

Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf in vitro kultivierte humane Keratinozyten



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von Diplom-Biochemiker Dirk Fröde
geboren am 16.06.1968 in Dresden

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Wohlrab
2. Prof. Dr. R. Neubert
3. Prof. Dr. B. Bonnekoh

Halle (Saale), 18.12.1998

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1.	Theoretische Grundlagen instrumenteller Analytik	5
2.2.	Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse	6
2.3.	Chemikalien und Materialien	7
2.4.	Keratinocyten	13
2.4.1.	HaCaT-Keratinocyten	13
2.4.2.	Native Keratinocyten	13
2.5.	Methoden	14
2.5.1.	Zellkultivierung und -präparation	14
2.5.2.	Probenvorbereitung	14
2.5.3.	Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation	15
2.5.3.1.	Bestimmung der Proliferation mittels eines radioaktiven Markers	15
2.5.3.2.	Durchflußzytometrische DNA-Bestimmung nach Einwirkung von freien Fettsäuren	15
2.5.3.3.	Bestimmung der Proliferation durch den Nachweis eines Zellzyklus-assoziierten Antigens	16
2.5.4.	Elektronenmikroskopische Identifizierung zellulärer Organellen	17
2.5.5.	Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader	17
2.5.5.1.	Änderung der freien Ca^{2+} -Konzentration als Funktion der Fettsäurekonzentration und der Zeit am Durchflußzytometer	18
2.5.5.2.	Änderung der freien Ca^{2+} -Konzentration als Funktion der Fettsäurekonzentration und der Zeit am Fluoreszenzreader	18
2.5.6.	Durchflußzytometrische Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials unter Einfluß von Fettsäuren	19
2.5.7.	Ausgewählte Methoden zum Verlauf des programmierten Zelltodes (Differenzierung und Apoptose)	19
2.5.7.1.	Einfluß von freien Fettsäuren auf die Expression ausgewählter Differenzierungsmarker	19
2.5.7.2.	Nachweis der Apoptose mit Annexin-V-FLUOS	21

2.5.7.3.	Apoptosenachweis mittels In Situ Cell Death Detection Kit	22
2.5.7.4.	Apoptosenachweis mit Cell Death Detection ELISA	22
2.5.7.5.	Durchflußzytometrischer Nachweis des Tumorsuppressorproteins p53 als Funktion der Fettsäurekonzentration und Zeit	23
2.5.7.6.	Nachweis Apoptose-assoziiierter Proteine bcl-2 und bax in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration	23
2.5.7.7.	Molekularbiologischer Nachweis von p53 Protein mittels Western Blotting	24
2.5.7.8.	Molekularbiologischer Nachweis von MDM2 Protein mittels Western Blotting	24
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
3.1.	Proliferation von HaCaT-Zellen unter Einwirkung von freien Fettsäuren	25
3.2.	Strukturveränderungen zellulärer Organellen unter dem Einfluß von Linolsäure	29
3.3.	Änderung der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration	34
3.3.1.	Ca ²⁺ -Kalibrierung	35
3.3.2.	Einfluß von Fettsäuren auf die freie intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration in Keratinocyten	38
3.4.	Änderung des mitochondrialen Membranpotentials von Keratinocyten unter Einfluß von Fettsäuren	44
3.5.	Differenzierung und Apoptose von Keratinocyten	46
3.5.1.	Einfluß von Fettsäuren auf die Differenzierung von Keratinocyten	46
3.5.2.	Apoptose von Keratinocyten	49
3.5.2.1.	Nachweis der Apoptose von Keratinocyten unter Einfluß von Fettsäuren mit Annexin-V-FLUOS	52
3.5.2.2.	Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von der Fettsäure-Konzentration	54
3.5.2.3.	Zeitlicher Ablauf der Apoptose nach Induktion mit freier Fettsäure	58
3.5.2.4.	Apoptosenachweis mit dem TUNEL-Test	60
3.5.2.5.	Apoptosenachweis über Histon-assoziierte-DNA-Fragmente	63
3.5.3.	Einfluß von freien Fettsäuren auf die Mobilisierung Apoptose-assoziiierter Proteine	64
3.5.4.	Exprimierung der Proteine bcl-2 und bax in Abhängigkeit zur Fettsäurekonzentration	67
3.5.5.	Western-Blotting von p53- und MDM2-Protein	70

4.	DISKUSSION	73
5.	ZUSAMMENFASSUNG	76
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	82
8.	LITERATUR	84

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Haut ist eines der größten und komplexesten Organe des menschlichen Körpers. Sie läßt sich proximal nach distal in Subcutis (Unterhaut), Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) untergliedern und fungiert als Grenzorgan zwischen Organismus und Umwelt, ist Schutz gegen exogene mechanische, physikalische und mikrobielle Einflüsse und übernimmt immunologische und kommunikative Aufgaben (Abb. 1).

Die Subcutis, bestehend aus einem lockerem Bindegewebe mit eingelagerten Fettzellen, dient hauptsächlich als Energiespeicher und Kälteschutz. Die Funktion der Dermis ist durch ihre fibrilläre Proteinstruktur (Kollagene, Elastin), wie mechanische Stabilität und Reißfestigkeit, gegeben. Sie ist Träger versorgender Gefäße und Nerven sowie auch Bildungsort von Plasmazellen (immunkompetente Zellen) und Mastzellen (Speicher für biologisch aktive Substanzen). Bei der Epidermis, der auch die Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, Drüsen) zugeordnet werden, handelt es sich um ein etwa 0,03 bis 0,25 mm dickes, mehrschichtiges Plattenepithel. Mit einem Anteil von ca. 90 % sind die Keratinozyten neben Melanozyten, Langerhanszellen und Fibroblasten die dominierende Zellpopulation. Ihre Differenzierung von teilungsfähigen, metabolisch aktiven bis hin zu toten, kernlosen, keratinisierten und abgeflachten Zellen rechtfertigt eine weitere morphologische und funktionelle Unterscheidung in vier epidermale Schichten (Fritsch, 1990).

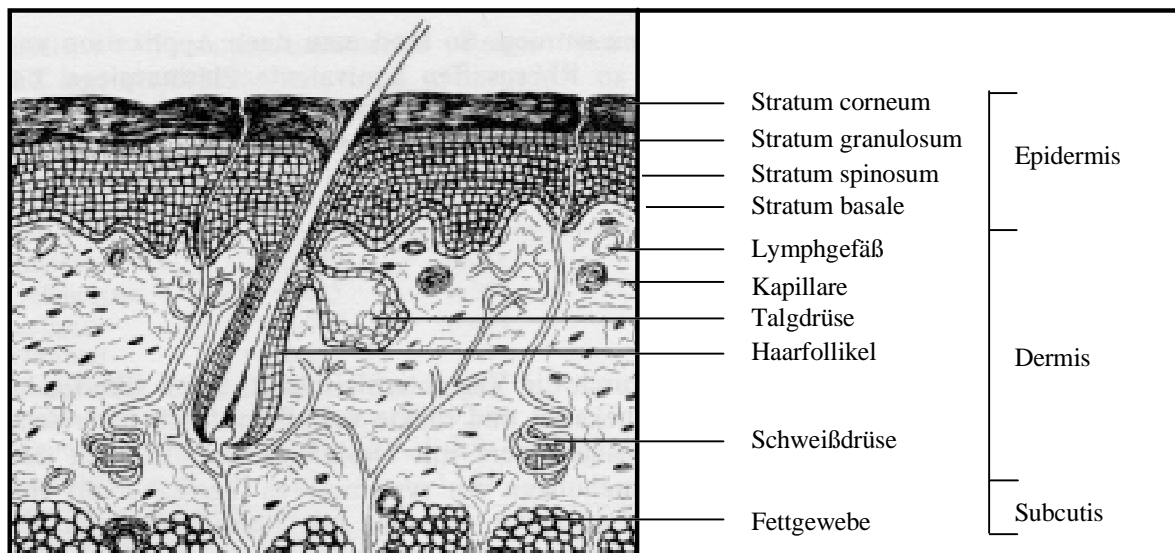


Abb. 1 Aufbau der Haut

(schematische Darstellung; modifiziert nach Pfeiffer et al., 1988)

Die Keratinozyten sind die dominierende Zellpopulation in der Epidermis. Durch die Aufnahme von exozytierten melaninhaltigen Melanosomen aus den Melanozyten bauen sie einen Schutz gegen die gefährliche Ultraviolettstrahlung auf.

HaCaT-Keratinozyten sind ein häufig angewandtes Modell zum Studium des epidermalen Lipidmetabolismus. Nachweislich sind diese Zellen unter *in vitro* Bedingungen zur Synthese aller in der Epidermis enthaltenen Lipide befähigt. Ist die Keratinozytendifferenzierung in der Kultur bis zum Aufbau fast aller epidermalen Schichten erweitert, dann ist die Lipidklasse indikativ für einen kompletten Hautaufbau. Die Keratinozyten synthetisieren *in vivo* Lipide, die in lamellaren granulären Körpern verpackt werden und die während der Enddifferenzierung beim Übergang zum Stratum corneum exozytiert werden. Die Lipide bilden in dem Extrazellularraum des Stratum corneum multiple Bilayerschichten zum Aufbau einer Barriere. Die Reifung des Keratinozyten zum Corneozyten als enddifferenzierten Zustand ist dabei vielfältigen Regulationsprozessen unterworfen. Die als Endprodukt dieses Entwicklungsprozesses der Differenzierung gebildete Hornschicht erfüllt die Aufgabe einer Permeabilitätsbarriere zum Schutz gegen verschiedene Umwelttoxine. Andererseits steuert sie als äußerste Barriere zur Umwelt die Abgabe von körpereigenen Substanzen, vornehmlich den transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Fehlregulationen dieses Differenzierungsprozesses, die mit einer Störung der Permeabilitätsbarriere durch Verlust an Lipiden und freien Fettsäuren einhergehen, können oft ursächlich mit der Pathogenese sehr unterschiedlicher Dermatosen verbunden sein (z.B. Neurodermitis) oder treten erst sekundär im Ablauf von Erkrankungen in Erscheinung (z.B. Psoriasis vulgaris).

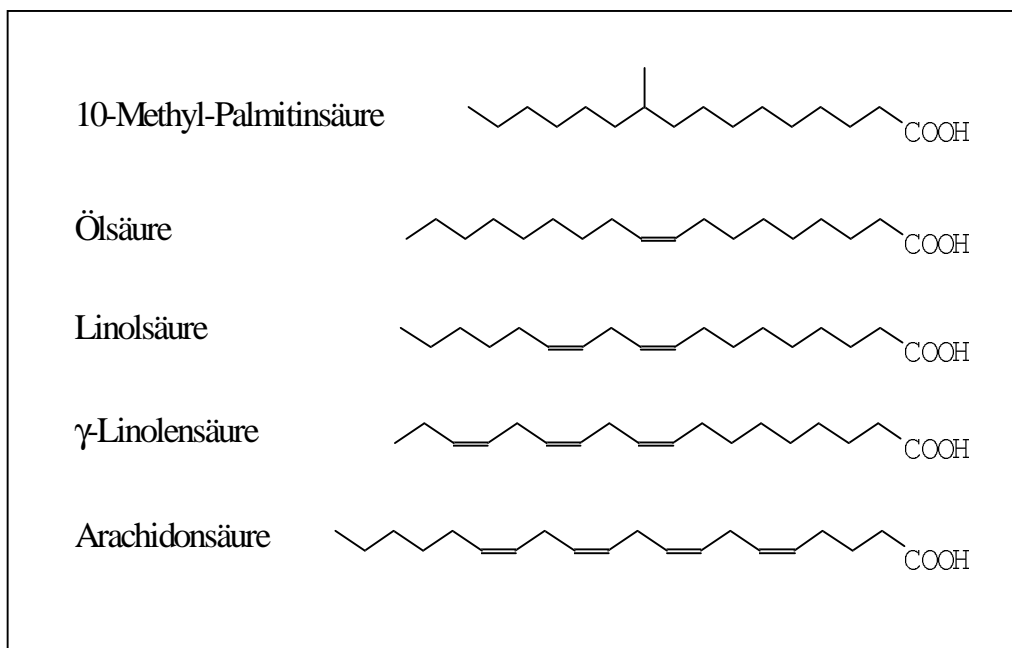
Freie Fettsäuren haben in der Epidermis eine große Bedeutung für den Aufbau einer funktionierenden Barrierefunktion. So existiert ein regelrechter Lipidgradient im Stratum corneum, der durch unterschiedliche Anteile von freien Fettsäuren in Abhängigkeit von ihrer Molekülstruktur charakterisiert ist (Bonte et al., 1997). Elias (1996) beschreibt in diesem Zusammenhang die Architektur, die metabolische Aktivität und die Interaktivität des Stratum corneums mit den darunterliegenden Zellschichten, mit Hauptaugenmerk auf die epidermale Lipidsynthese. Ein Mangel an freien Fettsäuren in der Epidermis bedingt eine verringerte Barrierefunktion mit einem steigenden transepidermalen Wasserverlust (TEWL). Sie ist begleitet von einem trockenen und schuppigen Phänotyp der Haut und häufiger epidermaler Hyperproliferation. Als kurative bzw. palliative Therapie einer solchen funktionell gestörten Haut steht an erster Stelle die Wiederherstellung der Barrierefunktion durch externe Gabe von freien Fettsäuren in Form von galenisch angepaßten Formulierungen (Buslau und Thaci, 1996).

Die freien Fettsäuren sind aber auch in pharmakologischer Hinsicht als sogenannte Penetrationsenhancer in der topischen Therapie von Interesse. Sie können den Transport koapplizierter Arzneistoffe in und durch die Haut beeinflussen und sind somit geeignet, die topische Therapie ausgewählter Arzneistoffe zu modulieren. Hierbei spielt das Ausmaß ihrer Wechselwirkungen mit den SC-Lipiden, Vehikelbestandteilen und dem Wirkstoff für dessen

Transport eine wichtige Rolle (Golden et al., 1987; Aungst et al., 1990). Unter den freien Fettsäuren nimmt die Ölsäure eine Schlüsselrolle als Penetrationenhancer ein (Niazy, 1991). So bewirkt die Ölsäure zum Beispiel eine gesteigerte Penetration von Hydrocortison in das Stratum corneum (Schneider, 1997).

Unbestritten ist jedoch, daß die externe Applikation von freien Fettsäuren nach Eigenpenetration nicht nur zur aktiven Wechselwirkung mit den interkorneozytären Lipiden führt (Cooper, 1984), sondern ihre Penetration bis in die Dermis nachgewiesen ist (Schneider, 1997). Der Nachweis des Mechanismus der Wechselwirkungen von Keratinozyten und freien Fettsäuren ist noch nicht ausreichend geklärt. Daß die freien Fettsäuren von den Keratinozyten aufgenommen werden, wurde unter anderem von Schürer et al. (1989) an neonatalen Vorhautkeratinozyten nachgewiesen, sowie die Aufnahme von Fettsäuren an, aus Mammahaut gewonnenen Keratinozyten (Schürer et al., 1994). In welcher Art und Weise die freien Fettsäuren mit den Keratinozyten in Wechselwirkung stehen, ist von besonderem wissenschaftlichen Interesse. Zu klären sind Fragen des direkten Einflusses freier Fettsäuren auf die Keratinozyten (z.B. Proliferation, Differenzierung) und durch Fettsäuren induzierte Änderungen biochemischer Prozesse (z.B. mitochondriales Membranpotential, Proteinexpression).

Einige Vertreter der in der menschlichen Haut reichlich vorhandenen freien Fettsäuren sind in Abb. 2 dargestellt, zusätzlich eine methylverzweigte Palmitinsäure (10-Methylhexadecansäure; MP), als Beispiel einer substituierten Fettsäure. Der Anteil der im Organismus vorkommenden Majorfettsäuren ist ungesättigt bzw. gesättigt und nicht verzweigt. Verzweigte Vertreter, sogenannte Minorfettsäuren, wurden im Wollfett des Schafes bzw. in den Milchlipiden diverser Wirbeltiere gefunden (Breusch und Kapicioglu, 1971; Nuhn et al., 1985), aber auch in menschlichen Hautoberflächenlipiden konnten endogene gesättigte, z.T. mehrfach methylverzweigte Vertreter nachgewiesen werden (Nicolaidis und Apon, 1977).



**Abb. 2 Majorfettsäuren im Stratum corneum (schematische Strukturformeln);
10-Methyl-Palmitinsäure - Minorfettsäure**

Fettsäuren, die ungesättigt bzw. verzweigt sind, können die Membranfluidität entscheidend heraufsetzen. Durch eine verstärkte Fluidität ist ein positiver Effekt im Sinne eines Penetrationsenhancers zu erwarten. Vertreter der gesättigten Fettsäuren (z.B. Palmitin- und Stearinsäure) führen in der Lipidbarriere der Haut und in Zellmembranen Keratinozyten zu einer Verdichtung und Veränderungen des Barrieregefüges.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war, den Einfluß ungesättigter freier Fettsäuren auf die Proliferation und Differenzierung humaner Keratinozyten besser zu charakterisieren. Dazu wurden neben Untersuchungen zum Zellzyklus und der Keratinozytendifferenzierung vor allem Hinweise über den Pathomechanismus dieser Vorgänge durch Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes, der Apoptose sowie der Expression Apoptose-assoziiierter Proteine erfaßt.

Die Kenntnisse dieser Vorgänge könnten einerseits zum besseren Verständnis des Pathomechanismus verschiedener Dermatosen beitragen, andererseits die gezielte Nutzung dieser Eigenschaften von freien Fettsäuren in galenischen Formulierungen zur Therapie und/oder Prophylaxe eingesetzt werden.

MATERIAL UND METHODEN

Theoretische Grundlagen instrumenteller Analytik

Durchflußzytometrie

Das Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel analysiert. Meist besitzen die Geräte nur eine Meßstelle zur multiparametrischen Analyse. Es können Zellen über Mehrfarbenfluoreszenzmessungen differenziert werden, wobei die Möglichkeiten eines Fluoreszenzmikroskopes übertroffen werden. Als Lichtquelle dienen meist Laser bestimmter Wellenlänge.

Fluoreszenzreader

Fluoreszenzreader ermöglichen die schnelle fluoreszenzspektroskopische Analysierung von in Mikrotiterplatten kultivierten Zellen. Als Lichtquelle dienen Quarz-Halogenlampen mit einem breiten Wellenlängenspektrum, welches durch Anregungs- und Emissionsfilter den Versuchsbedürfnissen angepaßt werden kann. Der Vorteil gegenüber der Durchflußzytometrie besteht in der Möglichkeit, adhärent gewachsene Zellen fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen, als Nachteil ist die nicht bestimmbare Zellanzahl zu nennen.

Flüssigkeitsszintillationszähler

Die Flüssigkeitsszintillation dient zum quantitativen Nachweis schwacher radioaktiver Betastrahlung, wie sie von den Isotopen ^{14}C , ^3H und ^{35}S ausgehen. Die schwache radioaktive Strahlung wird mit Hilfe spezieller organischer Verbindungen (Szintillatoren) in Licht umgesetzt, wobei die Lichtenergie und Menge sich proportional zur radioaktiven Strahlung des zu messenden Stoffes verhalten. Hochempfindliche Sensoren (Photomultiplier) registrieren das so entstandene Licht. Es handelt sich hierbei um ein quasi-photometrisches Verfahren.

Western-Blotting

Der Western-Blot ist eine Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese mit anschließendem Blotten der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (oder PVDM-Membran). Die auf die Membran geblohteten Proteine können durch Antikörper markiert bzw. bestimmt und je nach eingesetzten Antikörpern die Proteinbanden mittels Fluoreszenz oder Radioaktivität sichtbar gemacht werden.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SigmaStat Software (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, BRD). Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ betrug (Weber, 1980).

Bei Stichprobenumfängen von mindestens 10 Einzelwerten wurden die Werte auf sogenannte Ausreißer untersucht. Ein Wert darf als Ausreißer verworfen werden, wenn er außerhalb des Bereiches $\bar{x} \pm 4s$ liegt, wobei Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (s) ohne den ausreißerverdächtigen Wert berechnet werden (Sachs, 1992).

Proliferation von humanen Keratinozyten (³H-Thymidineinbau)

Auf der Grundlage der Meßergebnisse von mindestens 48 Meßwerten pro Kulturtag wurden signifikante Unterschiede mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Der parameterfreie Test (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks), der die analogen Hypothesen der Varianzanalyse verteilungsunabhängig prüft, wurde ausgewählt, weil die Mehrzahl der Daten die Anforderungen parametrischer Tests nach normalverteilten Varianzen nicht erfüllte.

Apoptosenachweis mit Cell Death Detection ELISA

Zur Prüfung auf signifikante Differenzen kam die Varianzanalyse (One Way Analysis of Variance) zur Anwendung, da es sich um Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz handelte. Unterschiede zwischen den einzelnen Mittelwerten wurden durch paarweise Vergleiche nach dem Student-Newman-Keuls-Verfahren bestimmt.

Einfluß von Fettsäuren auf Apoptose-assoziierte Proteine

Durch paarweisen Vergleich der Meßgruppen gegenüber der 100% Kontrolle wurden signifikante Unterschiede mittels des Student-Newman-Keuls-Testes der p53-Versuche bestimmt. Auf Grund unterschiedlich großer Stichprobenumfänge der bcl-2 Bestimmung wurde der Dunn's-Test zur Auswertung herangezogen. Die statistische Begutachtung des bax-Versuches erfolgte nach dem Kruskal-Wallis-Verfahren (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks).

