) 121-131
8. Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S: Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation: potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 97/4 (1996) 1085-1093
9. Bíró T, Szabó I, Kovács L, Hunyadi J, Csernoch L: Distinct subpopulations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch Dermatol Res* 290 (1998) 270-276
10. Blumenberg M: Molecular biology of human keratin genes. In: Darmon M, Blumenberg M: Molecular biology of the skin: The Keratinocyte. 1993 Academic Press, Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto
11. Boehringer Ingelheim Bioproducts: Product information on Annexin V-FITC (1997)
12. Bonnekoh B, Wevers A, Geisel J, Rasokat H, Mahrle G: Antiproliferative potential of zidovudine in human keratinocyte culture. *J Am Acad Dermatol* 25/3 (1991) 483-490
13. Bortz J: Statistik für Sozialwissenschaftler. 5. Aufl. Springer. Berlin, Heidelberg, New York, 1999, S. 150-170, S. 279-319
14. Boukamp P, Petrussevka RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106 (1988) 761-771
15. Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81/1S (1983) 33s-40s
16. Bringmann A, Schopf S, Faude F, Reichenbach A: Arachidonic acid-induced inhibition of Ca²⁺ channel currents in retinal glial (Müller) cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239/11 (2001) 859-864

17. Bushinsky DA, Parker WR, Alexander KM, Krieger NS: Metabolic, but not respiratory, acidosis increases bone PGE₂ levels and calcium release. *Am J Physiol Renal Physiol* 281(2001)1058–1066
18. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A: Arachidonic acid activates a proton conductance pathway and the Na⁺/H⁺ exchanger in platelets. *Biochem J* 319 (1996) 567-574
19. Chakravarthy BR, Isaac RJ, Morley P, Durkin JP, Whitfield JF: Stimulation of protein kinase C during Ca²⁺- induced keratinocyte differentiation : selective blockade of MARCKS phosphorylation by calmodulin. *J Biol Chem* 270 (1995) 1362-1368
20. Cheah AM: Effect of long chain unsaturated fatty acids on the calcium transport of sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biochim Acta* 648 (1981) 113-119
21. Chen DZ, Auburn K: Fish oil constituent docosahexa-enoic acid selectively inhibits growth of human papillomavirus immortalized keratinocytes. *Carcinogenesis* 20/2 (1999) 249-254
22. Chen WH, Chen CR, Yang KT, Chang WL, Su MJ, Wu CC, Wu ML: Arachidonic acid-induced H⁺ and Ca²⁺ increases in both the cytoplasm and nucleoplasm of rat cerebellar granule cells. *J Physiol* 537/2 (2001) 497-510
23. Cherny VV, Henderson LM, Xu W, Thomas LL, DeCoursey TE: Activation of NADH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils by arachidonic acid. *J Physiol* 535.3 (2001) 783–794
24. Cho JK, Bikle DD: Decrease of Ca²⁺-ATPase activity in human keratinocytes during calcium-induced differentiation. *J Cell Physiol* 172 (1997) 146-154
25. Cistola DP, Hamilton JA, Jackson D, Small DM: Ionization and phase behavior of fatty acids in water: application of the Gibbs phase rule. *Biochemistry* 27/6 (1988) 1881-8
26. Clontech Laboratories Product Information: ApoAlert Apoptosis Detection Kit (1996)
27. Cobbold PH, Rink TJ: Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 248 (1987) 313-328
28. Coles B, Bloodsworth A, Eiserich JP, Coffey MJ, McLoughlin RM, Giddings JC, Lewis MJ, Haslam RJ, Freeman BA, O'Donnell VB: Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP*. *J Biol Chem* 277/8 (2002) 5832-5840
29. Cooper R, Noy N, Zakim D: A physical-chemical model for cellular uptake of fatty acids: prediction of intracellular pool sizes. *Biochemistry* 26/18(1987)5890-6
30. Dachary-Prigent J, Pasquet JM, Freyssinet JM, Nurden AT: Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation: a study using Ca²⁺-ATPase inhibitors. *Biochem* 34 (1995) 11625-11634
31. Das UN, Vijaykumar K, Madhavi N, Suryaprabha P, Sravankumar G, Ramesh G, Koratkar R, Sangeetha Sagar P, Padma M: Psoriasis: current concepts and new approaches to therapy. *MedHypotheses* 38 (1992) 56 -62
32. Das UN: Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61/3 (1999)157-163
33. DeMeis L, Wolosker H, Engeleder S: Regulation of the channel function of Ca²⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1275 (1996) 105-110
34. Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, Yuspa SH: Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth and Differentiation* 6 (1995) 149-157

35. Diliberto PA, Wang XF, Herman B: Confocal imaging of Ca²⁺ in cells. *Meth Cell Biol* 40 (1994) 243-262
36. Diokles von Karystos: Die gesunde Lebensweise. In: Kollesch J, Nickel D (Eds): *Antike Heilkunst*. Reclam, Leipzig, 1986, S.150-157
37. Dunham WR, Klein SB, Rhodes LM, Marcelo CL: Oleic acid and linoleic acid are the major determinants of changes in keratinocyte plasma membrane viscosity. *J Invest Dermatol* 107 (1996) 332-335
38. Elias PM: Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. *Exp Dermatol* 5 (1996) 191-201
39. Elsing C, Kassner A, Stremmel W: Effect of surface and intracellular pH on hepatocellular fatty acid uptake. *Am J Physiol* 271 [Gastrointest Liver Physiol] (1996) G1067-1073
40. Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR: Effects of pH conditions on Ca²⁺ transport catalyzed by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin suggest problems with common applications of these compounds in biological systems. *Biophys J* 69 (1995) 2350-2363
41. Faß U: Studien zur Morphologie und Biochemie der Zytotoxizität von cis- ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu Prozessen der Lipidperoxidation an subkultivierten Epithelzellen von Rinderlinsen. Halle Univ., Math.-Natwiss.-Techn. Fak., Diss. (1997)
42. Fröde D, Wohlrab W: Measurement of fatty acid- induced changes of intracellular free Ca²⁺ concentration in cultured keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11 (1998) 173
43. Fröde D: Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf *in vitro* kultivierte humane Keratinozyten. Halle Univ., Math.-Natwiss.-Techn. Fak., Diss. (1998)
44. Fulbright RM, Axelrod D, Dunham WR, Marcelo CL: Fatty acid alteration and the lateral diffusion of Lipids in the plasma membrane of keratinocytes. *Exp Cell Res* 233 (1997) 128-134
45. Funk JO, Kind P: Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Hautarzt* 48 (1997) 157-165
46. Fusenig NE, Breitkreutz D, Boukamp P, Tomakidi P, Stark HJ: Differentiation and tumor progression. *Rec Res Cancer Res* 139 (1995) 1-19
47. Gamberucci A, Fulceri R, Benedetti A: Inhibition of store-dependent capacitative Ca²⁺ influx by unsaturated fatty acids. *Cell Calc* 21/5 (1997) 375-385
48. Glanz D, Fröde D, Kuhnt B, Wohlrab W, Gläßer D: Measurements of fatty acid induced changes of intracellular free calcium-concentration in cultured keratinocytes – a comparison of methods. *Biol Chem* 377S (1996) 194
49. Glanz D, Gläßer D, Lennarz B, Nguyen N, Iwig M: Low concentrations of cis-Linoleic acid induce intracellular calcium rise and cell damage in bovine lens epithelial cells. *Nova Acta Leopoldina NF* 75/299 (1997) 113-120
50. Gläßer D, Fass U, Gruner M, Thust O, Iwig M, Spindler M: Low concentrations of cis-linoleic acid induce cell damage in epithelial cells from bovine lenses. *Eur J Cell Biol* 71/3(1996) 286-292
51. Gläßer D, Ngoli D, Iwig M: Extracellular calcium and pH maintain high levels of protein synthesis during primary culture of lens epithelial cells. *Lens Res* 3 (1986) 1-15
52. Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ: Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52/2-3 (1994) 121-127

53. Gniadecki R, Gajkowska B, Bartosik J, Hansen M, Wulf HC: Variable Expression of apoptotic phenotype in keratinocytes treated with ultraviolet radiation, ceramide, or suspended in semisolid methylcellulose. *Acta Derm Venereol [Stockholm]* (1998) 248-257
54. Göhring J, Fröde D, Wohlrab W: Induction of antiproliferative effects, in HaCaT cells by a synthetic hydroperoxide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13 (2000) 31–38
55. Gonda T, Maouyo D, Rees SE, Montrose MH: Regulation of intracellular pH gradients by identified Na/H exchanger isoforms and a short-chain fatty acid. *Am. J. Physiol.* 276/ 39 (1999) 259–270
56. Gore J, Besson P, Hoinard C, Bougnoux P: Na(+)-H⁺ antiporter activity in relation to membrane fatty acid composition and cell proliferation. *Am J Physiol* 266/1 (1994) 110-120
57. Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV: Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptor stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 107 (1996) 412-418
58. Gruner M: Untersuchungen zur Zytotoxizität von Linolsäure an Linsenepithelzellen. Halle Univ., Med. Fak., Diss. (1997)
59. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca²⁺-indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260 (1985) 3440-3450
60. Gurr MI et James AT: *Lipid Biochemistry: An Introduction*. 1. Auflage, Chapman and Hall, London, 1971
61. Hagens G, Masouyé I, Augsburg E, Hotz R, Saurat JH, Siegenthaler G: Calcium –binding protein S100A7 and epidermal–type fatty acid-binding protein are associated in the cytosol of human keratinocytes. *Biochem J* 339 (1999) 419-427
62. Hamilton JA: Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60/5-6 (1999) 291-7
63. Harris IR, Farrell AM, Grunfeld C, Holleran WM, Elias PM, Feingold KR: Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis. *J Invest Dermatol* 109 (1997) 783-787
64. Harris IR, Farrell AM, Menon RA, Grunfeld C, Elias PM, Feingold KR: Expression and regulation of mRNA for putative fatty acid transport related proteins and fatty acyl CoA synthase in murine epidermis and cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 722-726
65. Hauptmann S, Graefe J, Remane H: Fette. In: Hauptmann S (Ed): *Lehrbuch der organischen Chemie*. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1976, S. 599-600
66. Hennig B, Ramasamy S, Alvarado A, Shantha NC, Boissonneault GA, Decker EA, Watkins BA: Selective disruption of endothelial barrier function in culture by pure fatty acids and fatty acids derived from animal and plant fats. *J Nutr* 123/7 (1993) 1208-1216
67. Hennings H, Kruszewski FH, Yuspa SH, Tucker RW: Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. *Carcinogenesis* 10/4 (1989) 777-780
68. Heyliger CE, Kheshgi TJ, Murphy EJ, Myers-Payne S, Schroeder F: Fatty acid double bond orientation alters interaction with L-cell fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 155 (1996) 113-120
69. Hohoff C, Borchers T, Rustow B, Spener F, van Tilbeurgh H: Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. *Biochem* 38 (1999) 12229-12539