Chemikalien und Materialien

Substanzen: *Chemikalien (allgemein)*

A23187	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, BRD
Albumin bovine Fraction V	SERVA, Heidelberg, BRD
BenchMARK™ Protein Ladder (Standardmarker)	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Calciumchlorid geschmolzen granuliert p.a.	Merck, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat reinst	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Dithioerythritol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
ECL-Reagenz	Amersham-Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, BRD
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) p.a.	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) p.a.	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Flüssigkeitsszintillationscocktail	Ultima Gold Canberra Packard GmbH, Dreieich, BRD
Glucose wasserfrei (für biochemische Zwecke)	Merck, Darmstadt, BRD
Glycerol	Merck, Darmstadt, BRD
HEPES-Puffer	SERVA, Heidelberg, BRD
Kaliumchlorid (KCl)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Milchpulver (MP)	handelsüblich
Natriumchlorid (NaCl) reinst p.a.	Merck, Darmstadt, BRD
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Ribonuclease A (82 Kunitz U/mg)	SERVA, Heidelberg, BRD
Trans-Blot® Transfer Medium (PVDM-Membran)	Bio-RAD Laboratories, Hercules, California, USA

Tritiumthymidin ³ H-TdR (185 MBq in 5 ml; spezif. Aktivität 60,3 Ci/mmol) Radioaktivität im Versuch 0,5 µCi/ml	Amersham-Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, BRD
Tween 20 pur	SERVA, Heidelberg, BRD
<i>Immunologische Substanzen</i>	
Antikörper anti-PCNA	F863 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
Isotypenkontrolle: ms-IgG2a/FITC	X933 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
anti-p53-FITC low F/P	F7054 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
Isotypenkontrolle: ms-IgG2b-FITC low F/P	X0959 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
anti-Involucrin	NCL-INV Novocostra Laboratories Ltd., Newcastle, United Kingdom
Isotypenkontrolle: ms-IgG1	X931 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
sek. AK: Fab-Kanin.-anti-ms-FITC	F313 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
anti-Filaggrin	4480-9004 Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, BRD
Isotypenkontrolle: ms-IgG1	X931 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
sek. AK: Fab-Kanin.-anti-ms-FITC	F313 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
anti-bax	2041 Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, BRD
Isotypenkontrolle: ms-IgG2b	1266 Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, BRD
sek. AK: Fab-Kanin.-anti-ms-FITC	F313 DAKO [®] Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD

anti-bcl-2-FITC	F7053 DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
Isotypenkontrolle: ms-IgG1-FITC	X0927 DAKO® Diagnostika GmbH, Hamburg, BRD
<i>Fluoreszenzfarbstoffe</i>	
FLUO 3/AM	Mo Bi Tec (Molecular Biologische Technologie), Göttingen, BRD
Propidium Iodide	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BRD
Rhodamine 123	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BRD
<i>Puffersysteme und Kits</i>	
Annexin-V-FLUOS	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD
Calcium-Calibration-Buffer Kit #2	Mo Bi Tec (Molecular Biologische Technologie), Göttingen, BRD
Cell Death Detection ELISA	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD
DNA-Färbelösung	50µg Propidium iodide/ml 5 Kunitz units/ml Ribonuclease A gelöst in PBS

HEPES buffered salt solution (HBSS)

145 mM	NaCl	
4 mM	KCl	
10 mM	D-Glucose	
2 mM	MgCl ₂	
10 mM	HEPES	
		pH 7.4
Versuche mit extrazellulärem Calcium	2 mM	CaCl ₂
Versuche ohne extrazellulärem Calcium	0,1 mM	CaCl ₂
	0,4 mM	EGTA

In Situ Cell Death Detection Kit

Boehringer Mannheim GmbH,
Mannheim, BRD

Lämmli-Puffer

- 0,1 M KH₂PO₄
 - 0,1 M Na₂HPO₄
- 2 ml (1.) + 8 ml (2.)
5 g SDS
10 g Glyzerol
10 g Dithioerythritol
auf 100 ml mit aqua dest. einstellen, pH 7.5

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

0,137 M;	8,00 g	NaCl
	0,20 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
	0,20 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1000 ml aqua. dest.	
	pH 7.4 einstellen mit NaHCO ₃	

PUCK-EDTA

0,40 g	KCl
8,00 g	NaCl
0,35 g	NaHCO ₃
1,00 g	D-Glucose
0,255 g	0,02 % EDTA
	ad 1000 ml aqua dest.

Fettsäuren

Arachidonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
Linolsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
γ -Linolensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD
10-Methyl-Palmitinsäure	Institut für Pharmazeutische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, BRD
Ölsäure purum	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz

Lösungsmittel-/vermittler

Ethanol 96% reinst	Merck, Darmstadt, BRD
Dimethylformamid (DMF)	VEB Laborchemie Apolda, DDR
Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Synthese	Merck, Darmstadt, BRD
Methanol z.A.	Laborchemie Apolda GmbH, BRD
Pluronic F-127	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, BRD

Zellmedium/Zusätze

Keratinocyte-SFM	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD
Supplements for Keratinocyte-SFM	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD
Trypsin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, BRD

Geräte und Hilfsmittel

Analytisches 5-Parameter-Durchflußzytometer (Becton Dickinson)
[5-Parameter-Zellanalyse-Gerät mit simultaner Messung von Vorwärts-Lichtstreuung und 3
Fluoreszenzen; mit luft-gekühltem Argonlaser (488 nm-Linie); Meßsignalverstärkung linear
bzw. logarithmisch; Signalauflösung 1024 Kanäle)]

Software:	Systemsoftware PASCAL 3.22 CellFit-Software Version 2.01.2 Lysis II Vers. 1.1 Chronys™	
Mikrotiterplattenreader Fluoroskan Ascent Anregung 485 nm; Emission 538 nm		Labsystems, Helsinki, Finnland
Software:	Ascent Research Edition Vers. 1.2.1.	
Mikrotiterplattenreader iEMS Reader MF Apoptosemessung: 405 nm; Ref.-Filter 492 nm LDH: 492 nm; Ref.-Filter 620 nm Software: SeroCalc Vers. 4.0		Labsystems, Helsinki, Finnland
Cell-Harvester und Vakuum-Controller		INOTECH, ICH-110, Wohlen, Schweiz
Flüssigkeitsszintillationszähler		Wallac 1410, Berthold, Berlin, BRD
Zentrifuge Biofuge primo		Heraeus-Instruments, Zweigniederlassung Gera, BRD
Elektrophoresekammer		Biometra - biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, BRD
Miniblotsystem		Biometra - biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, BRD
Stromversorgungsgerät		Biometra - biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, BRD
Elektronenmikroskop 10A, Operationsspannung 60 kV		Carl Zeiss, Oberkochen, BRD
Kulturflaschen bzw. -platten		Greiner GmbH, Frickenhausen, BRD

Keratinocyten

HaCaT-Keratinocyten

Die humane Keratinocytenzelllinie HaCaT (human adult low calcium high temperatur keratinocytes) sind spontan immortalisierte, nicht tumorbildende Keratinocyten mit vollständig erhaltener Differenzierungskapazität, die bei niedrigem Calcium-Gehalt im Medium wachsen. Die Zellen entstammen der Peripherie eines malignen Melanoms von der oberen Rückenhaut eines 62 Jahre alten Mannes. Der Karyotyp der Zellen ist aneuploid (Schürer et al., 1993; Boukamp et al., 1996). Molekularbiologisch ist nachgewiesen, daß die HaCaT-Zellen auf beiden Allelen des p53-Gens mutiert sind. Diese Mutation zeigt im Vergleich zu anderen Zelllinien in der HaCaT-Zelllinie keine benignen bzw. malignen Eigenschaften (Lehman et al. 1993; Boukamp et al., 1995, 1997).

Jedoch wurde eine Subpopulation von HaCaT-Zellen entdeckt, die eine erhöhte Expression tumorassoziierter Marker aufweist - sie wird als HaCaT-rapid bezeichnet (Derer et al., 1996).

Die HaCaT-Zellen werden oft als Keratinocytenmodell für native Keratinocyten herangezogen. Aus diesem Grund wurden die HaCaT-Keratinocyten umfassend biochemisch hinsichtlich der Lipidzusammensetzung und -synthese (Schürer et al., 1993), der Signaltransduktion (Geilen et al., 1996), der Stammzellfaktorsekretion (Grabbe et al., 1996) und der Rezeptorexpression (Neuner et al., 1996) untersucht. Zwar erreicht die HaCaT-Zelllinie nicht die kompletten Differenzierungseigenschaften nativer Keratinocyten, aber in der biochemischen Zusammensetzung und Leistungsfähigkeit herrscht weitgehende Übereinstimmung.

Native Keratinocyten

Im Gegensatz zu den humanen Keratinocyten HaCaT besitzen die nativen Keratinocyten die komplette Differenzierungskapazität. Für vergleichende Versuche zu *in vivo* Keratinocyten sind sie somit bestens geeignet.

Sie werden aus neonatalem Vorhautgewebe nach der Firmenvorschrift von GIBCO BRL Life Technologies gewonnen. Diese beinhaltet unter anderem die Aufarbeitung der Gewebe mit Dispase-Lösung zur Trennung der epidermalen Schicht humaner Keratinocyten von der Dermis. Eine anschließende Trypsin-EDTA Behandlung dient der Gewinnung einzelner Zellen, die nach Inaktivierung von Trypsin in das Komplettmedium überführt werden.

Methoden

Zellkultivierung und -präparation

Die Keratinozyten wurden in Keratinozyten-SFM (GIBCO BRL), welches mit 0,1-0,2 ng/ml rEGF (Rekombinanter Epidermaler Wachstumsfaktor) und 25 µg/ml Rinderhypoophysenextrakt versetzt war, kultiviert. Die Calciumkonzentration im Medium betrug 0,09 mM, und der pH-Wert lag zwischen 7,2 bis 7,4. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in 10 %iger CO₂-Atmosphäre. Die Zellen wuchsen in 20 ml Kulturflaschen der Firma Greiner (Greiner GmbH, Frickenhausen) mit einer Zelleinsaat von 1 Mill. Zellen. Die HaCaT-Keratinozyten wurden alle 7 Tage in neue Kulturgefäße überimpft, und die 22. - 35. Kulturpassage zur Analyse verwendet. Die nativen Keratinozyten wurden nach der Gewinnung aus dem Gewebe bis zur 70 %igen Konfluenz kultiviert und anschließend zu je 1 Mill. Zellen pro 20 ml Kulturflasche übertragen. Hierbei wurden die Passagen 2 bis 3 verwendet.

Für die Messungen am Durchflußzytometer wurden die Zellen am 6. Tag mit 1 %igem Trypsin (GIBCO BRL) von der Kulturflasche bei einer Temperatur von 37 °C und einer Einwirkzeit von 20 min abgelöst und in HBSS-Lösung (HEPES buffered salt solution; 145 mM NaCl; 4 mM KCl; 10 mM Glucose; 2 mM MgCl₂; 10 mM HEPES; pH 7,4) überführt (Ramsell, 1996). Die HBSS-Lösung für die Versuche mit extrazellulärem Calcium enthielt zusätzlich 2 mM CaCl₂, die für calciumfreie Versuche, 0,1 mM CaCl₂ und 0,4 mM EGTA.

Für die Versuche am Fluoreszenzplattenreader wurden die Zellen in Mikrotiterplatten (96- Wells Greiner 655180) kultiviert, am 6. Tag vom Medium dekantiert und für die weitere Präparation mit HBSS-Lösung überschichtet.

Probenvorbereitung

Die freien Fettsäuren (MP, OA, LA, γ-LA, AA) wurden in 96 %igem Ethanol gelöst und anschließend in HBSS-Lösung in entsprechender Konzentration suspendiert. Vor der eigentlichen Fettsäurezugabe in die Zellkultur, während der durchflußzytometrischen Messung oder Zugabe zur Mikrotiterplatte erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Suspension, um eine homogene Fettsäureverteilung zu erzielen. Der Zeitpunkt der Fettsäurezugabe bei Versuchen zur Zellproliferation (Kap. 2.5.3.1.), Apoptose (Kap. 2.5.7.2.-4.) und Apoptose-assoziiertes Proteine (Kap. 2.5.7.5.-6.) ist in den entsprechenden Kapiteln genannt. Bei den durchflußzytometrischen Messungen erfolgte die Fettsäurezugabe nach dem Starten der Messung. Am Mikrotiterplattenreader wurden die Fettsäuren aus apparativen Bedingungen unmittelbar vor den Experimenten zugegeben. Zu jedem

Experiment wurde eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol in HBSS-Lösung (Endkonzentration Ethanol 0,2 %, wie auch bei der Fettsäurezugabe) mitgeführt.

Methoden zur Bestimmung der Zellproliferation

Bestimmung der Proliferation mittels eines radioaktiven Markers

Zur Klärung, welcher Kulturtag für die anschließenden Versuche geeignet ist, wurde eine Proliferationsmessung durch den Einbau von ^3H -Thymidin (^3H -TdR) durchgeführt. ^3H -Thymidin wird während der S-Phase anstelle des normalen Thymidins in die DNA eingebaut. Der Nachweis des inkorporierten ^3H -Thymidins erfolgte mittels eines Szintillationszählers (Wallac 1410; Firma Berthold).

Zur Durchführung des Experimentes wurden drei Kulturflaschen je 20 ml (A, B, C) parallel kultiviert, anschließend die Zellen jeder einzelnen Kulturflasche in jeweils 2 Strips (1 Strip = 8 Wells d.h. A pro Tag 16 Wells; B, C analog) umgesetzt. Die Zugabe von ^3H -TdR (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$; spez. Aktivität 60,3 Ci/mmol) erfolgte im 24-stündigen Rhythmus an den jeweiligen Kulturtagen. Die Einwirkzeit von ^3H -TdR betrug 1 h, danach wurde durch Absaugen am Harvester überschüssiges ^3H -TdR entfernt. Die Zellen wurden mehrfach gespült wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben, abgelöst an Filterblättchen gebunden und in Szintillatorröhrchen überführt. Die Zugabe des Flüssigkeitsszintillationscocktail und die Messung am Flüssigkeitsszintillationszähler erfolgte, nachdem alle Kulturtage abgearbeitet waren.

Durchflußzytometrische DNA-Bestimmung nach Einwirkung von freien Fettsäuren

Zur Klärung, ob freie Fettsäuren Veränderungen im Zellzyklus hervorrufen, wurden Zellzyklusanalysen mittels Durchflußzytometrie durchgeführt. Am dritten Kulturtag erfolgte die Fettsäurezugabe (Kapitel 2.5.2.). Es wurden Konzentrationen von 10, 50 und 100 μM Linolsäure im Medium eingestellt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet (Kap. 2.5.1.). Weiterhin wurde untersucht, ob eine Blockierung des Zellzyklus innerhalb von 24 Stunden durch Fettsäure nachzuweisen ist. Am dritten Kulturtag wurden 5, 10 und 15 μM γ -Linolensäure im Medium eingestellt und nach 8 und 16 Stunden die Zellen geerntet (Kap. 2.5.1.). Die weitere Präparation der Zellen unter Verwendung des CycleTESTTM PLUS DNA Reagent Kit (Becton Dickinson) ist schematisch in der Abb. 3 gezeigt.

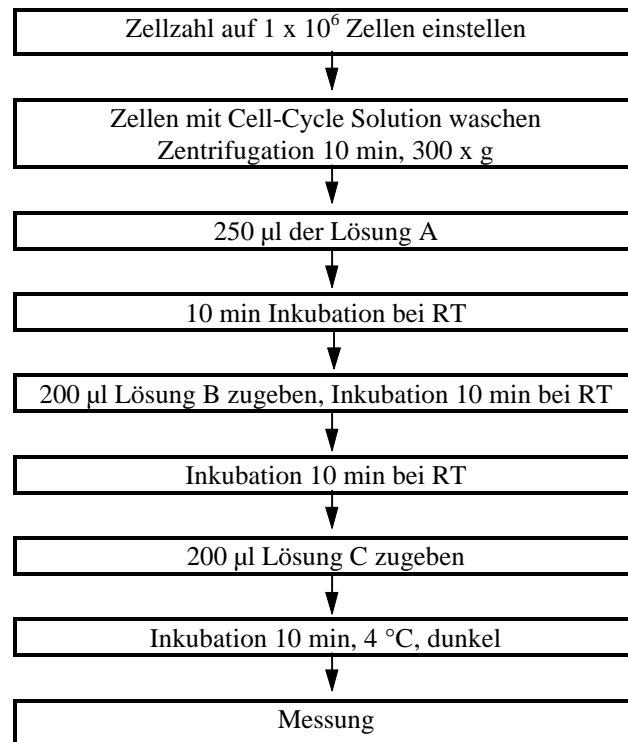


Abb. 3 Präparation der Keratinozyten für die Zellzyklus-Bestimmung am Durchflußzytometer

Bestimmung der Proliferation durch den Nachweis eines Zellzyklus-assoziierten Antigens

Proliferationsveränderungen können auch durch den Nachweis Zellzyklus-spezifischer Proteine bestimmt werden. Das Protein PCNA ist für eine solche Fragestellung geeignet, da es vermehrt in der S-Phase gebildet wird.

Zur Untersuchung des Einflusses freier Fettsäuren auf die PCNA Expression von Keratinozyten wurde die Linolsäure ausgewählt. Die Fettsäurezugabe, die Fettsäure-Endkonzentrationen und -Einwirkzeiten sind zum Versuch 2.5.3.2. analog.

Die in Phosphat-gepufferter Lösung (PBS) suspendierten Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und abzentrifugiert (5 min, 300 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 3 ml Methanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) überschichtet und sofort mit einer Pipette durchmischt, um der Bildung von Zellklumpen vorzubeugen. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei RT aufbewahrt. Nach Zentrifugation (5 min, 300 x g) wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit 1 ml Tween (0,2 % in PBS) suspendiert und auf Eis für 5 min aufbewahrt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation 5 min, 300 x g) erfolgte die Antikörperzugabe:

- Anti-PCNA (DAKO, F863)
- DNA-Färbelösung

Negativkontrolle:

- Anti-Maus IgG2a (DAKO, X933)
- DNA-Färbelösung

Die Zellen wurden resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend erfolgte die Analyse am Durchflußzytometer.

Elektronenmikroskopische Identifizierung zellulärer Organellen

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde geprüft, ob unter Einwirkung freier Fettsäuren morphologische bzw. organspezifisch-strukturelle Veränderungen an HaCaT-Keratinocyten und nativen Keratinocyten nachgewiesen werden können. Die Zellen wurden dazu am 6. Kulturtag mit Linolsäure (50 µM, 75 µM und 100 µM Linolsäure sowie Ethanol 0,2 %) versetzt (vgl. Kapitel 2.5.2.). Nach einer Einwirkzeit von 2 Stunden wurden die Keratinocyten vom Boden der Kulturschale abgeschabt und einer Fixierungs- und Einbettungsprozedur unterzogen mit anschließender Anfertigung dünner Schnitte für die Elektronenmikroskopie am Ultramikrotom (Hayat, 1970). Die Gesamtpräparation erfolgte nach der Methode vom Department of Dermatology (Veterans Administration Medical Center; UCSF 1996). Nach präparativem Abschluß erfolgte die Untersuchung am Elektronenmikroskop (10A; Carl Zeiss, Oberkochen).

Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader

Zur Calciumkalibrierung wurde der Calcium Calibration Buffer Kit #2 (Molecular Probes Europe BV) verwendet. Für die Messung am Durchflußzytometer wurden die Zellen geerntet (vgl. Kapitel 2.5.1.) und zu je $0,5 \times 10^6$ Zellen aliquotiert, gewaschen und anschließend in Kalibrierungspuffer überführt. Die in der Mikrotiterplatte kultivierten Zellen wurden gespült und anschließend mit Kalibrierungslösung überschichtet.

Die Gleichgewichtseinstellung $[\text{Ca}^{2+}]_e = [\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde durch den Einsatz des Ionophors A23187 (Calbiochem Novabiochem) mit einer Konzentration von 9 µM erzwungen.

Intrazelluläres Calcium wurde mit dem calciumempfindlichen Fluochrom Fluo-3 bestimmt (Minta et al., 1989; Merritt et al., 1990). Der Farbstoff hat ein Anregungsmaximum von 488 nm und ist daher für ein auf Argonionenlaser basierendem Durchflußzytometer geeignet.

Der Acetoxymethylester von Fluo-3 wurde benutzt, um die Zellen mit Farbstoff zu beladen. Stammlösungen von Fluo-3/AM (1 mM in wasserfreiem DMSO) und Pluronic F-127 (25 % w/w in wasserfreiem DMSO) wurden hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt, letztere Lösung wurde vor der Benutzung auf 42 °C erhitzt (Graft et al., 1993). Die Arbeitslösung (HBSS-Lösung, 39 µM Fluo-3/AM und 5 µl/ml Pluronic F-127) wurde kurz vor Versuchsbeginn hergestellt. Zu der Zellsuspension bzw. zu den adhären Zellen wurde für je eine Endkonzentration von 3,5 µM Fluo-3/AM Arbeitslösung zugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37 °C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Durch Zusatz von 12 µg/ml Propidiumiodid zu der Zellsuspension konnten während der Messung tote Zellen ausgeschlossen werden, da Propidiumiodid nur in zellmembrangeschädigte Zellen eindringt. Im Anschluß konnten die Proben am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader gemessen werden.

Änderung der freien Ca^{2+} -Konzentration als Funktion der Fettsäurekonzentration und der Zeit am Durchflußzytometer

Es ist bekannt, daß hohe Konzentrationen freier Fettsäure toxische Reaktionen an Zellsystemen hervorrufen können.

Inwieweit die Keratinozyten auf hohe und niedrige Fettsäurekonzentrationen hinsichtlich der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen reagieren, ist unbekannt. Zur Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts wurden die Zellen am 6. Kulturtag geerntet (Kap. 2.5.1.), anschließend in HBSS-Lösung überführt und mit Farbstoff beladen (Kap. 2.5.5.). Nach der Farbstoffbeladung erfolgte die Messung. Die Linolsäuresuspension (Kap. 2.5.2.) mit den Endkonzentrationen 500 µM und 5000 µM wurde nach 2 min während der Messung in die Zellsuspension gespritzt. Im zweiten Teil des Versuches wurden die Zellen mit unterschiedlicher HBSS-Lösung vor der Farbstoffbeladung behandelt. Es kam HBSS-Lösung ohne und mit Calcium (2 mM) zum Einsatz. Die Zellen wurden jeweils für mindestens 15 min inkubiert und anschließend wie beschrieben weiter präpariert. In diesem Experiment wurden Linolsäuresuspensionen der Konzentrationen von 10 µM und 100 µM verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten wurden über einen Zeitraum von ca. 20 min als Funktion zur Zeit aufgenommen.