70. Huang H, Starodub O, McIntosh A, Kier AB, Schroeder F: Liver fatty acid-binding protein targets fatty acids to the nucleus. *J Biol Chem* 277/32 (2002) 29139-29151
71. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H: Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Brit J Dermatol* 137 (1997) 9-16
72. Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H: Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 4 (1999) 145-149
73. Iwig M, Czeslick E, Müller A, Gruner M, Spindler M, Gläßer D: Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 67/2 (1995) 145-57
74. Iwig M, Gläßer D: Cell-substratum interactions and the cytoskeleton in cell shape-mediated growth regulation of lens epithelial cells. *Lens Eye Toxic Res* 8/2-3 (1991) 281-309
75. Jalink K, Hengeveld T, Mulder S, Postma FR, Simon MF, Chap H, van der Marel GA, van Boom JH, van Blitterswijk WJ, Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human A431 cells: structure –activity analysis. *Biochem J.* 307 (1995) 609-616
76. Jaworski C, Wistow G: LP2, a differentiation- associated lipid binding protein expressed in bovine lens. *Biochem J* 320 (1996) 49-54
77. Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA: Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry* 34/37(1995):11928-37
78. Kao JPY: Practical Aspects of Measuring Ca²⁺ with fluorescent indicators. *Meth Cell Biol* 40 (1994) 155-181
79. Karvonen SL, Korkiamäki T, Ylä-Outinen H, Nissinen M, Teerikangas H, Pummi K, Karvonen J, Peltonen J: Psoriasis and altered calcium metabolism: downregulated capacitance calcium influx and defective calcium-mediated cell signaling in cultured psoriatic keratinocytes. *J Invest Dermatol* 114 (2000) 693-700
80. Kawasaki A, Han MH, Wei JY, Hirata K, Otori Y, Barnstable CJ: Protective effect of arachidonic acid on glutamate neurotoxicity in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Visual Science* 43/6 (2002) 1835-1842
81. Kehrer JP, Biswal SS, La E, Thuillier P, Datta K, Fischer SM: Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK886. *Biochem J* 356 (2001) 899-906
82. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26 (1972) 239-257
83. Kerschbaum S, Schweiger P: Untersuchungen über die Fettsäure- und Tocopherolgehalte von Pflanzenölen. *Informationen für die Pflanzenproduktion Sonderheft* 1 (2001)
84. Kippenberger S, Loitsch SM, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Dang TA, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A: Activators of peroxisome-proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 117 (2001) 1430-1436
85. Koegel H, Alzheimer C: Expression and biological significance of Ca²⁺-activated ion channels in human keratinocytes. *FASEB J.* 15 (2001) 145–154
86. Koizumi H, Yasui C, Fukaya T, Ohkawara A, Ueda T: Beta-adrenergic Stimulation induces intracellular Ca⁺⁺ increase in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 96/2 (1991) 234-237

87. Kömüves LG, Hanley K, Man MQ, Elias PM, Williams ML, Feingold KR: Keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis: topical application of PPAR α activators restores tissue homeostasis. *J Invest Dermatol* 115 (2000) 361-367
88. Krutetskaia ZI, Lebedev OE, Krutetskaia NI, Kurilova LS: Effect of arachidonic and other fatty acids on the intracellular calcium concentration and calcium signaling in peritoneal macrophages. *Tsitologiya* 43/11(2001) 1051-60
89. Kumar MG, Hurwitz SA, Cotton J, Spandau DF: Subphysiological concentrations of extracellular calcium sensitize normal human keratinocytes to UVB-induced apoptosis. *Arch Dermatol Res* 291 (1999) 37-46
90. Kutz G, Peltner D: Aktuelle Formulierungskonzepte moderner Hautkosmetika am Beispiel der trockenen Haut. *Kosmet Medizin* 20/5 (1999) 244-249
91. Langman J: Medizinische Embryologie: Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen. 8.Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1989, S. 2-19
92. Lennarz B, Glanz D, Gläßer D: Calcium signals mediated by purinoceptors on bovine lens epithelial cells. *Nova Acta Leopoldina NF* 75/299 (1997) 137-144
93. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M: Human TREK2, a 2P domain mechanosensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275/37 (2000) 28398-28405
94. Li L, Tennenbaum T, Yuspa SH: Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium. *J Invest Dermatol* 106 (1996) 254-260
95. Li W, Tait JF: Regulatory effect of CD9 on calcium-stimulated phosphatidylserine exposure in Jurkat T lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 351/1 (1998) 89-95
96. Lipp P, Niggli E: Ratiometric confocal Ca²⁺-measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes. *Cell Calc* 14 (1993) 359-372
97. Liu KL, Belury MA: Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE₂ synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Lett* 127/1-2 (1998) 15-22
98. LSM 410 invert – Herstellerbeschreibung der Firma Zeiss, Jena
99. Ma ASP, Ozers J: Annexins I and II show differences in subcellular localization and differentiation-related changes in human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 288 (1996) 596-603
100. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA: Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J Biol Chem* 274/33 (1999) 22903-22906
101. McGovern UB, Jones KT, Sharpe GR: Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. *Br J Dermatol* 132 (1995) 892-896
102. Menon GK, Elias PM, Feingold KR: Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Brit J Dermatol* 130 (1994) 139-147
103. Molecular Probes Produktinformation: www.molecularprobes.com/handbook/sections/2000/html
104. Moll I: Unsere dynamische Haut. In Jung EG (Ed): *Dermatologie Duale Reihe*. Hippokrates, Stuttgart, 1998, S. 17-29
105. Moran JH, Mitchell LA, Grant DF: Linoleic acid prevents chloride influx and cellular lysis in rabbit renal proximal tubules exposed to mitochondrial toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 176/3 (2001) 153-61

106. Mukerjee P, Mysels KJ: Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. U.S. Department of Commerce (1971)
107. Napolitano A, Camera E, Picardo M, d'Ischia M: Reactions of hydro(pero)xy derivatives of polyunsaturated fatty acids/esters with nitrite ions under acidic conditions. Unusual nitrosative breakdown of methyl 13-hydro(pero)xyoctadeca-9,11-dienoate to a novel 4-nitro-2-oximinoalk-3-enal product. *J Org Chem* 67 (2002) 1125-1132
108. Necchi D: Apoptosis: cellular features and detection techniques in situ. *Bender MedSystems Information* (2000) 3-11
109. Nguyen N, Glanz D, Gläßer D: Fatty acid cytotoxicity to bovine lens epithelial cells: Investigations on cell viability, ecto-ATPase, Na⁺, K⁺-ATPase and intracellular sodium concentrations. *Exp Eye Res* 71 (2000) 405-413
110. Nicotera P, Zhivotovsky B, Orrhenius S: Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 16 (1994) 279-288
111. Oberle V, Kuhnt B, Glanz D, Rothe U: Comparison of parinaric acid in cellular- and model-membrane systems. *Eur J Cell Biol* 72/43 (1997) 78
112. Oberle V: Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf die Eigenschaften biologischer und Modellmembranen. Halle Univ., Math.-Natwiss.-Techn. Fak., Diss. (1999)
113. Pantaler E, Kamp D, Haest CW: Acceleration of phospholipid flip-flop in the erythrocyte membrane by detergents differing in polar head group and alkyl chain length. *Biochim Biophys Acta* 1509/1 2 (2000) 397-408
114. Paramio JM, Jorcano JL: Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Brit J Dermatol* 137 (1997) 44-50
115. Paus R, Menrad A, Czarnetzki BM: Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt* 46 (1995) 285-303
116. Pepe S, McLennan PL: Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* 105 (2002) 2303-2308
117. Pillai S, Cho S, Mahajan M, Frew L, Rawling AV: Synergy between vitamin D precursor 25-hydroxyvitamin D and short chain ceramides on keratinocyte proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings* 1 (1996) 39-43
118. Plewig G, Jansen T, Schürer NY: Das Stratum corneum. *Hautarzt* 48 (1997) 510-521
119. Podhaisky HP, Wohlrab W: Is the photoprotective effect of vitamin E based on its antioxidative capacity? *J Dermatol Sci* 28 (2002) 84-86
120. Poumay Y, Pittelkow MR: Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* 104 (1995) 271-276
121. Prescott SM: A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *J Biol Chem* 274/33 (1999) 22901
122. Reichert U, Michel S, Schmidt R: The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: Darmon M et Blumenberg M (Eds): *Molecular biology of the skin*. Academic Press 1992 San Diego, New York, Boston (usw.)
123. Reinartz J, Bechtel MJ, Kramer MD: Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor- α . *Exp Cell Res* 228 (1996) 334-340