Änderung der freien Ca^{2+} -Konzentration als Funktion der Fettsäurekonzentration und der Zeit am Fluoreszenzreader

Der Einfluß der ausgewählten freien Fettsäuren auf den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gehalt wurde am Fluoreszenzreader untersucht. Als Untersuchungsobjekt dienten HaCaT-Zellen, gewachsen in 96er Mikrotiterplatten. Am 6. Tag wurde das Medium abgegossen und die Platten mit

HBSS-Lösung gewaschen. Es wurde eine calciumfreie und eine 2 mM calciumhaltige HBSS-Lösung verwendet. Zur Adaptation wurden die Zellen jeweils für 15 min mit der entsprechenden Lösung inkubiert. Die Farbstoffbeladung (Kap. 2.5.5.) erfolgte anschließend. Nach der Beladung mit Fluo-3/AM schloß sich ein Waschvorgang mit HBSS-Lösung an. Kurz vor der Messung wurden die Platten mit einer Fettsäuresuspension versetzt und sofort am Reader gemessen. Die verwendeten Konzentrationen der Fettsäuren betragen 10 μ M und 100 μ M.

Durchflußzytometrische Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials unter Einfluß von Fettsäuren

Zur Klärung, ob freie Fettsäuren das mitochondriale Membranpotential (MMP) ändern, wurden Kinetikversuche durchgeführt. Der Farbstoff Rhodamin-123 (R-123) ermöglicht die Erfassung einer Änderung des MMP's an lebenden Keratinozyten am Durchflußzytometer. HaCaT-Zellen wurden am 5. Kulturtag geerntet (Kap. 2.5.1.). Zu einer Zellsuspension von 1×10^6 Zellen in 250 μ l HBSS-Lösung wurden 5 μ l R-123 (0,5 mg/ml in DMF) hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden der Zellsuspension 750 μ l HBSS-Lösung und 10 μ l Propidiumiodid-Lösung (1 mg/ml) zugefügt. Die Messung am Durchflußzytometer erfolgte unmittelbar nach einer 5 minütigen Inkubation bei 22 °C.

Zwei Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte die Fettsäurezugabe (MP, OA, LA, γ -LA und AA) während der Messung.

Ausgewählte Methoden zum Verlauf des programmierten Zelltodes (Differenzierung und Apoptose)

Einfluß von freien Fettsäuren auf die Expression ausgewählter Differenzierungsmarker

Um einen Einfluß der freien Fettsäuren auf die Differenzierung von Keratinozyten zu bestimmen, wurde die Expression von zwei Differenzierungsmarkern untersucht, das Involucrin und das Filaggrin. Am 5. Kulturtag erfolgte die Fettsäurezugabe (Kap. 2.5.2.) von 1 μ M oder 10 μ M Arachidonsäure für den Involucrinnachweis und 10 μ M oder 25 μ M Linolsäure für den Filaggrinnachweis. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben geerntet. Die nachfolgende Abb. 4 dokumentiert die schrittweise Präparation der Zellen für den Nachweis von Proteinen am Durchflußzytometer (z.B.: Involucrin und Filaggrin).

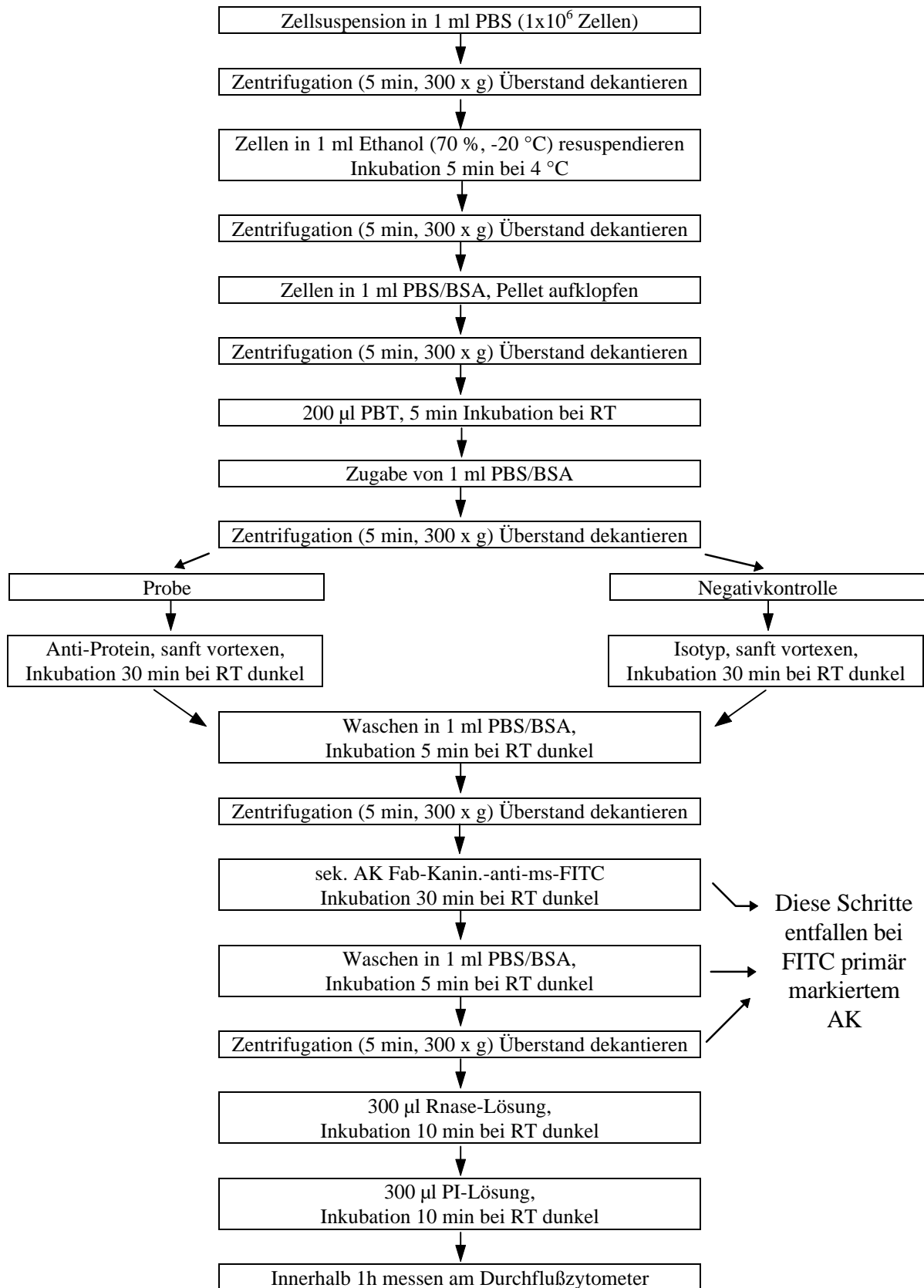


Abb. 4 Präparation zum Nachweis von Proteinen am Durchflußzytometer

Nachweis der Apoptose mit Annexin-V-FLUOS

Frühe Phasen der Apoptose lassen sich durch Veränderungen an der Zytoplasmamembran nachweisen. Die Translokation von Phosphatidylserin wird mit Annexin-V-FLUOS Kit nachgewiesen und ist ein Marker früh apoptotischer Zellen.

Bei HaCaT-Zellen erfolgte am 5. Kulturtag die Fettsäurezugabe (vgl. Kapitel 2.5.2.). Nach 24 Stunden Einwirkzeit wurden die Zellen geerntet (Kap. 2.5.1.), aliquotiert zu 1×10^6 Zellen, 1 x in PBS gewaschen und für 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet mit 100 μ l Markierungslösung (20 μ l Annexin-V-FLUOS Stammlösung; 1000 μ l Inkubationspuffer; 20 μ l PI [50 μ g/ml PI in Inkubationspuffer]) resuspendiert und für 10-15 min inkubiert (dunkel). Nach der Inkubation wurde zu den Zellsuspensionen 400 μ l Inkubationspuffer hinzugefügt und anschließend mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen freien Fettsäuren für die Versuche mit 24-stündiger Einwirkzeit von freier Fettsäure waren:

- 10-Methyl-Palmitinsäure 25, 30, 35, 40, 45, 50 und 75 μ M
- Ölsäure 25, 30, 35, 40, 45 und 50 μ M
- Linolsäure 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 und 100 μ M
- γ -Linolensäure 15, 20, 25 und 30 μ M
- Arachidonsäure 20, 25, 30, 35, 40 und 45 μ M

Zur Klärung, ob schon nach kurzer Einwirkungszeit von freier Fettsäure die Apoptose induziert wird, wurde ein entsprechender Parallelansatz (1. und 2. Ansatz) mit γ -Linolensäure durchgeführt. Die Zugabe der Fettsäure (Kap. 2.5.2.) erfolgte am 5. Kulturtag. Nach einer 2-stündigen Einwirkung wurde das Kulturmedium generell erneuert und der erste Ansatz für die Apoptosemessung wie oben präpariert und vermessen. Der zweite Ansatz wurde nach 24 Stunden wie beschrieben geerntet, präpariert und analysiert. Folgende Konzentrationen von γ -Linolensäure kamen zum Einsatz: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 μ M.

Neben HaCaT-Zellen wurden native Keratinozyten (gewonnen aus neonatalem Vorhautgewebe nach der Firmenvorschrift von GIBCO BRL Life Technologies) auf das Apoptoseverhalten untersucht. Die nativen Keratinozyten wurden kultiviert und am 5. Kulturtag mit Ölsäure versetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet (Kap. 2.5.1.) und dem Annexin-V-FLUOS Test unterzogen. Die Ölsäure wurde in den Konzentrationen 25, 30, 45 und 50 μ M eingesetzt.

Apoptosenachweis mittels In Situ Cell Death Detection Kit

Außer dem Annexin-V-FLUOS Kit besteht die Möglichkeit, die Apoptose auch mittels In Situ Cell Death Detection Kit am Durchflußzytometer zu bestimmen.

Die Zellen wurden am 5. Kulturtag mit Ölsäure versetzt (Kap. 2.5.2.). Nach 24 Stunden erfolgte die Zellgewinnung und die Präparation der Zellen nach der Firmenvorschrift von Boehringer Mannheim (In Situ Cell Death Detection Kit).

Die eingesetzten Ölsäurekonzentrationen waren 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 μM .

Apoptosenachweis mit Cell Death Detection ELISA

Um auszuschließen, daß die Translokation von Phosphatidylserin durch freie Fettsäuren allein hervorgerufen wird, wurde ein Apoptosetest auf Zellkernebene durchgeführt. Der Test „Cell Death Detection ELISA“ (Boehringer Mannheim) ermöglicht den Nachweis von zytoplasmatischen Histon-assoziierten-DNA-Fragmenten (Mono- und Oligonucleosomen) im UV-Bereich ($\lambda_{\text{max}} = 405 \text{ nm}$) nach induziertem Zelltod. Da bei diesem Test keine Korrelation zur Zellzahl existiert, wurde eine Normierung über den Test „Cytotoxicity Detection Kit (LDH; Boehringer Mannheim) erreicht. Die Zellzahl korreliert mit der LDH-Freisetzung, wenn die Zellen vorher in Lyse gebracht wurden, und kann somit zur indirekten Zellzahl-Bestimmung herangezogen werden. Es wurden 2 Mikrotiterplatten (je 96 Wells) parallel angesetzt und wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben kultiviert. Am 5. Kulturtag erfolgte die Zugabe aller getesteten Fettsäuren. Die gewählten Konzentrationen resultieren in Auswertung der Ergebnisse aus dem Nachweis der Apoptose mit Annexin-V-FLUOS.

Es wurden folgende Konzentrationen ausgewählt:

- 10-Methyl-Palmitinsäure 50 μM und 75 μM
- Ölsäure 45 μM und 50 μM
- Linolsäure 30 μM und 75 μM
- γ -Linolensäure 25 μM und 40 μM
- Arachidonsäure 35 μM und 40 μM

Nach 24 Stunden wurden die beiden Platten entsprechend den Vorschriften für „Indirekte Zellzahlbestimmung über Zytotoxizität“ nach der Firmenvorschrift des Cytotoxicity Detection Kit (LDH) und Apoptosebestimmung nach der Firmenvorschrift Cell Death Detection ELISA (beide von Boehringer Mannheim) aufgearbeitet.

Durchflußzytometrischer Nachweis des Tumorsuppressorproteins p53 als Funktion der Fettsäurekonzentration und Zeit

Am Ablauf der Apoptose sind auch zelluläre Proteine, unter anderem das Tumorsuppressorprotein p53, beteiligt. Deshalb war es naheliegend, den Einfluß von Fettsäuren auf die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 von Keratinozyten zu verfolgen. Die Zellen wurden (vgl. Kapitel 2.5.1.) kultiviert und mit γ -Linolensäure am 5. Kulturtag behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen und die Präparation für die durchflußzytometrische Messung. (vgl. Abb. 4). Da für das p53-Protein ein primär FITC markierter Antikörper zu Verfügung stand, entfallen die Schritte des sekundären Antikörpers.

Das Experiment wurde mit folgenden Endkonzentrationen der γ -Linolensäure durchgeführt 5, 10, 15 und 20 μ M.

Um nicht nur qualitativ die p53-Expression in Abhängigkeit der Fettsäurekonzentration zu messen, wurde auch die zeitliche Veränderung ermittelt. Daraus lassen sich Hinweise zum Regulationsmechanismus dieses Prozesses ableiten.

Es wurden bei konstanten Konzentrationen von γ -Linolensäure nach 3 Stunden, nach 6 Stunden und nach 24 Stunden die Zellen entsprechend der beschriebenen Arbeitsvorschrift (Abb. 4) aufgearbeitet und vermessen.

Nachweis Apoptose-assoziiierter Proteine bcl-2 und bax in Abhängigkeit von der Fettsäurekonzentration

Aus der Familie der Apoptose-assoziierten Proteine sind das bcl-2 und das bax Protein die am meisten untersuchten Apoptosemarker. Bcl-2 ist ein Apoptoseinhibitor. Unter den Bedingungen der Messung von p53 nach der γ -Linolensäure (5, 10, 15 und 20 μ M) Inkubation wurde die Expression des Apoptose-assoziierten Proteins bcl-2 untersucht.

Das bax-Protein, ein Antagonist zu bcl-2, wurde in diesem Zusammenhang gleichzeitig bestimmt. Da für diesen Versuch kein primär FITC-markierter bax-Antikörper zur Verfügung stand, mußte ein FITC-markierter Sekundärantikörper eingesetzt werden, um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten. Die Sekundärantikörperzugabe erfolgte sofort nach dem ersten Zentrifugationsschritt nach der Primärantikörperzugabe (vgl. Abb. 4).

Molekularbiologischer Nachweis von p53 Protein mittels Western Blotting

Kultivierte HaCaT-Zellen wurden am 5. Kulturtag mit γ -Linolensäure der Konzentrationen 15, 20 und 25 μ M inkubiert (Kap. 2.5.2.). Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, 2 x in PBS gewaschen und bei 230 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 bis 100 μ l Lämmli-Puffer (vorgewärmt) aufgenommen und 10 min bei 90 °C erhitzt. Es folgte eine anschließende Ultraschallbehandlung und Zentrifugation bei 2490 x g für 15 min. Der Überstand wurde für die weitere Bearbeitung bei -20 °C gelagert. Für eine genaue und gleichmäßige Proteinauftragung wurde vorher eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (Firmenvorschrift Protein Assay Kit Nr. P5656; SIGMA Diagnostics).

Gleiche Proteinnengen (30-50 μ g) wurden auf eine SDS-PAGE (10 %ig) übertragen und anschließend für ca. 2-3 h bei 30 mA getrennt (Einlauf 10 min bei 20 mA; mit Bromphenolblau und Standardmarker 6 μ l). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels „semi dry“ vom Gel auf eine 0,2 μ m PVDM-Membran (bei 450 mA/1h) transferiert (Trans-Blot[®] Transfer Medium BioRAD).

Es folgte das Immunoblotting mit dem Miniblotsystem (Biometra). Die Membran wurde 1 x mit Tween/PBS für 20 min bei RT und 3 x mit Blockierungsreagenz (Tween/PBS + 5 % Milchpulver) gewaschen. Die Inkubation mit primärem Mausantikörper p53 1-2 μ g/ml in Blockierungslösung (Do7; Novocostra) erfolgte für 2 h bei 37 °C (oder über Nacht bei 4 °C).

Die Schritte 3 x Waschen mit Blockierungsreagenz (5-10 min; RT), Inkubation mit sek. AK (1 h; RT; P0161 DAKO), 3 x Waschen mit Blockierungsreagenz (5-10 min, RT), Inkubation mit ECL-Reagenz (1 min; Amersham-Buchler) und Nachweis der ECL-Reaktion auf Röntgenfilm (Maximum nach 20 min; 1-10 min) schlossen das Western-Blotting ab.

Molekularbiologischer Nachweis von MDM2 Protein mittels Western Blotting

Wie in Kapitel 2.5.7.7. beschrieben erfolgte der Nachweis des MDM2-Proteins per Western-Blotting mit den primären Maus-Antikörpern MDM2 (C-term) (1B10, Novocostra) und MDM2 (N-term) (IF2, Oncogene).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Proliferation von HaCaT-Zellen unter Einwirkung von freien Fettsäuren

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Frage nach der Standardisierung der Kulturbedingungen der verwendeten Keratinozyten. Neben der Festlegung des Alters der zum Versuch herangezogenen Zellen, der Höhe der Zelleinsaat in Zellanzahl pro Milliliter Medium mußte die Kulturdauer festgelegt werden, bei der unter den vorgegebenen Kulturbedingungen eine Änderung der Proliferation am deutlichsten nachweisbar war. Dazu wurde der Einbau von ^3H -Thymidin nach unterschiedlichen Kulturzeiten ausgewertet. Den Befunden liegen jeweils 48 Meßwerte pro Zeiteinheit zugrunde.

Die Meßwerte wurden statistisch mit dem Test „One Way Analysis of Variance“ ausgewertet. Das Ergebnis zeigt signifikante Unterschiede in der Keratinozytenproliferation zwischen den Tagen 4, 5, 6 und 7 (Abb. 5).

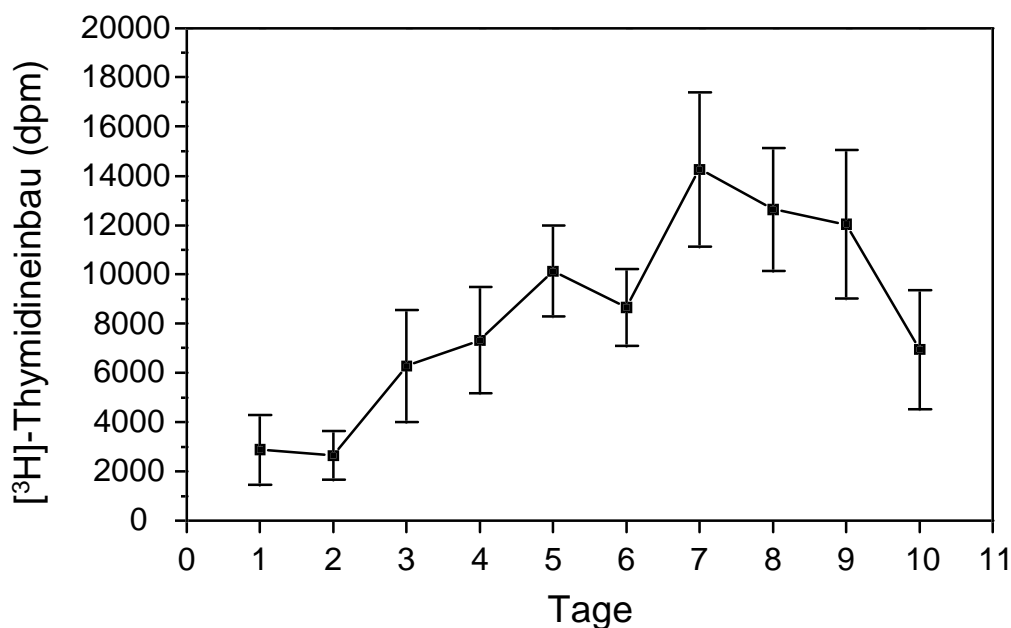


Abb. 5 Proliferation von humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (^3H -Thymidineinbau) n=48

Die Bestimmung der prozentualen Anteile der Keratinozyten wurde am 6. Kulturtag nach durchflußzytometrischen Messungen vorgenommen. Dabei ergab sich zum Einfluß von Fettsäuren auf den Zellzyklus, daß keine Veränderungen im Zellzyklusverhalten unter Fettsäureeinfluß nachweisbar waren. Die HaCaT-Zellen zeigten weder nach Zugabe von Linolsäure über 24, 48 und 72 Stunden noch unter γ -Linolensäureeinfluß von 8 und 16 Stunden Veränderungen in den Zellzyklusphasen (Abb. 6).

Auch der Nachweis des Zellzyklus-assoziierten Antigens PCNA erbrachte keine meßbaren Veränderungen in der Verteilung der einzelnen Fraktionen (Abb. 7).