124. Ridgeway EB, Ashley CC: Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun* 29 (1967) 229-234
125. Rösch W: Gastroenterologie. In: Duale Reihe: Innere Medizin, Hippokrates Stuttgart, 1999, S. 985
126. Roulin K, Hagens G, Hotz R, Saurat JH, Veerkamp JH, Siegenthaler G: A fatty acid-binding heterokomplex formed by S100A8 and S100A9 is the major fatty acid carrier in neutrophils and translocates from the cytosol to the membrane upon stimulation. *Exp Cell Res* 247 (1999) 410-421
127. Schiebler TH, Schmidt W, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kretschmann HJ, Kühnel W, Winckler J, Van der Zypen E: Zytologie. In: Schiebler TH et Schmidt W (Eds): *Anatomie*. 5. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 1991, S 5-31,
128. Schneewittchen. In: Grimm J, Grimm W (Eds): *Die Kinder- und Hausmärchen der Brüder Grimm*, Bd. II. Der Kinderbuchverlag, Berlin, 1953, S.16
129. Schneider IM, Wohlrab W: Fettsäuren und Epidermis. *Hautarzt* 48 (1997) 303-310
130. Schürer N, Plewig G, Elias PM: Stratum corneum lipid function. *Dermatologica* 183 (1991) 77-94
131. Schürer NY, Rippke F, Vogelsang K, Schliep V, Ruzicka T: Fatty acid uptake by cultured human keratinocytes grown in medium deficient in or supplemented with essential fatty acids. *Arch Dermatol Res* 291 (1999) 47-53
132. Schürer NY, Stremmel W, Grundmann JU, Schliep V, Kleinert H, Bass NM, Williams ML: Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: Comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and a human hepatoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1211 (1994) 51-60
133. Seegers JC, de Kock M, Lottering ML, Grobler CJ, van Papendorp DH, Shou Y, Habbersett R, Lehnert BE: Effects of gamma-linolenic acid and arachidonic acid on cell cycle progression and apoptosis induction in normal and transformed cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 56/4 (1997) 271-80
134. Seegers JC, Lottering ML, Panzer A, Bianchi P, Stark JH: Comparative anti-mitotic effects of lithium gamma-linolenate, gamma-linolenic acid and arachidonic acid, on transformed and embryonic cells. *Prostaglandin Leukotr Ess Fatty Acids* 59/4 (1998) 285-291
135. Sheu MY, Fowler AJ, Kao J, Schmuth M, Schoonjans K, Auwerx J, Fluhr JW, Man MQ, Elias PM, Feingold K: Topical peroxisome-proliferator-activated receptors reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol* 118 (2002) 94-101
136. Shvedova AA, Tyurina YY, Kawai K, Tyurin VA, Kommineni C, Castranova V, Fabisiak JP, Kagan VE: Selective peroxidation and externalization of phosphatidylserine in normal human epidermal keratinocytes during oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *J Invest Dermatol* 118 (2002) 1008-1018
137. Shvedova AA, Tyurina YY, Tyurin VA, Kikuchi Y, Kagan VE, Quinn PJ: Quantitative analysis of phospholipid peroxidation and antioxidant protection in live human epidermal keratinocytes. *Biosci Rep* 21/1 (2001) 33-43
138. Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Didierjean L, Hellman U, Saurat JH: Purification and characterization of the human epidermal fatty acid binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 302 (1994) 363-371

139. Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, Hagens G: A heterokomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* (1997) 9371-9377
140. Singer SJ, Nicholson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175 (1972) 720-731
141. Sklar LA, Hudson BS, Petersen M, Diamond J: Conjugated polyene fatty acids on fluorescent probes: spektroskopische characterization. *Biochemistry* 16 (1977) 813-819
142. Stryer L: *Biochemie*. 4.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1999
143. Strump DD, Fan X, Berk PD: Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res* 42 (2001) 509-520
144. Stützer C, Glanz D, Gläßer D: Transmembrane transport of fatty acids into bovine lens epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 72/S43 (1997) 32
145. Su MJ, Bikle D, Mancinati ML, Pillai S: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem* (1994) 14723-14729
146. Surette ME, Winkler JD, Fonteh AN, Chilton FH: Relationship between arachidonate-phospholipid remodeling and apoptosis. *Biochemistry* 35 (1996) 9187-9196
147. Tamura M, Kuwano H, Kinoshita T, Inagami T: Identification of linoleic and oleic acids as endogenous Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors from acute volume-expanded hog plasma. *J Biol Chem* 260/17 (1985) 9672-9677
148. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N: Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome-proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 22/14 (2002) 5114-5127
149. Thiele B: Einfluß von extrazellulärem Calcium auf die Anheftung von Keratinozyten in vitro. *Derm* 1 (1995) 85-87
150. Thio HB, Zomerdijk TPL, Oudshoorn C, Kempenaar J, Nibbering PH, Van der Schroeff JG, Ponc M: Fumaric acid derivatives evoke a transient increase in intracellular free calcium concentration and inhibit the proliferation of human keratinocytes. *Br J Dermatol*. 131 (1994) 856-861
151. Toborek M, Hennig B: Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 59(1994)60-65
152. Trimborn M, Iwig M, Glanz D, Gruner M, Gläßer D: Linoleic acid cytotoxicity to bovine lens epithelial cells: influence of albumin on linoleic acid uptake and cytotoxicity. *Ophthalmic Res* 32 (2000) 87-93
153. Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 94/2 (1982) 325-334
154. Tu CL, Oda Y, Bikle DD: Effects of a calcium receptor activator on the cellular response to calcium in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 113 (1999) 340-345
155. Uchiyama N, Yamamoto A, Kameda K, Yamaguchi H, Ito M: The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum by local inflammation rather than by circulating hormones. *J Dermatol Sci* 24/2 (2000) 134-141
156. Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, Bosley JA, Nicolaou A: The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* Feb 28;1580(2-3)(2002)150-60

157. Van Corven EJ, van Rijswijk A, Jalink K, van der Bend RL, van Blitterswijk WJ, Moolenaar WH: Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts: Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J.* 281 (1992) 163-169
158. Van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JFM, Daemen MJAP, Reutelingsperger CPM: Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 549-559
159. Vanden Heuvel JP: Peroxisome-proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr* 129 (1999) 575S-580S
160. Van der Lee KAJM, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PHM, Glatz JFC, Reneman RS, Van der Vusse GJ, Van Bilsen M: Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res* 41 (2000) 41-47
161. Vicanová J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten HK, Ponc M: Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* 111 (1998) 97-106
162. Vicanová J, Weerheim AM, Kempenaar JA, Ponc M: Incorporation of linoleic acid by cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 291 (1999) 405-412
163. Watt FM, Hudson DL, Lamb AG, Bolsover SR, Silver RA, Aitchison MJ, Whitaker M: Mitogens induce calcium transients in both dividing and terminally differentiating keratinocytes. *J Cell Sciences* 99 (1991) 397-405
164. Welzl E: Fette: Assimilation und Assimilationsprodukte. In: *Biochemie der Ernährung*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1985, S. 84-97
165. Westergaard M, Hennigsen J, Svendsen ML, Johansen C, Jensen UB, Schrøder HD, Kratchmarowa I, Berge RK, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, Kristiansen K: Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol* 116 (2001) 702-712
166. Whitfield JF, Bird, RP, Chakravarthy BR, Isaac RJ, Morley P: Calcium- cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor and maybe tumor promoter. *J Cell Biochem* S22 (1995) 74-91
167. Williams JR, Leaver HA, Ironside JW, Miller EP, Whittle IR, Gregor A: Apoptosis in human primary brain tumours: actions of arachidonic acid. *Prostaglandin Leukotr Ess Fatty Acids* 58/3 (1998) 193-200
168. Wohlrab D, Markwardt F: Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular Ca²⁺ concentration of human keratinocytes. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12 (1999) 257-265
169. Wohlrab D, Wohlrab J, Markwardt F. Electrophysiological characterization of human keratinocytes using the patch-clamp technique. *Exp Dermatol* 9 (2000) 219-223
170. Wohlrab D, Wohlrab J, Reichel H, Hein W: Is the proliferation of human chondrocytes regulated by ionic channels? *Journal of Orthopaedic Science* 6/2 (2001) 155-159
171. Yuspa SH, Dlugosz AA, Cheng CK, Denning MF, Tennenbaum T, Glick AB, Weinberg WC: Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 103 (1994) 90S-95S
172. Zakim D: Fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc Soc Exp Biol Med* 212 (1996) 5-14

173. Zhang G, Gurtu, V, Kain SR, Yan G: Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *BioTechniques* 23/3 (1997) 525-531
174. Zhu N, Wang Z: An assay for DNA fragmentation in apoptosis without phenol/ chloroform extraction and ethanol precipitation. *Analytical Biochem* 246 (1997) 155-158
175. Zimmerman AW, Veerkamp JH: Fatty-acid-binding proteins do not protect against induced cytotoxicity in a kidney cell model. *Biochem J* 360 (2001) 159-165

6.1. Quellennachweis der Abbildungen

- Abb. 1: Menon GK, Elias PM, Feingold KR: Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Brit J Dermatol* 130 (1994) 139-147
- Abb. 4: <http://www.ifremer.fr/dr/vvpbm/images/phospholipides.jpg>
- Abb. 8,9,10: www.molecularprobes.com/handbook/sections/2000/html
- Abb.2: http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/research/project_c/pro_c1/img9.gif
- Abb.3: www.omega.dawsoncollege.gc.ca/ray/cellmemb/401memb.htm
- Abb. 11: <http://208.7.154.206/gmoyna/biochem341/lecture30.html>
- Abb. 12: <http://www2.a-m-i.co.jp/daiichi-p/apopto.html>
- Abb.13: www.udel.edu/Biology/Wags/b667/lect7/lect7.htm
- Abb. 14: POC- Produktinformation Bachofer Reutlingen 1995

7. Thesen

1. HaCaT-Zellen (Human Adult low Calcium high Temperature Keratinocytes) sind spontan immortalisierte, nicht tumorigene Keratinozyten aus humaner Epidermis. Sie wachsen adhärent und können sich differenzieren. Für die Versuche wurden subkonfluente Kulturen verwendet, um wenig differenzierte Zellen zu untersuchen.
2. Fettsäuren werden von Keratinozyten aus der Umgebung aufgenommen. Hierbei wird ein Zusammenspiel von aktivem und passivem Transport über die Membran favorisiert.

Parinarsäure ist eine Fettsäure mit vier konjugierten Doppelbindungen, die in hydrophober Umgebung fluoresziert. Sie ist ein gutes Werkzeug, den Transport von Fettsäuren durch die Membran zu beobachten.

Die Aufnahme von Parinarsäure in relevantem Ausmaß erfolgt innerhalb von Minuten. Zunächst läßt sich ein Einbau in die Zellmembran und später und in geringerem Umfang eine Verteilung auf intrazelluläre Membranen nachweisen.

3. Der Umbau freier Fettsäuren ist ebenfalls ein schneller Prozeß. Nach Applikation von freier ^{14}C -Palmitinsäure kann die Radioaktivität bereits nach zehn Minuten in elf verschiedenen Lipidfraktionen nachgewiesen werden.
4. Ungesättigte Fettsäuren führen an HaCaT-Zellen zur Membranpermeabilisierung. Untersucht wurde das Eindringen großer, hydrophiler Moleküle des 6-Carboxyfluoreszeins (6-CF) in das Zellinnere. Da für 6-CF kein Transportmechanismus bekannt ist, geht man von Membranstörungen aus, die das Vorhandensein intrazellulären 6-CFs bedingen.
5. Durch die Applikation mittlerer und hoher Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren kann es zur lokalen Membranruptur mit Auslaufen des Zytosols und Tod der Keratinozyten kommen. Besonders häufig tritt dies bei Behandlung der Zellen mit Arachidon- und Linolsäure auf, seltener bei Verwendung von Ölsäure.

6. Freie Fettsäuren sind schon in niedrigen Konzentrationen in der Lage, den intrazellulären pH-Wert von Keratinozyten zu senken.
7. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen stellt eine gute Methode zur Calciumkonzentrationsmessung vitaler Zellen dar, weil sie mit einer sehr geringen Zellbeeinflussung auskommt. Jedoch ist eine Kalibrierung oft fehlerbehaftet und teilweise nicht durchführbar. Daher betrachten wir Fluoreszenzänderungen als Maß für Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration.
8. Die Applikation freier Fettsäuren und nativer Öle führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration. Dessen Ausmaß war abhängig von
 - der Konzentration der gewählten Fettsäure, wobei eine höhere Fettsäurekonzentration einen höheren Anstieg bewirkte.
 - der Zahl der Doppelbindungen der gewählten Fettsäure. Je mehr Doppelbindungen im Molekül der Fettsäure vorhanden waren, desto höher fiel der Anstieg aus.
 - dem Kulturalter der Keratinozyten. Ältere Keratinozyten waren unempfindlicher gegenüber Fettsäuren, der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration war bei ihnen geringer.

Die Kettenlänge der verwendeten Fettsäure hatte keinen Einfluß auf die Höhe der Änderung der Calciumkonzentration. Ebenso ist der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei gesättigten Fettsäuren, einer physiologischen Fettsäuremischung mit einem Anteil ungesättigter Fettsäuren von 56% und nativen Ölen mit Anteilen ungesättigter Fettsäuren von bis ca. 90% etwa gleich.

9. Es bestehen Hinweise für parakrine Effekte innerhalb größerer Zellhaufen, wobei größere, weniger flache, möglicherweise differenziertere Keratinozyten umliegende Zellen zu beeinflussen scheinen. Dabei ist die Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration um so geringer, je geringer der Abstand zwischen der betrachteten Zelle und der fraglich differenzierteren Zelle ist.