Einwirkzeit	Zellzyklusphasen [%]	Linolsäure-Konzentration			
		Kontrolle	10 μ M	50 μ M	100 μ M
24 h	G ₁	50,1	59,5	56,8	65,5
	S	34,6	26,4	31,2	21,5
	G ₂ /M	15,3	14,1	11,9	13,0
48 h	G ₁	55,2	55,1	52,6	58,3
	S	36,7	37,6	36,1	34,5
	G ₂ /M	8,5	7,3	11,3	7,2
72 h	G ₁	61,6	60,5	60,4	62,2
	S	30,6	29,7	35,7	27,4
	G ₂ /M	7,9	9,8	3,8	10,4
		γ -Linolensäure-Konzentration			
		Kontrolle	5 μ M	10 μ M	15 μ M
8 h	G ₁	38,0	37,5	37,5	45,3
	S	56,5	59,3	52,0	54,4
	G ₂ /M	5,5	3,2	10,5	0,3
16 h	G ₁	36,4	36,1	44,3	34,4
	S	60,2	55,0	40,6	58,8
	G ₂ /M	3,4	9,0	15,1	6,8

Abb. 6 Zellzyklusphasen von HaCaT-Zellen nach Einwirkung mit Linol- und γ -Linolensäure, durchflußzytometrische Bestimmung

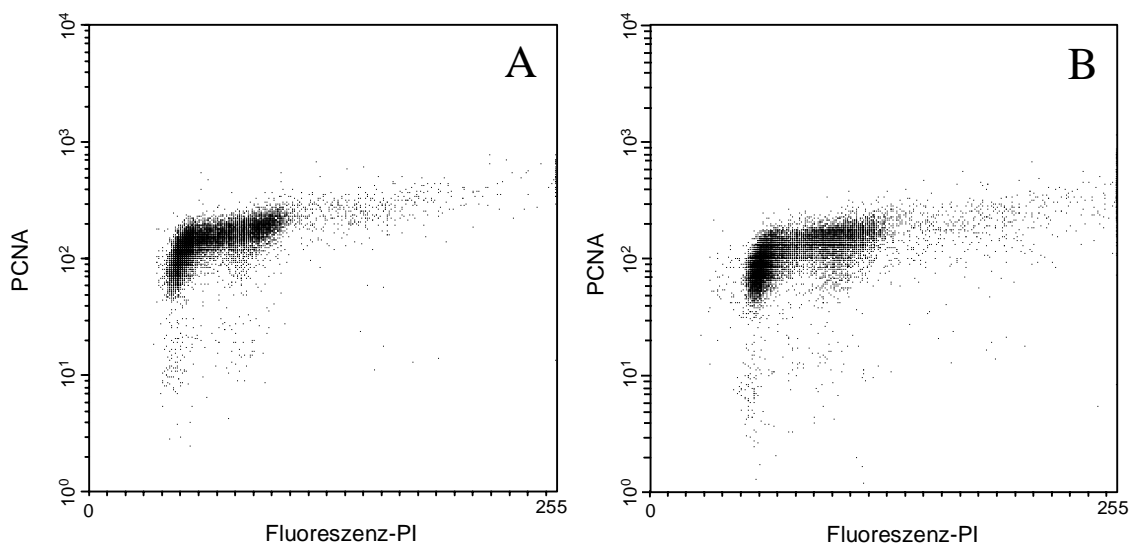


Abb. 7 Vergleich der PCNA-Expression nach 48 h unter Linolsäureeinfluß; A EtOH 0,2%, B 50 μ M Linolsäure

Diskussion

Zur Festlegung der Untersuchungsbedingungen an kultivierten Keratinozyten mußten einige funktionelle Zustandsdaten der Zellen berücksichtigt werden. Das betraf unter anderem den Ablauf des Zellzyklus und der Differenzierung, die Einsaatdichte und Kulturdauer sowie andere Faktoren der Kulturbedingungen. Aus den Ergebnissen des ^3H -TdR Einbaus sollten Hinweise für die Auswahl der Kulturbedingungen abgeleitet werden, die folgende Kriterien für die weiteren Versuche erfüllen:

1. eine hohe Proliferationsrate
2. geringe Stratifizierung
3. geringe Differenzierung
4. genügende Zellmenge

Diese Kriterien waren nach Auswertung der Ergebnisse zum ^3H -TdR Einbau am 6. Kulturtag weitgehend gegeben, deshalb wurde für die weiteren Untersuchungen der 6. Kultivierungstag gewählt (Abb. 5).

Es ist bekannt, daß durch Substanzen oder Strahlung die Zellproliferation beeinflusst werden kann. Eine Möglichkeit besteht in der Blockierung einzelner Phasen des Zellzyklus. Beschrieben wurde von Bache et al. (1997) die Blockierung der G_2/M -Phase von humanen Sarkomzellen durch Röntgenstrahlung. Nach Shinomiya (1997) werden Lymphomzellen nach Einwirkung eines Chloroplatinkomplexes ebenfalls in der G_2/M -Phase blockiert. Der Einsatz eines Anthracyclinderivates bei humanen Mammaadenokarzinomzellen führte nach Hedenfalk (1997) zur Blockierung der G_1 -Phase bzw. der späten S-Phase.

Voraussetzung für die Interpretation der durchflußzytometrisch gewonnenen Ergebnisse der Zellproliferation ist die Kenntnis der Phasen des Zellzyklus. In Abb. 8 sind die verschiedenen Phasen vermehrter bzw. verminderter Proliferation schematisch dargestellt.

Die ruhende, nicht-proliferierende Zelle befindet sich in der sogenannten G_0 -Phase (z.B.: ausdifferenzierte Gewebezellen). In der G_1 -Phase (Wachstumsphase) findet unter anderem die RNA-Synthese, die Proteinbiosynthese und der Aufbau des Zytoskelettes statt. Die S-Phase ist der Replikation der genomischen DNA vorbehalten. Nach der S-Phase vergeht eine kurze Zeitspanne (G_2 -Phase), bis die Zelle in die Mitose-Phase übergeht (Trennung der verdoppelten Chromosomen). Hier beginnt der Zellzyklus von neuem. Charakteristische Kennzeichen des Zellzyklus sind unter anderem die Zunahme des DNA-Gehaltes, das Auftreten spezifischer Proteine während der Phasen des Zellzyklus (PCNA, Ki-67) sowie der Einbau von Thymidin in der S-Phase.

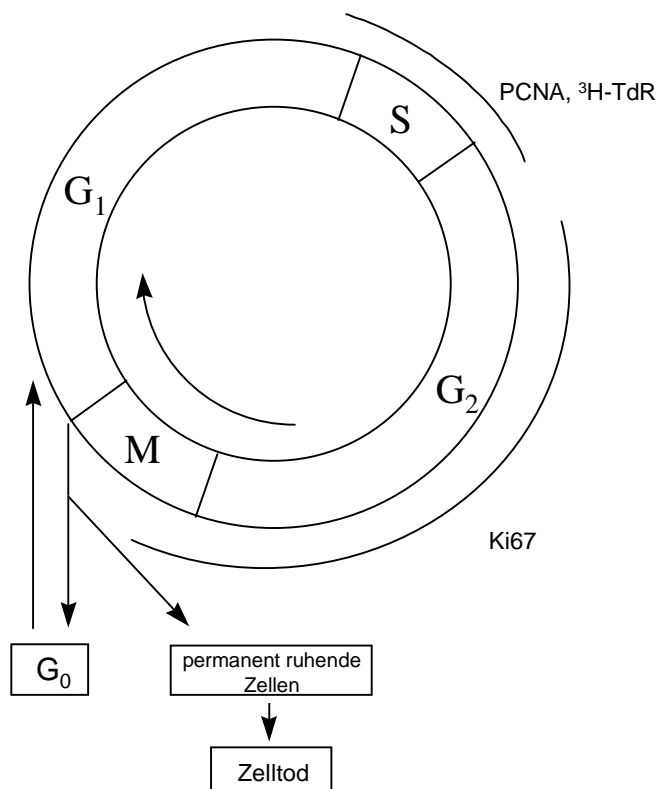


Abb. 8 Schematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus und korrespondierender charakteristischer Markerproteine (nach Boehringer Mannheim)

Für Untersuchungen der Zellproliferation und der damit verbundenen molekularen Vorgänge können die Ergebnisse der Durchflußzytometrie zu wertvollen Erkenntnissen beitragen (Schmitz und Rothe, 1994). Die Durchflußzytometrie ermöglicht die schnelle Bestimmung von DNA-Verteilungsmustern und ihrer Veränderungen. Sie kann zur Analyse komplexer Zellzyklusverteilungen (z.B. Überlagerung diploider und aneuploider Kerne) und zur prozentualen Berechnung der Zellzyklusanteile (G₀/G₁, S, G₂/M) mit speziellen Softwareprogrammen herangezogen werden (Schmitz und Rothe, (1994), Ormerod (1994), Radbruch (1992)).

Untersuchungen des Einflusses von freien Fettsäuren auf die Proliferation von HaCaT-Keratinocyten mit Hilfe des ³H-Thymidineinbaus erbrachten eine Verringerung der Proliferation und Zellanzahl. Da die Proliferationsrate mit zunehmender Fettsäurekonzentration sinkt, ist nicht von einem regulatorischen Eingriff in den Zellzyklus im Sinne einer Blockierung auszugehen (Schneider, 1997).

Eine Blockierung bzw. Änderung des Zellzyklus durch die eingesetzten freien Fettsäuren konnte nicht nachgewiesen werden. Keinen Einfluß auf den Zellzyklus ließ die Expression

von PCNA erkennen. Zur genaueren Charakterisierung der Wachstumsfraktion (S-Phase) wurde zusätzlich das Zellzyklus-assoziierte Antigen PCNA bestimmt. Das Auftreten des PCNA-Proteins ist eng mit bestimmten Phasen des Zellzyklus verbunden und kann daher zur präziseren Ermittlung der S-Phase genutzt werden. PCNA als hochkonserviertes Protein ist funktionell ein Hilfsprotein der DNA-Polymerase δ (Travali et al., 1989 und Brown et al., 1993) und akkumuliert in der S-Phase (Biochemica Information Boehringer Mannheim, 1996). Änderungen des PCNA-Zustandes in unterschiedlichen Tumorstadien während des Zellzyklus und im Vergleich zu verschiedenen Tumoren sind unter anderem bei Steck und El-Nagger (1994), Pellicciari (1995) und Sawtell (1995) beschrieben.

Sollten durch freie Fettsäuren Signalwege induziert werden, die die Proliferation direkt oder indirekt beeinflussen, so müßte dieses z. B. in den Abbildungen 6 und 7 erkennbar sein. Da aber morphologische Veränderungen der Membranen bei hohen Fettsäurekonzentrationen unter dem Mikroskop zu sehen waren (Auflösung Zell-Zell-Kontakt), können andere strukturelle, molekularbiologische Einflüsse von Fettsäuren auf die Zelle nicht ausgeschlossen werden.

Strukturveränderungen zellulärer Organellen unter dem Einfluß von Linolsäure

Wie schon erwähnt können freie Fettsäuren durch deren Zugabe in das Zellkulturmedium zu morphologischen Veränderungen der Zellen führen (Schneider, 1997). Auf Grund dieser Befunde stellte sich die Frage, ob mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine nähere Charakterisierung der beobachteten Vorgänge möglich ist.

Elektronenmikroskopische Befunde von HaCaT-Keratinocyten:

Im Vergleich zu den unbehandelten HaCaT-Keratinocyten (Abb. 9) konnte man bei den Zellen unter Einfluß von 50 μ M Linolsäure für 2 Stunden (Abb. 10) eine deutliche Zunahme von multivesikularen oder pre-lysosomalen Körpern beobachten. Eine Bildung von Peroxisomen scheint wahrscheinlicher. Wurde die Konzentration auf 75 μ M Linolsäure erhöht (Abb. 11), waren weitere strukturelle Veränderungen nicht mehr visuell nachweisbar. Leichte, in einigen Kernen auszumachende Chromatinkondensationen, könnten auf eine eventuell beginnende Apoptose hinweisen. Veränderungen an anderen Organellen konnten nicht nachgewiesen werden. Die Konzentration von 100 μ M Linolsäure zeigte allenfalls eine weitere graduelle Zunahme von Peroxisomen.

Elektronenmikroskopische Befunde an nativen Keratinozyten:

Native Keratinozyten (Abb. 12) zeigten fast die gleichen strukturellen Veränderungen wie die HaCaT-Zellen unter dem Einfluß der Linolsäure. Es bilden sich Peroxisomen, die bei 50 μM (Abb. 13) und 75 μM (Abb. 14) Linolsäure im Gegensatz zu HaCaT-Keratinozyten noch membranäre Strukturen im Organelleninnern aufweisen. In den Zellkernen sind außer dem Nukleus hin und wieder Bereiche kondensierten Chromatins zu sehen, ein Zeichen für eine eventuell beginnende Apoptose.

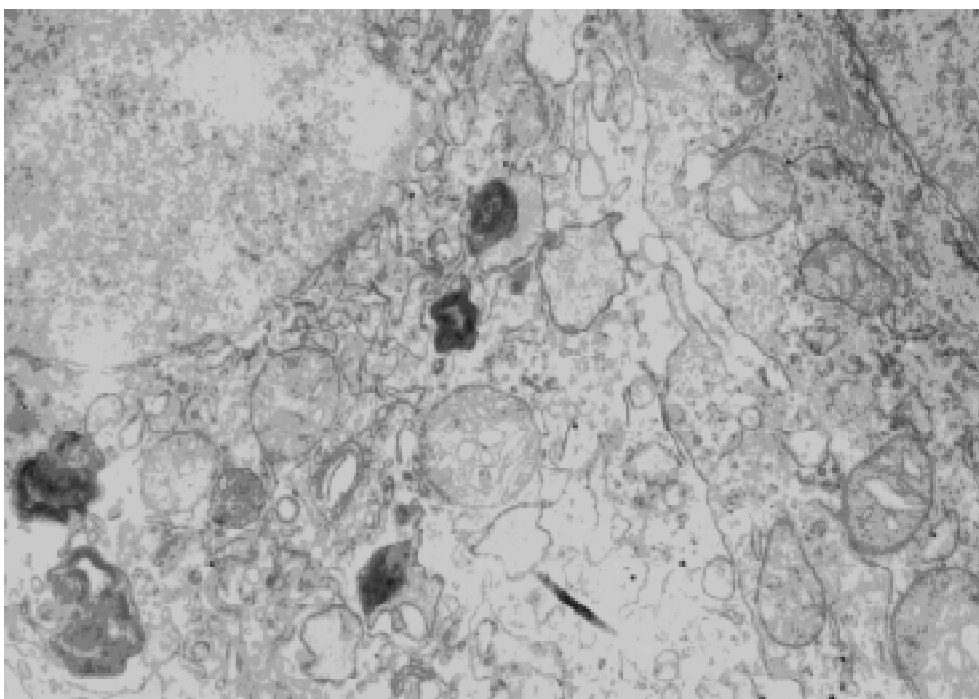


Abb. 9 unbehandelte HaCaT-Zellen (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)

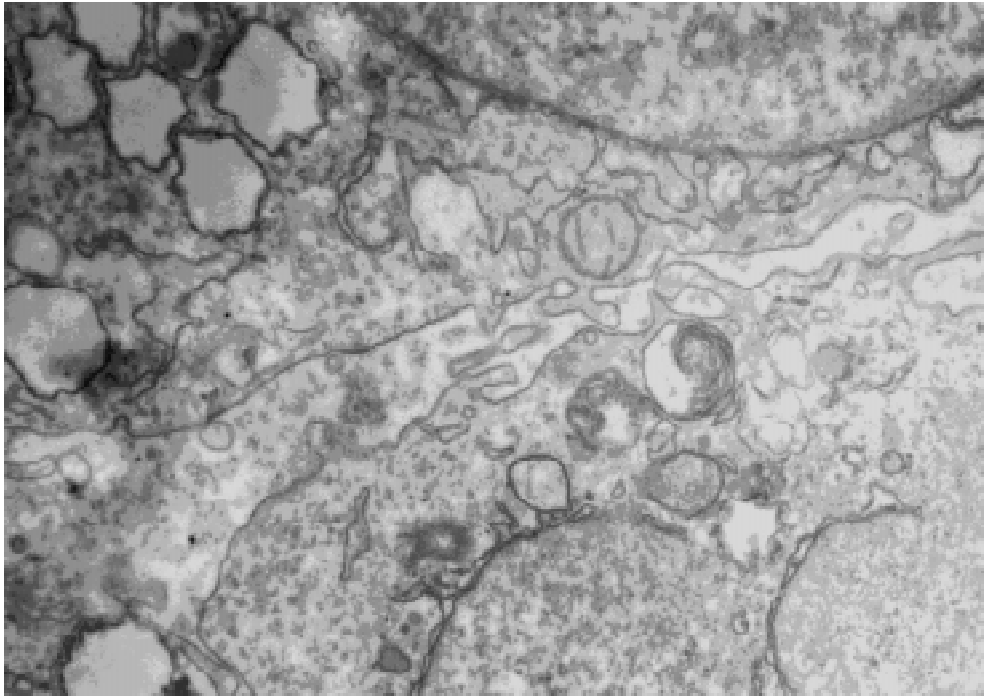


Abb. 10 HaCaT-Zellen behandelt mit 50 μM Linolsäure für 2 h
(elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)

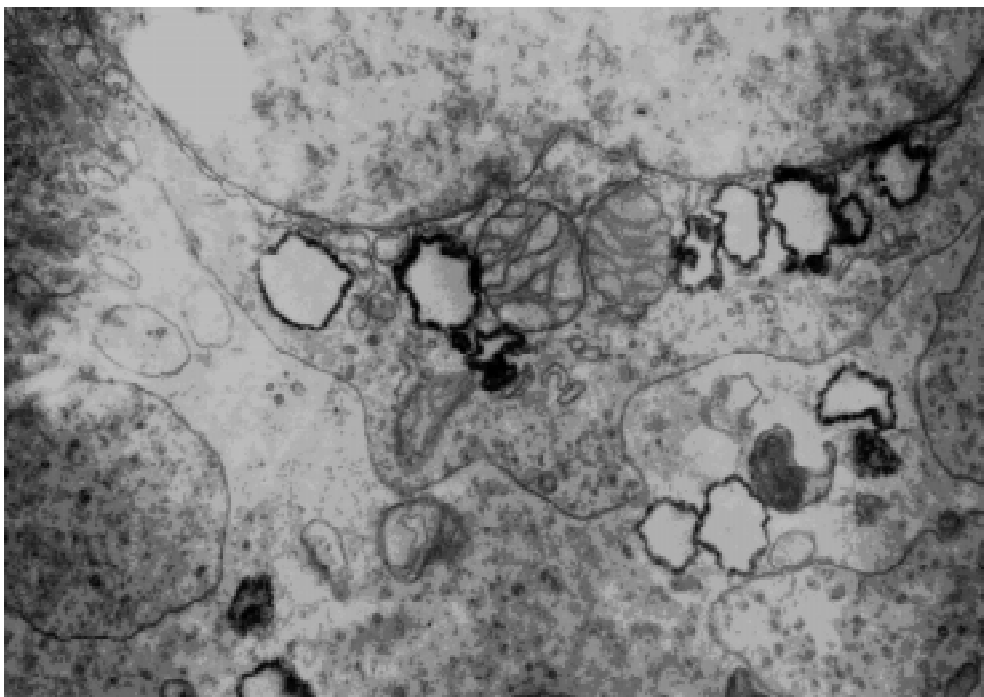


Abb. 11 HaCaT-Zellen behandelt mit 75 μM Linolsäure für 2 h
(elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)

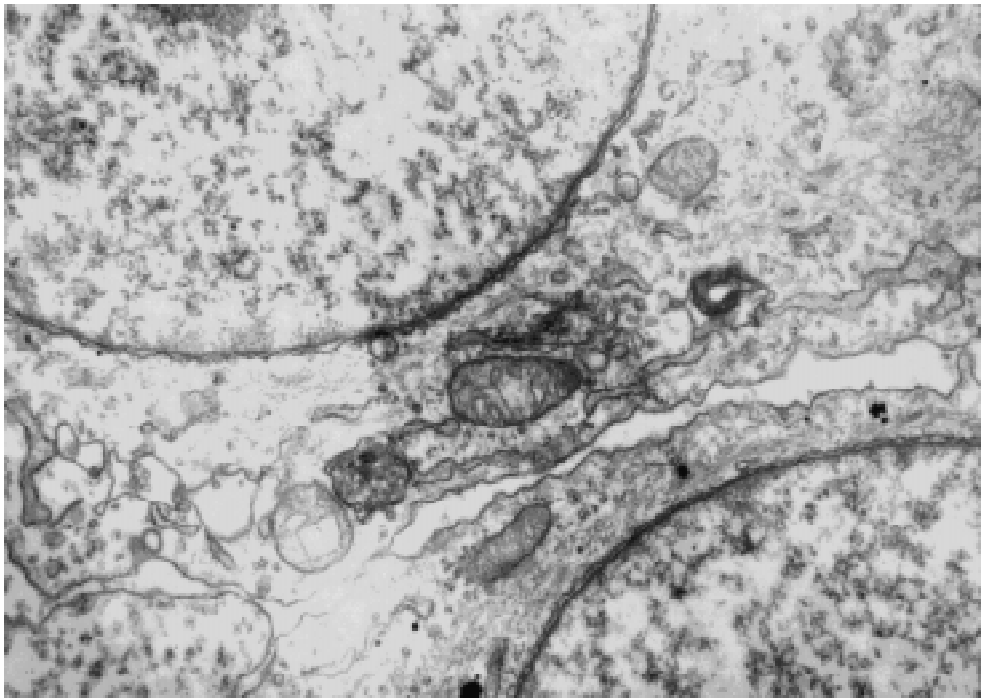


Abb. 12 unbehandelte native Keratinozyten (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)