10. Durch Applikation freier ungesättigter Fettsäuren kann man in Keratinozyten eine Apoptose auslösen. Es kommt jedoch auch bei extrem hohen Konzentrationen (510µM Linolsäure) nicht zu einem signifikanten Anstieg der Nekroserate im Vergleich zur Kontrolle. Bei ca. der Hälfte der Zellen konnte selbst nach einstündiger Inkubation mit 170µM Linolsäure keine Nekrose oder externalisiertes Phosphatidylserins als frühes Apoptosemerkmal nachgewiesen werden. Gesättigte Fettsäuren, eine physiologische Fettsäuremischung sowie native Öle lösen in Konzentrationen bis 170µM keine Apoptose aus.

Nach Applikation mittlerer Konzentrationen (42,5µM) von Arachidonsäure und Linolsäure kommt es häufig zur Kernpyknose als Zeichen der eingeleiteten Apoptose.

11. Langzeitinkubationen mit hohen Konzentrationen von Fettsäuren zeigen, daß:

- hohe Konzentrationen von Linolsäure zum Tode vieler, aber nicht aller HaCaT-Zellen führen – einige sind auch nach fünf Tagen noch vital und unterscheiden sich morphologisch nicht von unbehandelten Zellen.
- hohe Konzentrationen von gesättigten Fettsäuren keinen Einfluß auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen haben.

12. Die Ergebnisse zeigen, daß ungesättigte Fettsäuren in freier Form proapoptotisch auf HaCaT-Zellen wirken, diese Wirkung jedoch im Gemisch miteinander und mit gesättigten Fettsäuren oder durch Kopplung an Glycerol in Form von Ölen nicht nachweisbar ist. Besonders die apoptoseinduzierende Wirkung mittlerer Konzentrationen von Linolsäure an hyperproliferativen (Bonnekoh et al. 1991) *in-vitro* kultivierten humanen Keratinozyten läßt eine *in-vivo* Testung zur topischen Therapie bei hyperproliferativen Hauterkrankungen sinnvoll erscheinen.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Bettina Kuhnt
Wohnort: Alte Paulsbreite 1
06779 Raguhn

Geburtstag: 9. Juli 1974
Geburtsort: Zerbst
Familienstand: ledig

Ausbildung

9/1981-8/1990 Allgemeinbildende Schule in Wolfen
9/1990-6/1993 Gymnasium Wolfen-Stadt
6/1993 Abitur
10/1993-5/2000 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
5/2000 Ärztliche Prüfung

Berufstätigkeit

7/2000-1/2002 ÄiP in der Klinik für Kinderheilkunde und Klinik für
Kinderkardiologie der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
1/2002-3/2002 Assistenzärztin in der Kinderklinik der
seit 12/2002 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 25.03.2003

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind in der Arbeit unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich erkläre außerdem, dass ich zum ersten Mal eine Arbeit zur Promotion vorlege. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht.

Bettina Kuhnt

Danksagung

Hiermit möchte ich danken

Herrn Prof. Dr. habil. D. Gläßer für die Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. habil. W. Wohlrab für die Beratung, insbesondere bezüglich der Keratinozyten, und die Ermöglichung der Versuche an HaCaT-Zellen.

Herrn Dr. D. Glanz für die theoretische und praktische Betreuung der Arbeit, für sein stets offenes Ohr, die zahlreichen Anregungen und nicht zuletzt für die schnellen Korrekturen.

Frau K. Hölsken und Frau M. Schmidt für die Versorgung mit kultivierten HaCaT-Zellen für die Experimente und ihre tatkräftige Unterstützung bei den in der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten durchgeführten Versuchen.

Frau A. Wolter für die Mithilfe bei der praktischen Umsetzung der Calciummessungen.

Herrn Dr. M. Trimborn für seine Hilfe bei der Durchführung der Lipidextraktionen mit radioaktiv markierter Palmitinsäure und viele Tips zur Dünnschichtchromatographie.

Frau K. Manikowski für ihre Ausdauer und Kompetenz bei der statistischen Auswertung und beim Korrekturlesen und besonders für ihre stete Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. U. Rothe für die Überlassung von Labormaterialien.

Frau Dr. B. Lennarz, Frau Dr. C. Stützer, Frau Dr. D. Gerlach, Frau C. Temme, Herrn Dr. K. Lennarz und Herrn Dr. J.-U. Lechner für die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Herrn N. Muthmann, Herrn S. Brand und Herrn D. Bormke für tatkräftige Hilfe bei PC-Problemen.

und meinen Eltern, ohne die es nie so weit gekommen wäre.

Publikationen

Oberle V, Kuhnt B, Glanz D, Rothe U: Comparison of parinaric acid in cellular- and model-membrane systems. *Eur J Cell Biol* 72/43 (1997) 78

Glanz D, Fröde D, Kuhnt B, Wohlrab W, Gläßer D: Measurements of fatty acid induced changes of intracellular free calcium-concentration in cultured keratinocytes – a comparison of methods. *Biol Chem* 377S (1996) 194