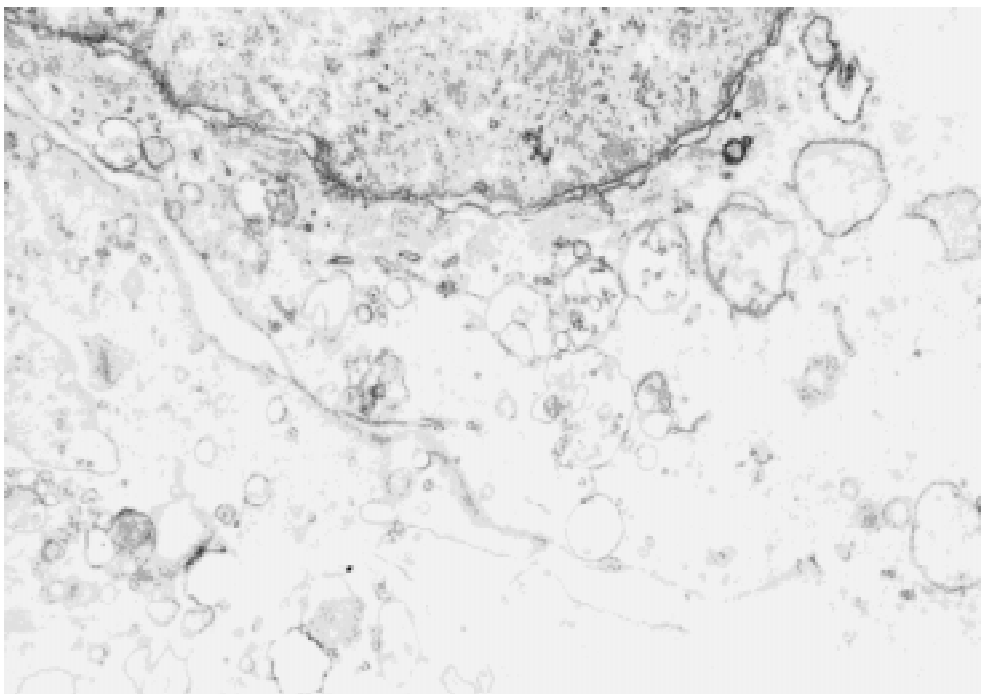
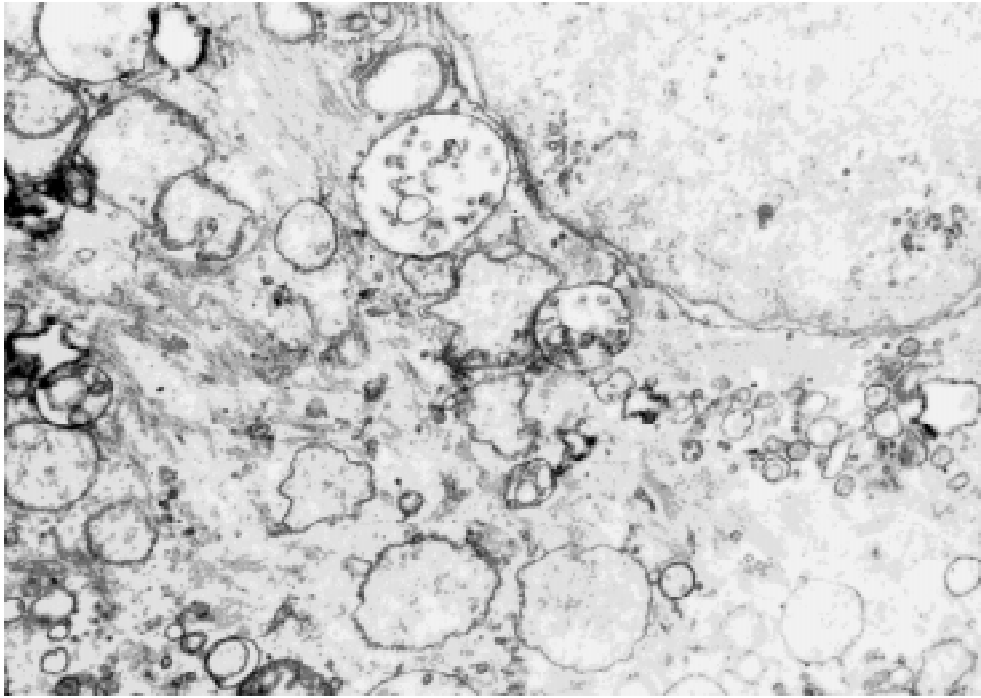


Abb. 13 Native Keratinozyten behandelt mit 50 µM Linolsäure für 2 h (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)



**Abb. 14 Native Keratinozyten behandelt mit 75 µM Linolsäure für 2 h
(elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)**

Diskussion

Die schnelle und starke Ausbildung von Peroxisomen in den Keratinozyten innerhalb von 2 Stunden ist sicherlich auf das Überangebot der freien Fettsäure Linolsäure in den Zellen zurückzuführen. Die Zelle versucht durch die Bildung spezieller Organellen, z.B. Peroxisomen, den Fettsäureüberschuß zu kompensieren bzw. die Fettsäure schnell abzubauen. Peroxisomen sind selbstreplizierende Organellen, die kein eigenes Genom, wie die Mitochondrien und Chloroplasten, besitzen. Sie müssen daher ihre Proteine aus dem Zytoplasma importieren. Der Begriff „Peroxisom“ resultiert aus ihrer Verwendung von molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, um Oxidationsreaktionen auszuführen. Eine der Hauptfunktionen der Peroxisomen ist der Abbau von Fettsäuren durch der β -Oxidation. Normalerweise findet dieser Prozeß bei Säugerzellen in den Mitochondrien statt, kann aber teilweise auch von Peroxisomen übernommen werden (Alberts et al., 1997). Zu diskutieren ist auch die mögliche fettsäureinduzierte Aktivierung des nuklearen Hormon Rezeptors PPAR α . Keller et al. (1993), Schoonjans et al. (1996) und Yu et al. (1995) zeigten, daß freie Fettsäuren, z.B. Ölsäure und Linolsäure, in der Lage sind, PPAR α zu aktivieren. Weiterhin soll eine Stimulierung von PPAR α dazu führen, daß die DNA-Synthese inhibiert wird (Hanley et al., 1997).

Wie dem auch sei, scheinbar reicht der Abbau der freien Fettsäure in den Mitochondrien bzw. Peroxisomen (auch bei geringen Fettsäurekonzentrationen) nicht aus, um eine Apoptosereaktion zu verhindern (Kapitel 3.5.).

Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

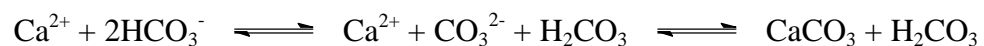
Die quantitative Calciumbestimmung bzw. die Konzentrationsänderung von Ca^{2+} -Ionen in intakten biologischen Systemen ist für die Deutung der Aktivierung und Inhibierung intra- und extrazellulärer Prozesse von großer Bedeutung. Diese Problemstellung wird an verschiedenen biologischen Systemen bearbeitet (Morgan und Burgoyne, 1990, Takano et al., 1994).

Die Ca^{2+} -Konzentration in einem biologischen System unterliegt einem ständigen dynamischen Gleichgewicht. Zunächst ist zwischen einem extrazellulären und intrazellulären Ca^{2+} -Gleichgewicht zu unterscheiden, die wiederum über Gleichgewichtsbeziehungen, die durch einen aktiven oder passiven Transport gesteuert werden, gekoppelt sind.

Für die Fragestellung war aber primär das intrazelluläre Ca^{2+} -Gleichgewichtssystem von Interesse, das von externen Faktoren (Präparation, Medium, Untersuchungssubstanzen) beeinflusst wird.

Für das intrazelluläre Ca^{2+} -Gleichgewichtssystem sind folgende Gleichgewichte bestimmend:

1. Calciumhydrogencarbonat/-carbonat-Gleichgewicht



2. Calciumhydrogenphosphat-Gleichgewicht



3. Calciumcalmodulin-Gleichgewicht

$$K = \frac{[\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{Calmodulin}]}{[\text{Ca} - \text{Calmodulin}]} \quad \text{Gl. 1}$$

Allgemein wird angenommen, daß 90 % des Zellcalciums in den Mitochondrien als Calciumphosphatkomplex gebunden ist und dieses mit dem Zytosolcalcium im schnellen Austausch steht (Ackermann, 1992).

Bedenkt man andererseits, daß das Konzentrationsgefälle zwischen extrazellulärem und intrazellulärem Calcium in vivo 1000:1 beträgt, so wird damit auch deutlich, daß die Konzentration des intrazellulären Calciums von vielen Faktoren (Abb. 22) abhängig ist, wobei hier nur die Rolle der enzymatischen Regulation angeführt sei.

Eine genaue Bestimmung der Calciumkonzentration erweist sich durch diese Faktoren als recht schwierig. Absolutwerte sind also mit Vorsicht zu betrachten.

Ca²⁺-Kalibrierung

Für die Bestimmung der [Ca²⁺]_i-Konzentration in HaCaT-Zellen muß im Vorfeld eine Eichkurve erstellt werden.

Die für jede einzelne Ca²⁺-Konzentration erhaltenen mittleren MFI-Werte bilden die Grundlage zur Bestimmung folgender Parameter:

F ist die gemessene Fluoreszenzintensität der Probe

F_{min} ist die Intensität, bei minimal erreichbarer intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration

F_{max} ist die Intensität, bei maximal erreichbarer intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration

K_d ist die Dissoziationskonstante des Ca²⁺/Fluo-3 Komplexes

Für den physiologisch interessierenden Bereich der intrazellulären Calciumkonzentration von 0 µM bis 40 µM wurden mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt. Der niedrigste (F_{min}) und der höchste Wert (F_{max}) wurden als Grenzwerte für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d für das jeweilige System (Fluoreszenzreader und Durchflußzytometer) herangezogen (Firmenvorschrift Calcium Calibration Buffer Kits; Molecular Probes, INC.). Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d des Ca²⁺/Fluo-3 Komplexes bedient man sich der logarithmischen Auftragung von Log[(F-F_{min})/(F_{max}-F)] gegen Log [Ca²⁺]_i. Durch lineare Regression erhält man eine Geradengleichung der Form $y = m \cdot x + n$, die für y = 0 den Log-Wert für K_d liefert. Für den Fluoreszenzreader wurde ein K_d-Wert von K_d = 334,7 nM und für das Durchflußzytometer ein Wert von K_d = 372,03 nM in recht guter Übereinstimmung errechnet. Vergleicht man die beiden erhaltenen

Regressionskoeffizienten (Fluoreszenzreader $R = 0,9872$ und Durchflußzytometer $R = 0,9972$), ergibt sich für das Durchflußzytometer eine Geradengleichung, die einem Regressionskoeffizienten von $R = 1$ am nächsten ist. Werden die beiden Anstiege (Fluoreszenzreader $m = 1,05694$ und Durchflußzytometer $m = 0,9032$) miteinander verglichen, so stellt man fest, daß die Empfindlichkeit der beiden Methoden annähernd gleich ist.

In Abb. 15 ist die logarithmische Auftragung der MFI-Werte des Fluoreszenzreaders und des Durchflußzytometers zur Ermittlung von K_d zu sehen.

Allgemein gilt für Fluoreszenzfarbstoffe, die nur ein Emissionssignal aufweisen, eine logistische Funktion Gl. 2 (Grynkiewicz et al., 1985).

$$Ca^{2+} = K_d \cdot \frac{(F - F_{min})}{(F_{max} - F)} \quad \text{Gl. 2}$$

Durch die Anwendung der Gleichung 2 auf die ermittelten Ergebnisse von Fluoreszenzreader und Durchflußzytometer ergaben sich sigmoide Kurven (Abb. 16).

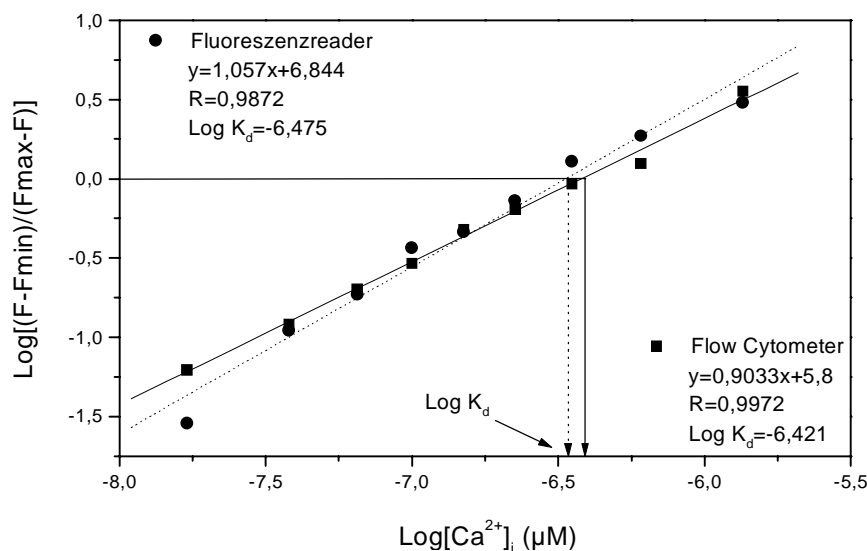


Abb. 15 Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_d des Ca^{2+} /Fluo-3 Komplexes am Fluoreszenzreader und am Durchflußzytometer

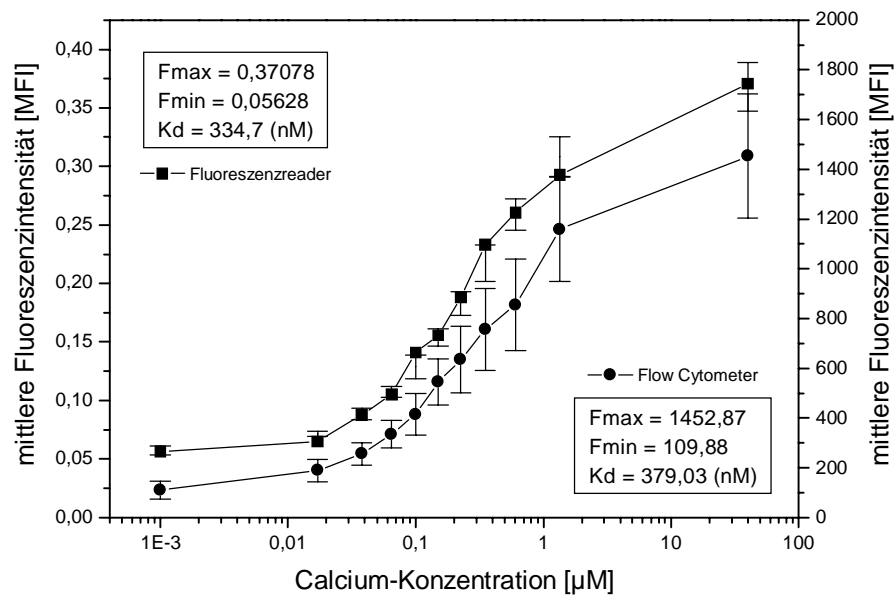


Abb. 16 Ca^{2+} -Kalibrierung am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader

Die Berechnung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration erfolgt nach Gleichung 2. Die Herleitung dieser Berechnungsgrundlage kann in der Publikation von Grynkiewicz et al. (1985) nachvollzogen werden.

Ein auf keinen Fall zu vernachlässigender physikalischer Parameter ist die Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten vom Ca^{2+} /Fluo-3 Komplex. Bei 22 °C gilt für Fluo-3 ein K_d -Wert von 400 nM und bei 37 °C ist $K_d = 864$ nM (Minta et al., 1989 und Merrit et al., 1990). Da die Dissoziationskonstante auch abhängig von der Ionenstärke und dem pH-Wert ist, sollte sie für das jeweilige Meßsystem bestimmt werden. Durch Umstellung der Gleichung 2 und anschließender logarithmischer Auftragung (Abb. 15) läßt sich der K_d -Wert des Systems bestimmen. Diese Vorgehensweise ist in der Firmenvorschrift des Calcium Calibration Buffer Kit #2 (Molecular Probes, INC.) beschrieben und erläutert. Mit dieser Methode ist eine Ca^{2+} -Kalibrierung am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader möglich, wobei es aber für den Fluoreszenzreader Einschränkungen gibt. Jeder ermittelte mittlere MFI-Wert ist von der Zellzahl im Well der Mikrotiterplatte abhängig, so daß es hier innerhalb eines Versuches zu hohen Schwankungsbreiten kommen kann. Eine Möglichkeit, die Zellzahl simultan zur Calciummessung zu bestimmen, ohne einen direkten Einfluß auf die adhären gewachsenen Zellen zu nehmen, gibt es nicht. Coulter Counter ermöglichen zwar die genaue Zellzahlbestimmung, aber dafür System sind Zellsuspensionen notwendig. Zellzahlbestimmungen mit Fluoreszenzfarbstoffen sind unrealistisch, da Interaktionen mit Calcium-regulatorischen Prozessen nicht ausgeschlossen werden können.

Einfluß von Fettsäuren auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Keratinozyten

Der Einfluß hoher Konzentrationen von freier Fettsäure auf den intrazellulären Calciumgehalt ist in Abb. 17 dargestellt. Die Zugabe von Linolsäure führte innerhalb weniger Minuten zu einem steilen Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bis auf 250 %, die sich nach kurzer Zeit auf einen Wert von 142 %, bezogen auf die Kontrolle, einstellte. Die geringere Konzentration von Linolsäure (500 μM) führte nach ca. 5 min und die hohe Konzentration (5000 μM) nach 10 min zu einem Maximum an $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Freisetzung. Die Zunahme des Anteils der toten Zellen im Versuchslauf weist auf eine hohe toxischen Wirkung der freien Fettsäure hin.

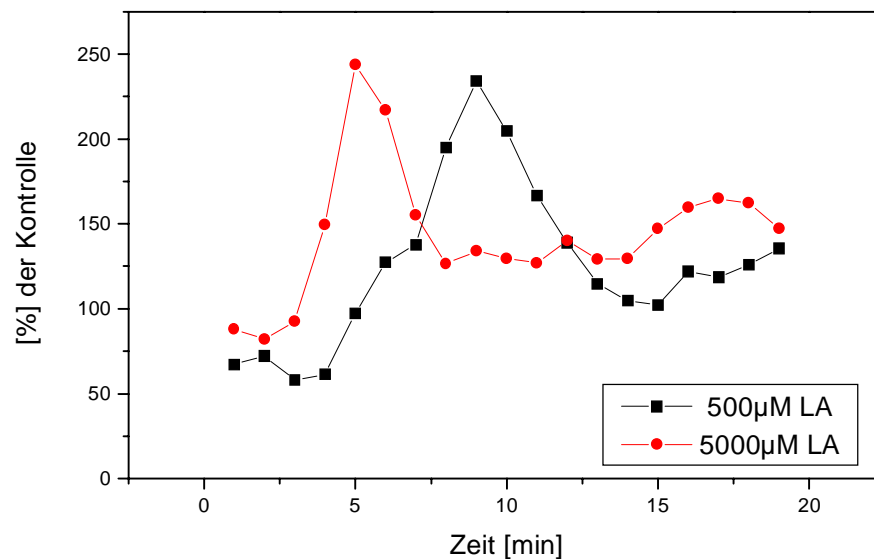


Abb. 17 Einfluß hoher Linolsäure-Konzentrationen auf die freie Ca^{2+} -Konzentration in HaCaT-Zellen

Konzentrationen von 10 μM und 100 μM Linolsäure am Durchflußzytometer führten zu einem gleichbleibenden Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über mehrere Minuten (Abb. 18 und Abb. 19). Hierbei konnte eine Steigerung des freien Ca^{2+} -Gehalts sowohl bei einem extrazellulären Calciumgehalt von 2 mM als auch bei Ca^{2+} -freien Untersuchungsbedingungen beobachtet werden.

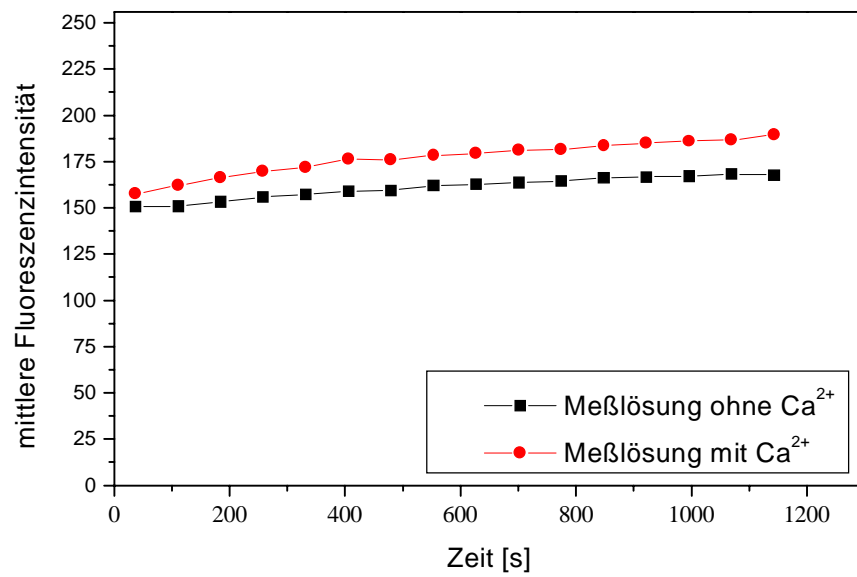


Abb. 18 Einfluß von 10 μM Linolsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung

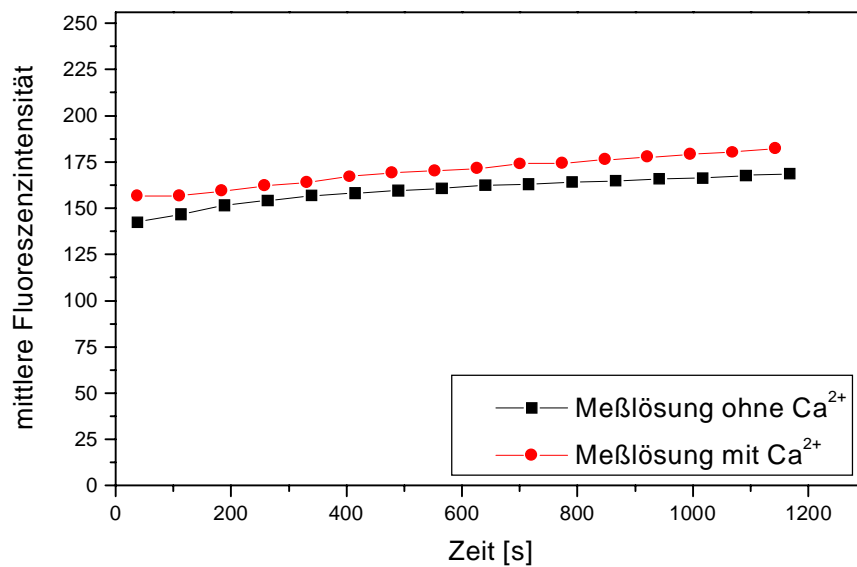


Abb. 19 Einfluß von 100 μM Linolsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung

Die Versuche mit 10 μM und 100 μM Arachidonsäure am Fluoreszenzreader führten zu einem kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Bei Vorhandensein von extrazellulärem Calcium (2 mM) war ein steilerer Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration zu beobachten als bei den Versuchen ohne extrazellulärem Calcium (Abb. 20 und Abb. 21).

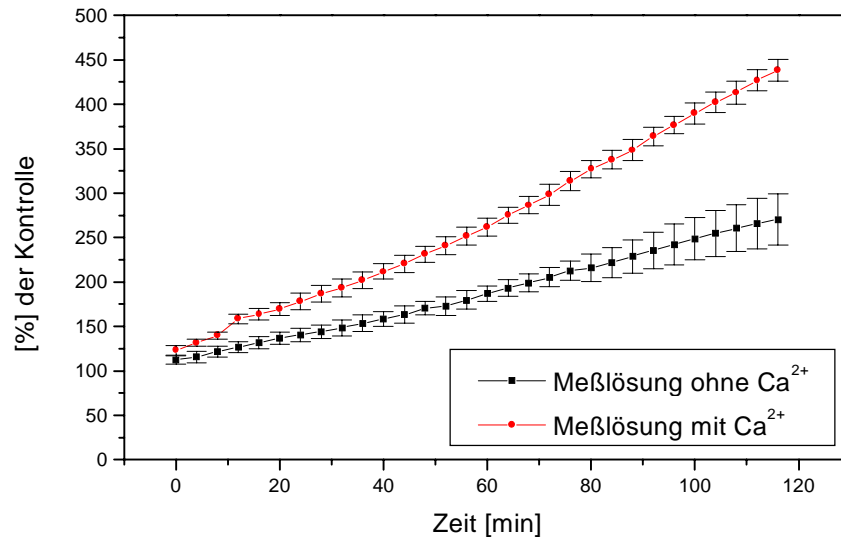


Abb. 20 Einfluß von 10 μM Arachidonsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung; n=16

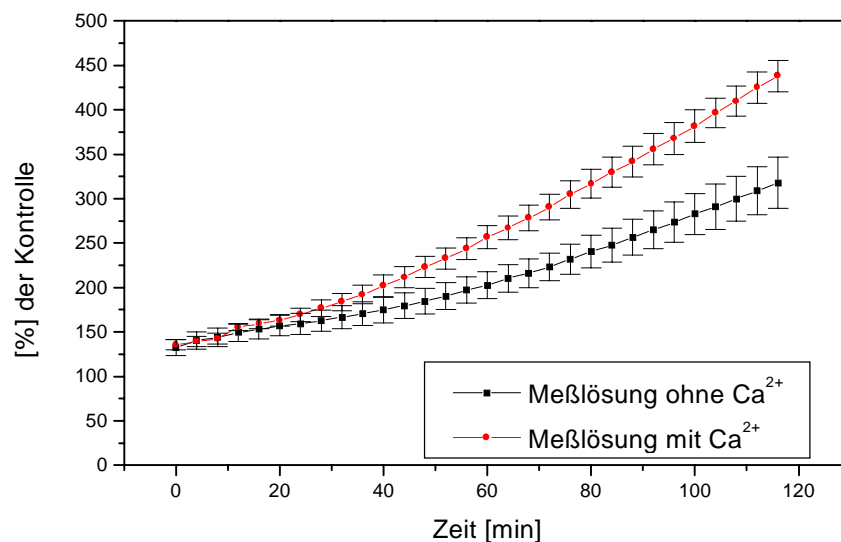


Abb. 21 Einfluß von 100 μM Arachidonsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung; n=16

Eine Korrelation zwischen der Anzahl der Doppelbindungen in den Fettsäuren (Ölsäure, Linolsäure, γ -Linolensäure und Arachidonsäure) und der Ca^{2+} -Freisetzung war nicht nachzuweisen.

Diskussion

Calcium erfüllt in der Haut wichtige regulatorische Funktionen. So beschreibt Fairley (1988) die Bedeutung von Calcium als second Messenger und Regulator für die Desmosomenausbildung und Menon et al. (1994) die Integrität der Permeabilitätsbarriere mit dem epidermalen Calciumgradienten. Für die Differenzierung und Proliferation von epidermalen Zellsystemen ist die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen von großem Interesse (Lee et al., 1992, Jones und Shrape, 1994 und Lee et al., 1994). Für die Kultivierung ist das extrazelluläre Calcium ein wesentlicher Faktor, indem er einen direkten, aber auch indirekten Einfluß auf den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gehalt nimmt und dadurch für Veränderungen im Proliferations- und Differenzierungsverhalten verantwortlich gemacht wird (Hennings et al., 1980 und Thiele, 1995).

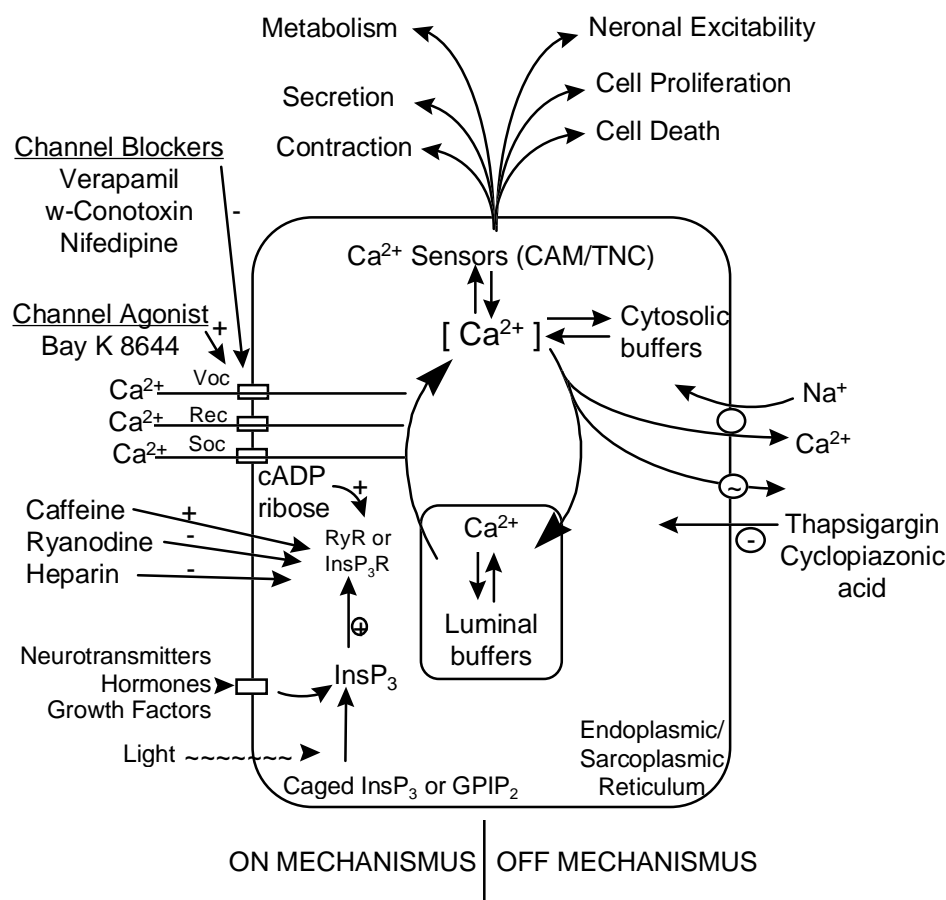


Abb. 22 Schema über „Ein- und Ausschaltmechanismen“ und die Modulation von intrazellulären Calciumspiegeln (nach Calbiochem-Novabiochem, 1996)

Änderungen der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch äußere Einflüsse sind in vielen Publikationen Gegenstand der Diskussion. Pande et al. (1996) haben mit Staurosporin behandelte Rattenfibroblasten F111 im Zellzyklus synchronisiert und anschließend die einzelnen Zellzyklusphasen auf den intrazellulären Calciumgehalt untersucht. Eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration im Kulturmedium bedingt nach 2 Minuten in normalen und neoplastischen Keratinozyten eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Gehalts (Hennings et al., 1989). Eine Blockierung von Ca^{2+} -„Pumpen“ durch 2,5-Di-tert-butylhydrochinon kann den Zellzyklus phasenunspezifisch arretieren (Short et al., 1993).

Der Einfluß von freien Fettsäuren auf HaCaT-Zellen und die dadurch induzierte Änderung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde von Glanz et al. (1996) am konfokalen-Laserscanning-Mikroskop und Fröde et al. (1997) am Durchflußzytometer untersucht. Auf Grund des rapiden intrazellulären Calciumanstieges nach Zugabe von freier Fettsäure auf HaCaT-Zellen sollte der Mechanismus des Fettsäuretransportes in die Zelle diskutiert werden.

In der Literatur gehen die Meinungen diesbezüglich auseinander. Während Fitscher et al. (1996) hauptsächlich von einem proteinabhängigen Transport ausgeht, favorisiert Zakim (1996) den Fettsäuretransport durch die Zellmembran mittels Diffusion. In der Tat wurde ein epidermales fettsäurebindendes Protein gefunden, es soll allerdings nur den Fettsäuretransport innerhalb der Zelle fördern (Siegenthaler et al., 1994).

Auch wenn das Transportproblem kontrovers diskutiert wird, liegen für den Einfluß von freien Fettsäuren auf das intrazelluläre Calcium vergleichbare Ergebnisse vor (Glanz et al., 1996, Fröde et al., 1997). Hohe Konzentrationen von freien Fettsäuren scheinen eine rasche Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus den Speichern zu induzieren (Abb. 17). Die Reaktion geht soweit, daß die Zellen nach einer bestimmten Zeit in Lyse übergehen, wahrscheinlich durch Verlust der Membranintegrität als Folge einer gesteigerten Membranfluidität. Im Konzentrationsbereich von 10 μM bis 100 μM führen die Fettsäuren lediglich zu einem kontinuierlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildungen 18, 19, 20 und 21). In Gegenwart von extrazellulärem Calcium scheint der Anstieg des intrazellulären Calcium auf einem höheren Niveau stattzufinden. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration kann durch Influx von extrazellulärem Calcium hervorgerufen werden (MC Govern et al., 1995). Die Phosphoinositidkaskade (Stryer, 1991) könnte solche regulatorischen Prozesse auslösen, die mit einem Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen einhergehen (Abb. 23). Die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat führt zu einer raschen Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem endoplasmatischen Reticulum und dem sarkoplasmatischen Reticulum glatter Muskelzellen. Es kann folgende Reaktionen in vielen Zelltypen auslösen, unter anderem (Stryer, 1991):

- Glykogenolyse in Leberzellen
- Histaminsekretion durch Mastzellen
- Aggregation von Blutplättchen
- Kontraktion glatter Muskeln

Der zweite Messenger, das Diacylglycerin, aktiviert die Proteinkinase C, die in vielen Zielproteinen Serin- und Threoninreste phosphoryliert. Sie wirkt synergistisch auch zum Inositol-1,4,5-trisphosphat. Die Kaskade wandelt extrazelluläre in intrazelluläre Signale und entläßt also in ihrem Ablauf zahlreiche Moleküle mit Signalfunktion (z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat [IP₃] und Diacylglycerin [DAG]).

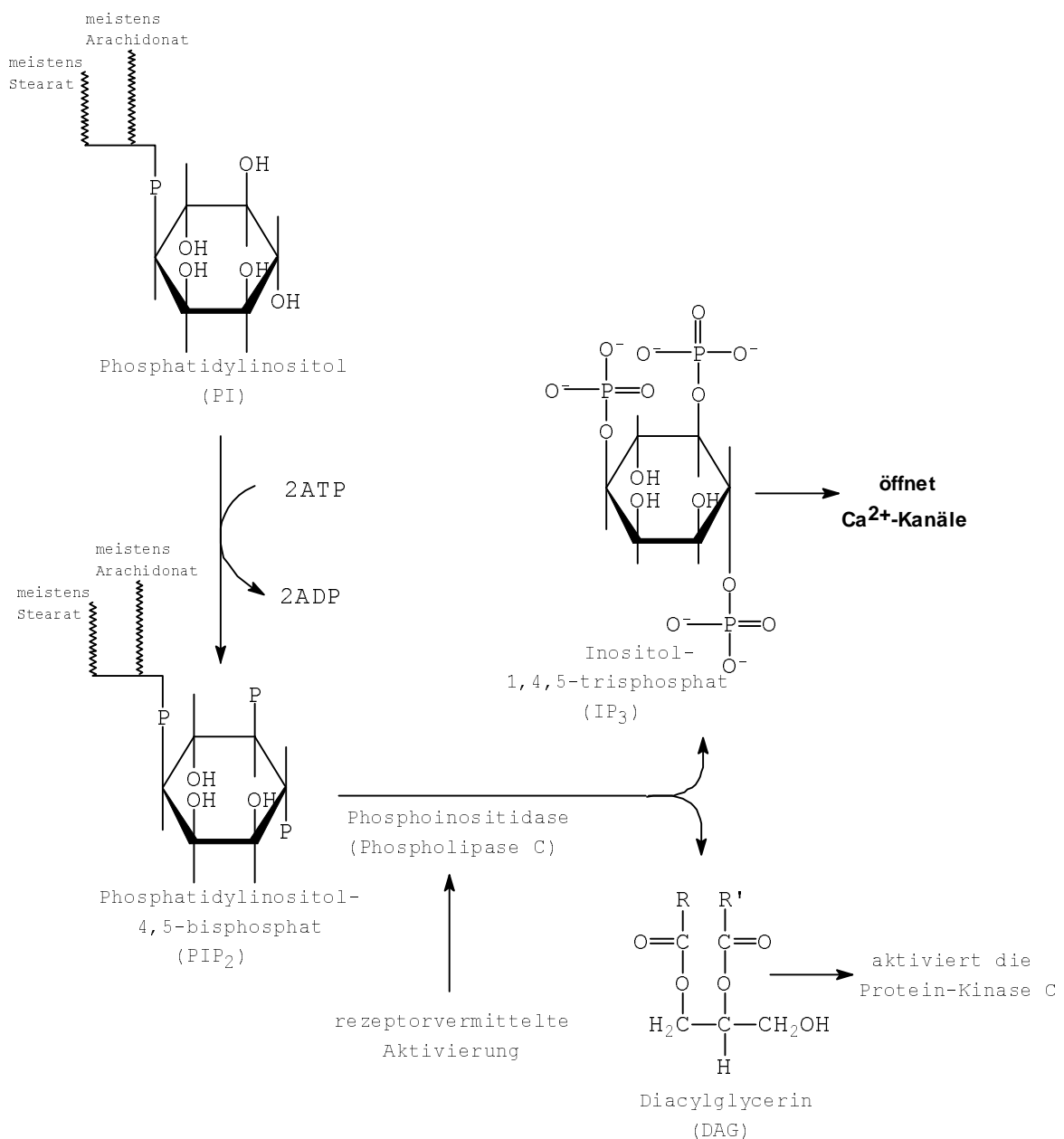


Abb. 23 Synthese und rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (nach Stryer, 1991)

Denkbar ist auch, daß durch den Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ -Gehalts ein Messenger freigesetzt wird, der den Ca^{2+} -Influx stimuliert (Randriamampita und Tsien, 1993). Allerdings kommt es auch ohne Vorhandensein von extrazellulärem Calcium zu einer $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung bei Einsatz von freien Fettsäuren. Diese Freisetzung kann nur durch Mobilisierung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern hervorgerufen werden, z.B. aus calciumspeichernden Proteinen, dem endo-plasmatischen Reticulum und dem Mitochondrium.

Änderung des mitochondrialen Membranpotentials von Keratinozyten unter Einfluß von Fettsäuren

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-123 (R-123) lassen sich Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) am Durchflußzytometer nachweisen, eine Erhöhung der Fluoreszenz bedeutet gleichermaßen eine Erhöhung des MMP (Ormerod, 1994, Schmitz und Rothe, 1994 und Sureda et al., 1997).

Ethanol mit einer Konzentration von 0,2 % in HBSS-Lösung (Suspensionslösung der Fettsäuren) diente als Kontrolle. Die Fluoreszenz von R-123 blieb über einen Zeitraum von 15 min konstant (Abb. 24). Fettsäure, nach 2 min eingespritzt, verursachte einen Anstieg der R-123 Fluoreszenzintensität. Hierbei war auch eine Konzentrationsabhängigkeit zu den Fettsäuren zu sehen. Linolsäure mit 30 μ M erzeugte nach ca. 1 min und 36 s eine Zunahme des Fluoreszenzsignals und Linolsäure mit 75 μ M (Abb. 25) nach ca. 24 s. Die Zeit entspricht der Messung nach der Einspritzung. Die eingesetzten Konzentrationen (30 μ M u. 75 μ M Linolsäure) führten zu einem über einen langen Zeitraum gleichbleibendem Niveau.

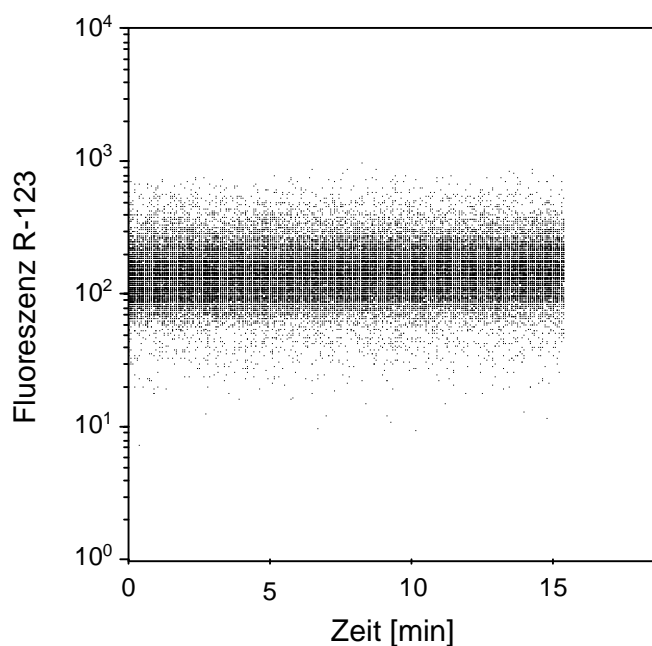


Abb. 24 Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials mit R-123 in fettsäurefreier HBSS-Lösung mit 0,2 % Ethanol

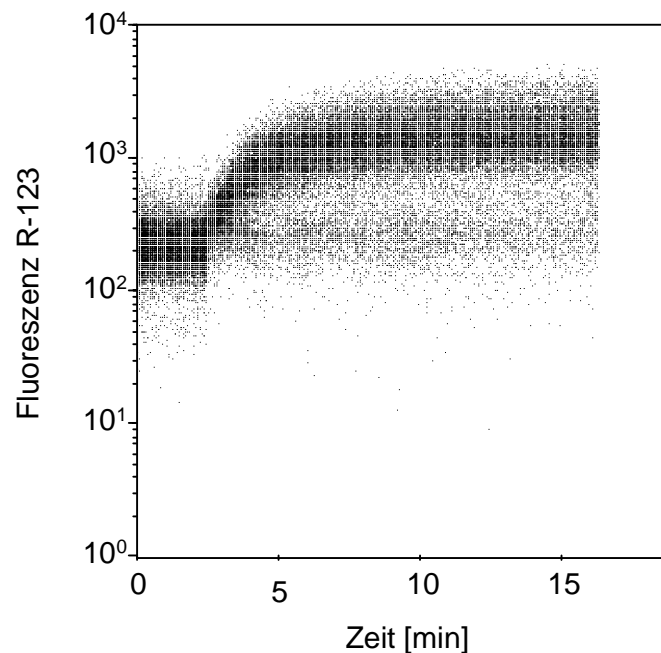


Abb. 25 Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials in HBSS-Lösung mit 75 μM Linolsäure

Auch die Fettsäuren 10-Methyl-Palmitinsäure (40, 75 μM), Ölsäure (40, 50 μM), γ -Linolensäure (20, 30 μM) und Arachidonsäure (30, 40 μM) verursachten einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die nach mindestens 15 min erreichte Maximalintensität hatte auch noch nach ca. 1 h 30 min Bestand, allerdings nahm der Anteil der lebenden Zellen in dieser Zeit ab.

Diskussion

Analog zur Zellmembran wird auch an der inneren mitochondrialen Membran ein Potential aufgebaut (mitochondriales Membranpotential, MMP), dessen Energie zur Synthese von ATP und zum Transport von Metaboliten und anorganischen Ionen in den Matrixraum genutzt wird. Eine ausführliche Beschreibung dieser Vorgänge ist bei Alberts et al. (1997) zu finden. Dieser durch das MMP aufgebaute, elektrochemische Protonengradient wird unter anderem auch für den Import von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das Mitochondrium genutzt. Das Calcium kann dann dort in Form von Calciumphosphat gespeichert werden. Petronilli et al. (1993) zeigten, daß in *in vitro* gehaltene Mitochondrien Ca^{2+} -Ionen und Palmitat die Porenöffnung modifizieren bzw. anregen. Dies soll zu einer Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen führen und dadurch andere Mitochondrien zur Porenöffnung anregen (Anstieg des MMP). Eine Reduktion des MMP erfolgt erst viel später. Petit et al. (1996) beschreiben

in einem Übersichtsartikel, daß eine Induzierung der Porenöffnung von Mitochondrien eine Vorstufe zur Apoptose darstellt. Wird von einer apoptotischen Wirkung der freien Fettsäuren ausgegangen, sollte das MMP zu einem bestimmten Zeitpunkt zusammenbrechen, da frühe Phasen der Apoptose mit dieser Reaktion einhergehen (Gorman et al., 1997; Koester et al., 1997). In isolierten Erbsen-Mitochondrien konnte durch Wirkung von Fettsäuren (Linol-, γ -Linolen-, Öl- und Palmitinsäure) eine Änderung bzw. ein verzögerter Zusammenbruch des MMP nachgewiesen werden (Petrucci et al., 1992). Der Zeitpunkt des Zusammenbruchs des MMP ist von Zellart, von Zelle zu Zelle und von den Induktoren abhängig (Macho et al., 1996). Gemessene Änderungen des MMP konnten nicht mit jedem Fluoreszenzfarbstoff für das mitochondriale Membranpotential gemessen bzw. nachvollzogen werden (Gorman et al., 1997). So beschreiben Poot et al. (1997) auch, daß in verschiedenen Studien zur Apoptose mit dem mitochondrialen Fluoreszenzfarbstoff JC1 eine spektrale Änderung des Emissionssignales nachgewiesen wurde, die bei dem Farbstoff R-123 nicht beobachtet werden konnte. Die biochemische Basis dieses Phänomens ist bisher noch nicht geklärt. Eine gefundene Erhöhung des MMP durch Fettsäuren steht also in keinem Widerspruch zur Theorie bzw. Praxis der Apoptose-Induzierung.

Differenzierung und Apoptose von Keratinozyten

Einfluß von Fettsäuren auf die Differenzierung von Keratinozyten

Die Kenntnis der Bedeutung der Erhöhung des $[Ca^{2+}]_i$ -Gehaltes für die Differenzierung der Keratinozyten legt es nahe, durch freie Fettsäuren einen Einfluß auf den Differenzierungsprozeß zu vermuten. Dazu wurde nach Linolsäure- und Arachidonsäurezusatz die Bestimmung von Involucrin und Filaggrin in HaCaT-Keratinozyten vorgenommen.

Involucrin, ein früher Differenzierungsmarker, zeigte weder nach 24 noch nach 48 Stunden nach Fettsäurezugabe (Arachidonsäure) eine veränderte Expression (Abb. 26 A, B).

Der Filaggrinnachweis wurde unter Einfluß von Linolsäure untersucht. Auch bei diesen Experimenten konnte nach 24- und 48-stündiger Fettsäureexposition keine Veränderungen im Filaggringehalt der Keratinozyten nachgewiesen werden (Abb. 26 C, D).

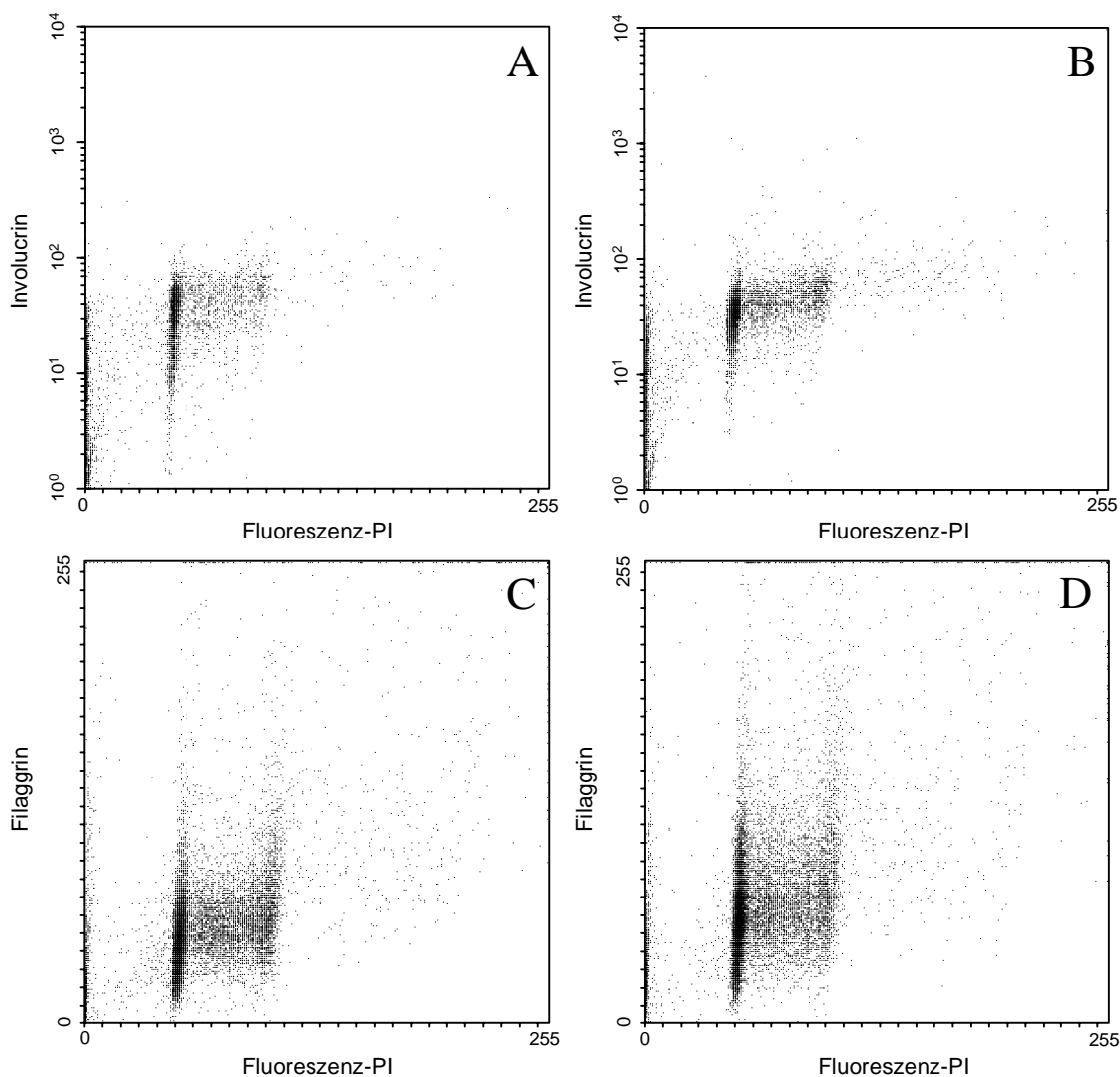
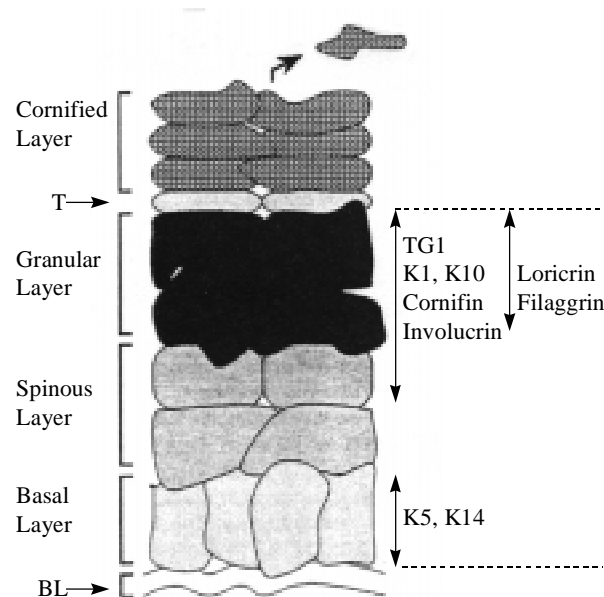


Abb. 26 Vergleich der Involucrin- und Filaggrinexpression nach 48 h unter Fettsäureeinwirkung auf humane Keratinozyten; A, C EtOH 0,2%; B 10 μ M Arachidonsäure; D 25 μ M Linolsäure

Diskussion

Die störungsfreie Differenzierung von Keratinozyten stellt eine entscheidende Voraussetzung für die Bildung einer struktur-funktionell intakten Hornschicht humaner Haut dar. Kommt es innerhalb des Differenzierungsprozesses zu Fehlregulationen, so ist in deren Folge die Barrierefunktion der Hornschicht mehr oder weniger deutlich gestört. Das Ergebnis dieser Störungen wird bei einer Vielzahl von Dermatosen klinisch manifest (Menon und Elias, 1991). Eine große Zahl von Untersuchungen belegt diese

Zusammenhänge (u. a. Fartasch et al., 1992, Griffiths et al., 1992). Die Proteine Involucrin und Filaggrin sind für die Differenzierung des Keratinozyten zum Corneozyten von zentraler Bedeutung. Sie sind gewissermaßen die Vorboten der beginnenden Differenzierung und treten daher in ihrer Expression sehr früh in Erscheinung. Die schematische Darstellung der Epidermis (Abb. 27) von Eckert und Welter (1996) zeigt die morphologisch zeitliche Zuordnung der höchsten Expression von Involucrin und Filaggrin während des Differenzierungsablaufes.



**Abb. 27 Schematische Repräsentation von Bereichen der Genexpression wichtiger Proteine in der Epidermis (BL- basal lamina).
(modifiziert nach Eckert und Welter, 1996)**

Eine Änderung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Kultur von HaCaT-Keratinozyten und der Einsatz von 1,25-Dihydroxyvitamin D konnte eine erhöhte Expression von Involucrin hervorrufen (Ratnam et al., 1996). Paramio und Jorcano (1997) zeigten, daß es durch Inhibierung der Tyrosinkinase zu einer verzögerten Involucrinexpression kommt. Allgemein konnte auch nachgewiesen werden, daß Involucrin ein sehr früher Differenzierungsmarker ist und noch vor Loricrin, welches wichtig für die Bildung des cornified envelope's ist, gebildet wird. Es wird schon sehr zeitig im Stratum spinosum exprimiert und ist eng an der Ausprägung der cornified envelope beteiligt. In der Proteinhülle des Corneozyten sorgt es als eine Art Matrix, im Verband mit weiteren Proteinen für die Verankerung der Keratinfilamente (Ishida-Yamamoto et al., 1997).

Die Fettsäuren Arachidonsäure und Linolsäure erbrachten keine nachweisbaren Änderungen in der Expression von Involucrin bzw. Filaggrin bei HaCaT-Keratinocyten. Obwohl die Fettsäuren eine Erhöhung des Ca^{2+} -Signals hervorrufen, konnte kein Nachweis einer Expressionsänderung für eine zelluläre Differenzierung geführt werden. Demgegenüber sind Störungen in der Fettsäuresynthese von Keratinocyten mit Folge einer gestörten Zusammensetzung und Funktion der intercorneozytären Lipidbilayer als Ausdruck einer gestörten Differenzierung bekannt (Imokawa et al., 1989). Durch topische Applikation von Fettsäuren kann diese Störung substituiert werden, wodurch die reduzierte Permeabilitätsbarriere wieder stabilisiert wird (Buslau und Thaci, 1996, Bonte et al., 1997, Schneider und Wohlrab, 1997).

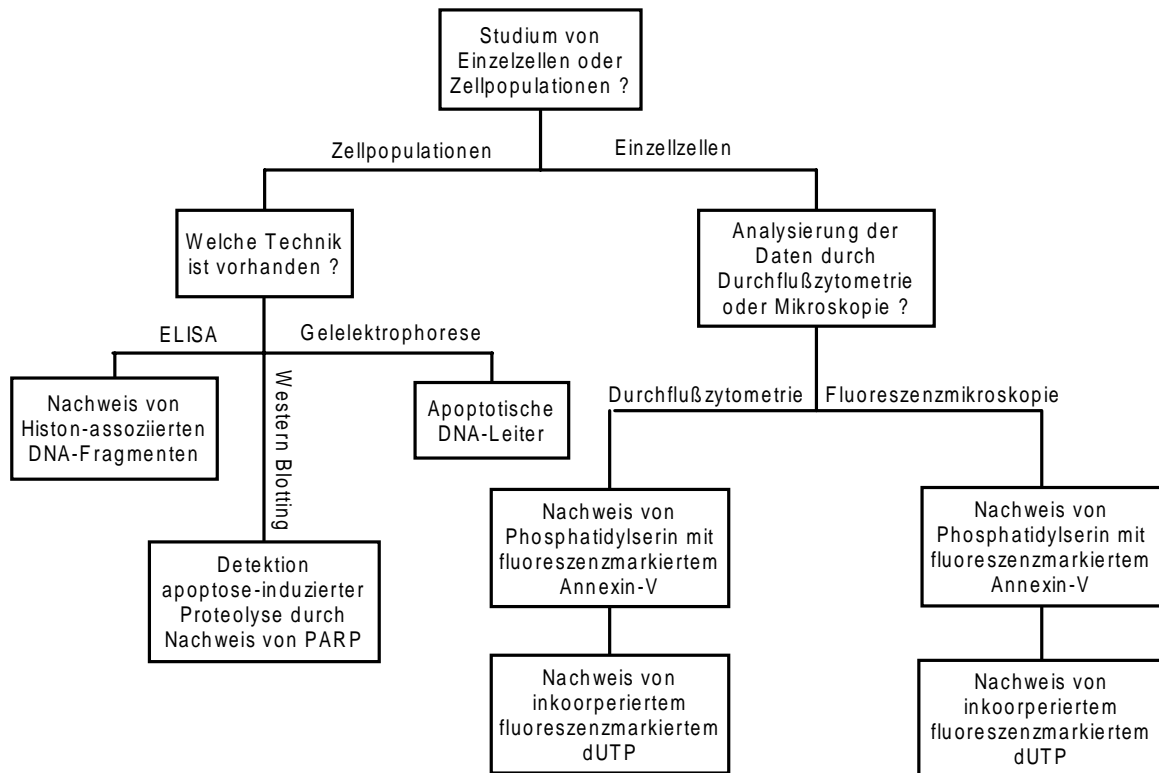
Apoptose von Keratinocyten

Die Apoptose ist eine morphologisch distinkte und genetisch regulierte Form des Zelltodes. Im Gegensatz zur Nekrose wird Apoptose durch extrazelluläre Signale ausgelöst, wie z.B. Verlust essentieller Wachstumsfaktoren, Aktivierung bestimmter Zelloberflächenrezeptoren, Einwirken von Glukokortikoidhormonen oder DNA-schädigenden Agenzien (Stewart, 1994, Paus et al., 1995, Noll und Eschborn, 1997, Rudin et al., 1997). Diese Signale initiieren das intrazelluläre „Zelltod“-Programm, welches eine *de novo* Genexpression erfordert. Morphologische und biochemische Analysen apoptotischer Zellen lassen charakteristische Merkmale wie Kondensation des Zytoplasmas, Verlust der Plasmamembran-Mikrovilli, Segmentierung des Zellkerns und internukleosomaler Abbau chromosomaler DNA erkennen. Nach elektrophoretischer Auftrennung ist die fragmentierte DNA als deutliche DNA-Leiter im Agarosegel zu erkennen, wobei die einzelnen Banden um jeweils 180 Basenpaare differieren. Die Zellen zerfallen schließlich in apoptotische Körperchen, die durch Phagozytose eliminiert werden (Hess et al., 1997).

Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des normalen Zellumsatzes. Im Verlauf der Embryogenese (Eijende et al., 1997), der Metamorphose und der endokrin-abhängigen Gewebeatrophie sterben die Zellen durch Apoptose. Auch in HaCaT-Zellen konnte durch UVB-Bestrahlung Apoptose induziert werden (Schwarz et al., 1995).

Eine Deregulation des programmierten Zelltodes ist auch maßgeblich an der Entwicklung und Progression maligner Tumoren beteiligt (Raskin, 1997).

Für die Charakterisierung des programmierten Zelltodes stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die Abbildung 27 gibt einen Überblick über einige instrumentalanalytische Möglichkeiten des Apoptosenachweises.



**Abb. 28 Möglichkeiten der Detektion apoptotischer Zellen
(modifiziert nach Boehringer Mannheim, 1996)**

Eine der frühesten erkennbaren Phasen der Apoptose sind strukturelle Veränderungen in den Membranen der Zelle. Es kommt zu einer Erhöhung des Anteils der gesättigten Fettsäuren, die in Phospholipiden enthalten sind. Hierbei steigt hauptsächlich der Anteil der gesättigten Fettsäureseitenkette in Phosphatidylserin, -inositol und -ethanolamin, in Phosphatidylcholin dagegen nicht. Diese Veränderungen können dramatische Auswirkungen auf die Membranfluidität beinhalten und vielleicht den Weg von Endonukleasen in den Zellkern ebnet (Singh et al., 1996). Mit Hilfe von Translokasen, die hierfür Calcium benötigen, gelangt Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Zellmembranoberfläche der Zelle (Beverly et al., 1996).

Diese Translokation in der frühen Phase der Apoptose wird mittels des Proteins Annexin-V (fluoreszenzmarkiert) zum Nachweis der Apoptose in den verschiedensten Zellsystemen genutzt (O'Brien et al., 1997, Darzynkiewicz et al., 1997, Eijnde et al., 1997). Eine grafische Darstellung dieses beschriebenen Vorgangs ist in Abb. 29 wiedergegeben.

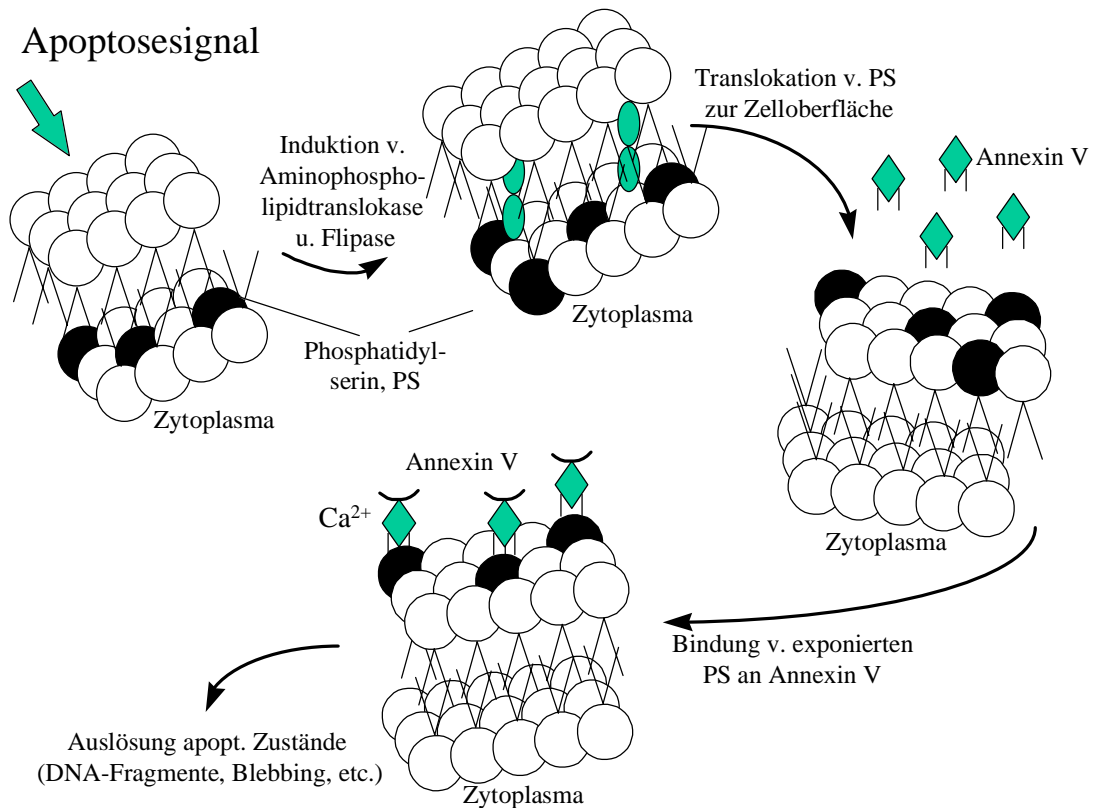


Abb. 29 Schematische Darstellung molekularbiologischer Vorgänge der Translokation von Phosphatidylserin und dessen Nachweis mit Annexin-V (modifiziert nach Calbiochem-Novabiochem, 1997)

Die Kombination von Annexin-V-FLUOS und PI ermöglicht am Durchflußzytometer die Diskriminierung von vitalen, apoptotischen, spätapoptotisch/nekrotischen Zellen und die von Zellkernen. In der Abbildung 30 werden die zu erwartenden Fluoreszenzsignale zusammengefaßt.

Fluoreszenz Zellen	Propidiumiodid	Annexin-V- FLUOS
vital	-	-
apoptotisch	-	+
spätapoptotisch/ nekrotisch	+	+
"Kerne"	+	-

Abb. 30 Zu erwartende Signalintensitäten bei der Messung der Apoptose mit Annexin-V-FLUOS

Zellen, die weder apoptotisch noch nekrotisch sind, nehmen keinen Farbstoff auf. Apoptotische Zellen haben als Charakteristikum Phosphatidylserin auf der äußeren zytoplasmatischen Membran und sind somit für Annexin-V-FLUOS positiv. Da apoptotische Zellen auch durch kultivierungsbedingte Einflüsse ihre Membranintegrität verlieren können, war eine Unterscheidung von spätapoptotischen und rein nekrotischen Zellen nicht möglich.

Nachweis der Apoptose von Keratinozyten unter Einfluß von Fettsäuren mit Annexin-V-FLUOS

Unbehandelte HaCaT-Keratinozyten zeigen ein niedriges Signal von Annexin-V-FLUOS und PI (Abb. 31), ein Zeichen für das Vorliegen überwiegend vitaler Zellen mit geringen Apoptoseanteil. Demgegenüber ist unter Einwirkung von 30 µM Linolsäure eine Apoptoseinduktion nachweisbar bei unveränderter Vitalität der Zellpopulation (Abb. 32). Die Einwirkzeit der Linolsäure betrug 24 Stunden.

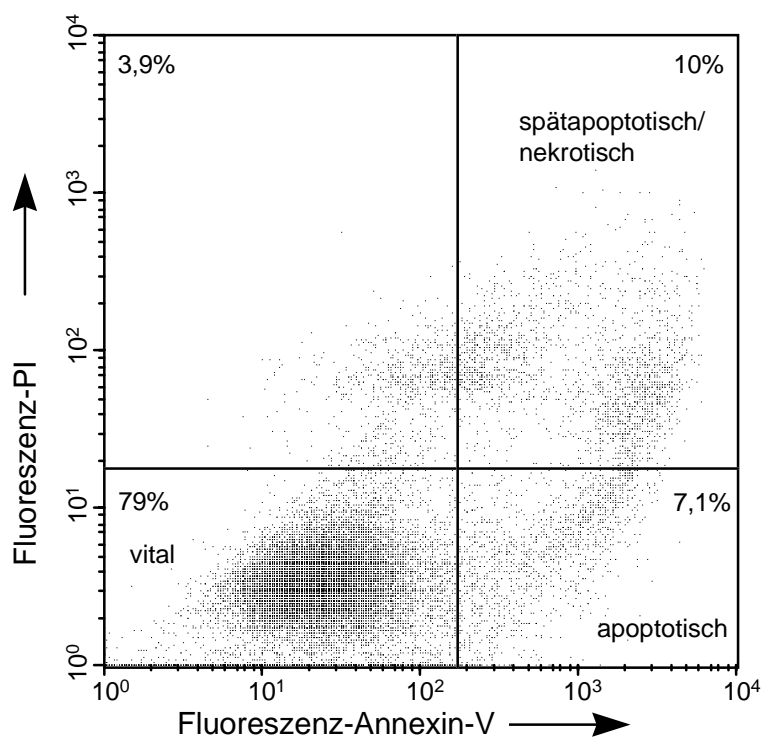


Abb. 31 Nachweis apoptotischer HaCaT-Zellen mit Annexin-V-FLUOS in fettsäurefreier HBSS-Lösung mit 0,2 % Ethanol

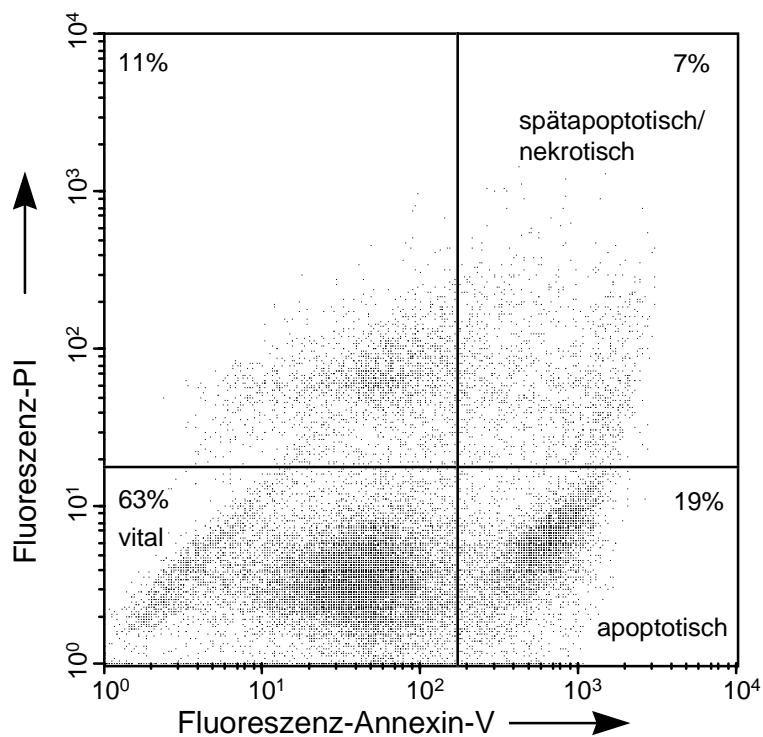


Abb. 32 Änderung des Anteils apoptotischer HaCaT-Zellen mit Annexin-V-FLUOS in HBSS-Lösung mit 30 μ M Linolsäure

Apoptoseinduktion in Abhängigkeit von der Fettsäure-Konzentration

Weiterführende Untersuchungen belegen, daß der Grad der Apoptoseauslösung von der Fettsäurekonzentration abhängig ist. So ist mit Konzentrationen von 50 μM bis 75 μM 10-Methyl-Palmitinsäure verstärkt die Apoptose auslösbar, wobei der Anteil der vitalen Zellen fast proportional zum Anstieg der apoptotischen Zellen abnimmt. Die Anzahl der nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen veränderte sich dagegen mit steigender Fettsäurekonzentration nicht (Abb. 33). Die Ölsäure (Abb. 34) zeigte schon bei einer Konzentration von 45 μM bis 50 μM einen drastischen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen, wobei gleichzeitig der Anteil der spätapoptotisch-nekrotischen Zellen nahezu unverändert blieb.

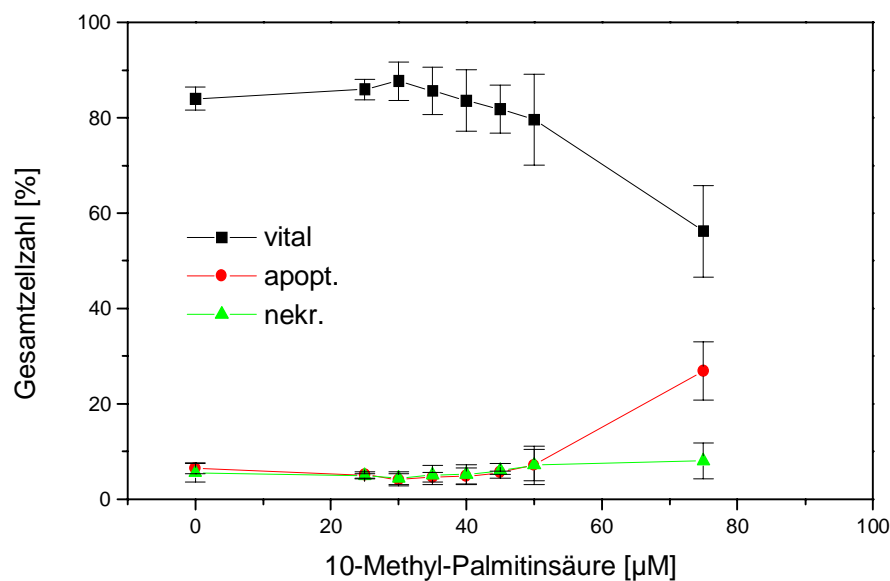


Abb. 33 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der 10-Methyl-Palmitinsäure-Konz.; n=4

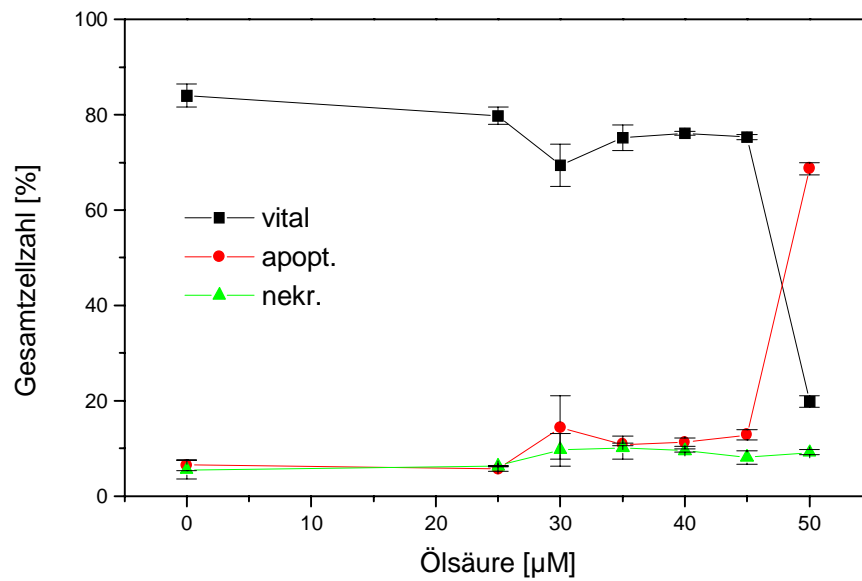


Abb. 34 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Ölsäure-Konz.; n=4

Im Gegensatz zu den Befunden mit Ölsäure ist beim Einsatz von Linolsäure ein kontinuierlicher Anstieg apoptotischer Zellen mit zunehmender Linolsäure-Konzentration zu beobachten (Abb. 35). Beim Einsatz von γ -Linolensäure beginnt die starke Zunahme apoptotischer Zellen im Konzentrationsübergang von 20 μ M bis 25 μ M mit deutlicher Abnahme des vitalen Zellanteils (Abb. 36). Der Anteil der spätapoptotisch-nekrotischen Zellen war auch unter diesen Bedingungen unverändert.

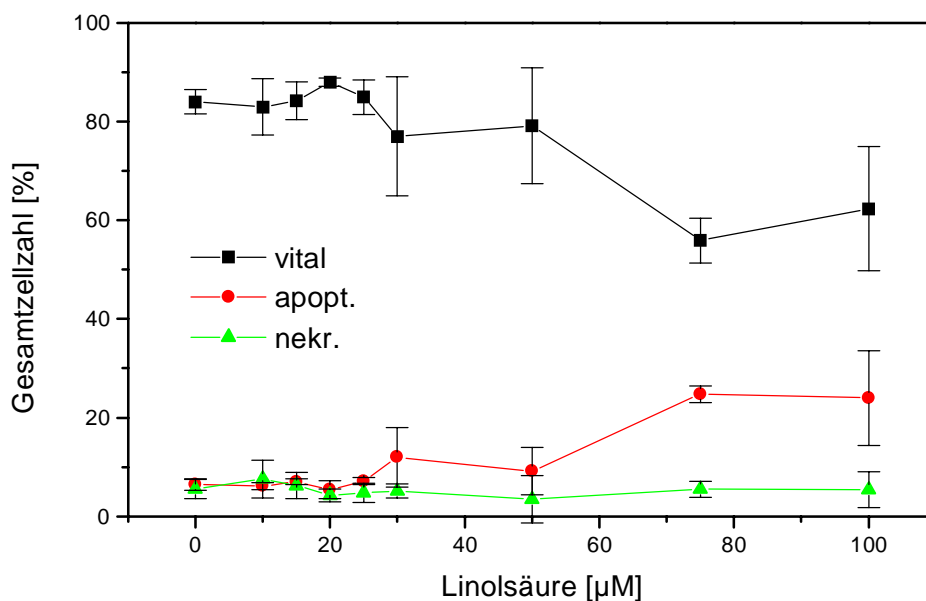


Abb. 35 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Linolsäure-Konz.; n=4

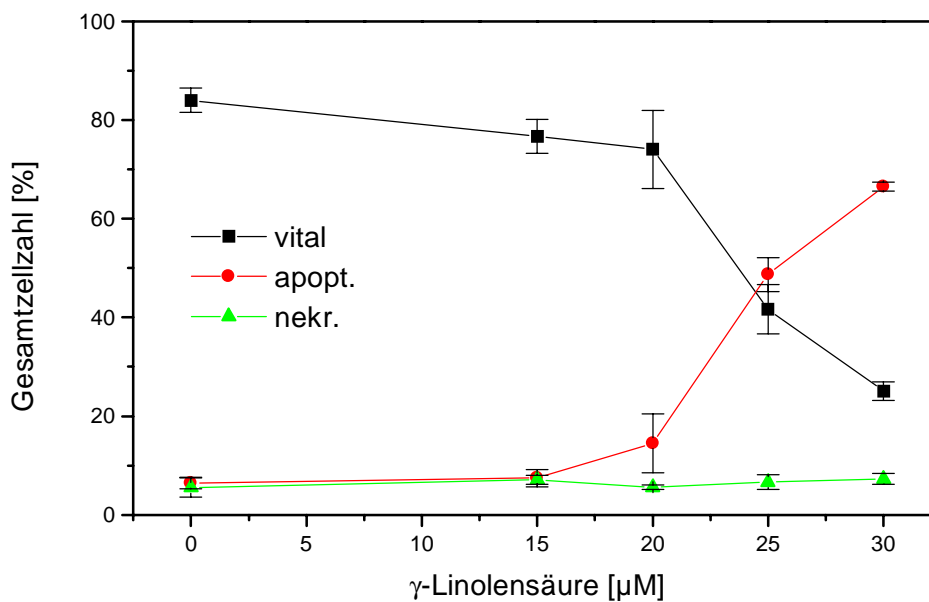


Abb. 36 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der γ-Linolensäure-Konz.; n=4

Vergleichbar mit den Befunden der vorgenannten Fettsäuren läßt sich auch mit zunehmender Arachidonsäure-Konzentration ein steiler Anstieg apoptotischer Zellen nachweisen, allerdings schon bei Konzentrationen von 35 μM bis 40 μM Arachidonsäure (Abb. 37).

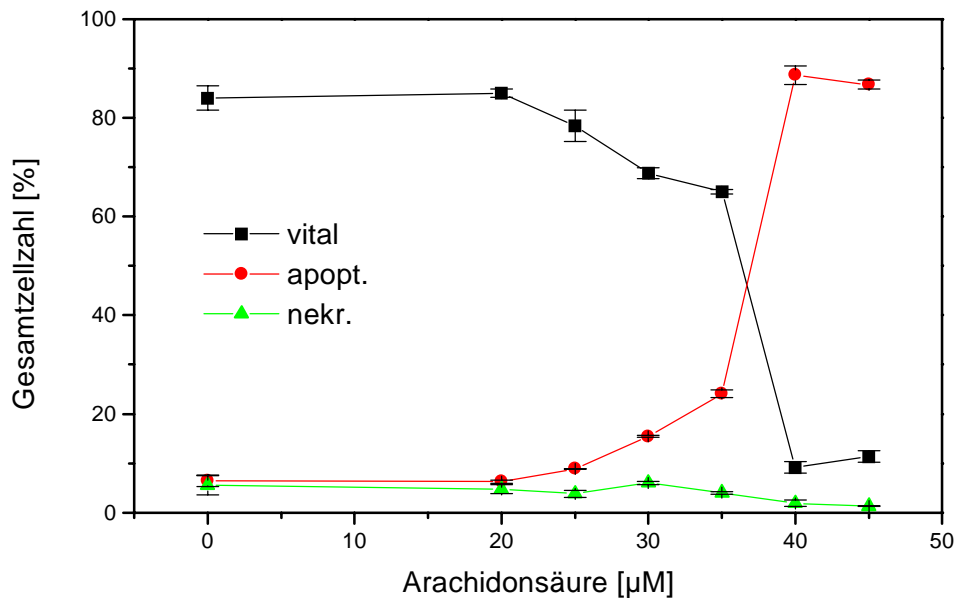


Abb. 37 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Arachidonsäure-Konz.; n=4

Am Beispiel der Reaktion auf Ölsäure kann ein Vergleich der Apoptoseinduktion zwischen nativer Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten vorgenommen werden (vgl. Abb. 34 und Abb. 38). Grundsätzlich verhalten sich beide Zellsysteme gleich. Allerdings ist der Anstieg apoptotischer Zellen bei nativen Keratinozyten bereits bei geringen Ölsäure-Konzentrationen nachweisbar und erreicht mit 45 μM eine maximale Reaktion. Interessanterweise erfolgt bei nativen Keratinozyten im Gegensatz zu HaCaT-Zellen mit dem Anstieg apoptotischer Zellen auch eine Zunahme spätapoptotischer und nekrotischer Zellen.

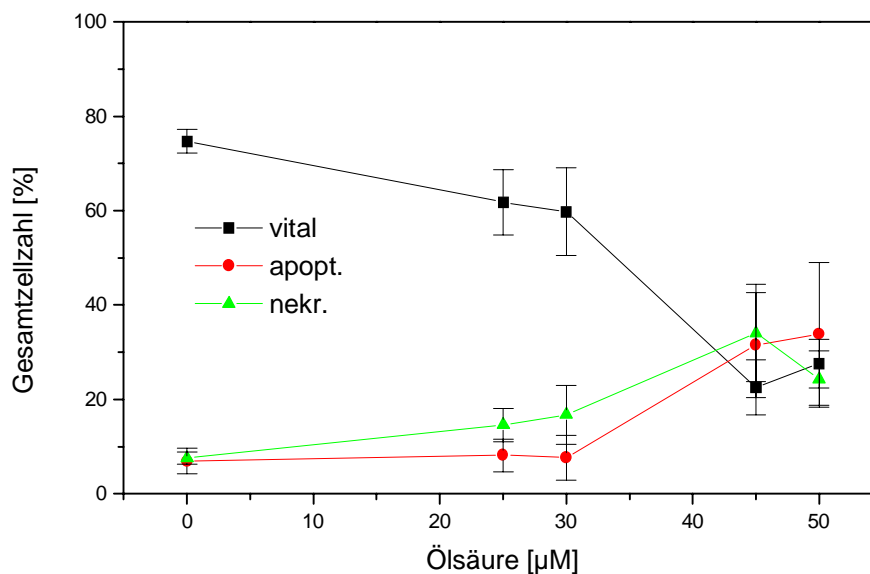


Abb. 38 Induktion der Apoptose
Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer nativer
Keratinocyten nach 24 h als Funktion der Ölsäure-Konz.; n=4

Zeitlicher Ablauf der Apoptose nach Induktion mit freier Fettsäure

Die folgenden Befunde beziehen sich auf Untersuchungen mit 2-stündiger Fettsäureinkubation und Messung der Apoptose direkt nach dieser Einwirkungszeit oder bei erfolgtem Mediumwechsel nach 24 Stunden. Dabei ergab sich, daß bereits nach 2 Stunden Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit γ -Linolensäure Apoptose nachgewiesen werden konnte (Abb. 39), wobei vergleichbare Befunde wie bei 24-stündiger Fettsäure-Einwirkung erhoben werden konnten (Abb. 36). Ein kontinuierlicher Anstieg apoptotischer Zellen ist in dem Bereich von 10 μ M bis 40 μ M γ -Linolensäure zu beobachten. Der Anteil spätapoptotisch-nekrotischer Zellen nahm im gleichen Ausmaß bis zu einer Konzentration von 30 μ M γ -Linolensäure zu.

Wurde nach 2-stündiger Inkubation die Zellkultur mit fettsäurefreiem Medium bis zu 24 Stunden fortgesetzt und dann der Anteil apoptotischer Keratinocyten bestimmt, konnte bereits mit 15 μ M γ -Linolensäure ein Anstieg der apoptotischen Keratinocyten nachgewiesen werden (Abb. 40). Die Rate der spätapoptotisch-nekrotischen Zellen war in etwa gleichbleibend konstant.

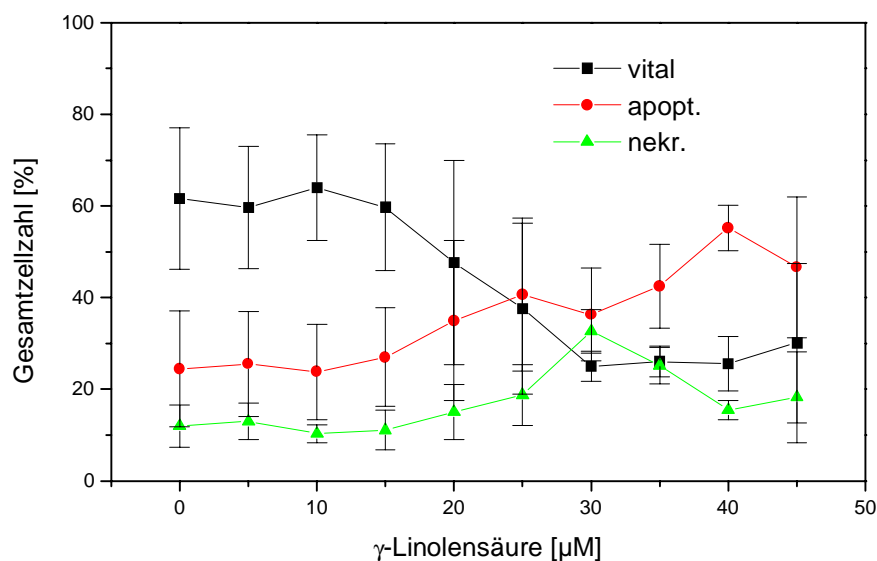


Abb. 39 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 2 h als Funktion der γ -Linolensäure-Konz.; n=6

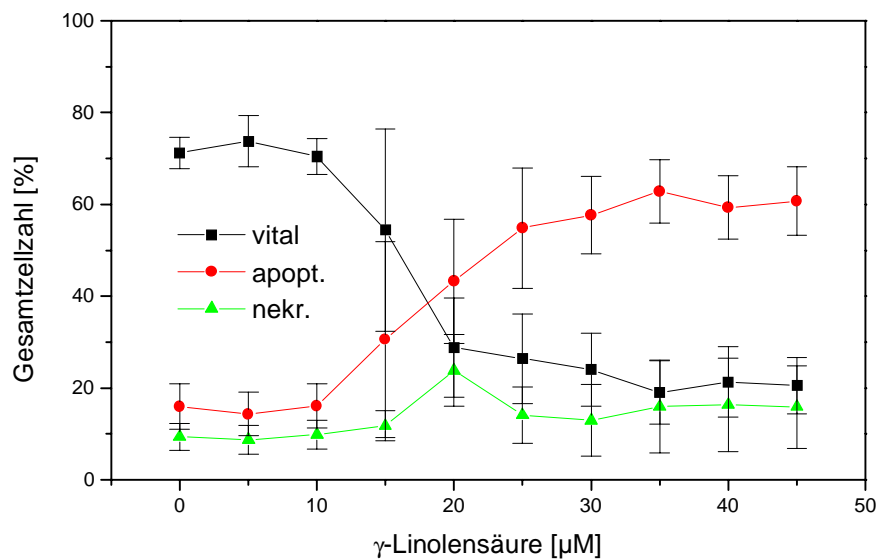


Abb. 40 Induktion der Apoptose

Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der γ -Linolensäure-Konz.; n=6 (Fettsäure-Einwirkzeit 2 h)

Diskussion

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der Einwirkung von freien Fettsäuren auf HaCaT-Zellen gefolgert werden, daß freie Fettsäuren in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Mit steigender Fettsäurekonzentration stieg auch der Anteil apoptotischer Zellen, die deutlich durch ein erhöhtes Annexin-V-FLUOS Signal, aber niedriges PI-Signal, nachzuweisen waren (Abb. 31 bis Abb. 38). Mit steigender Kettenlänge und Zunahme der Doppelbindungen wurde eine Apoptoseinduzierung bei niedrigeren Fettsäurekonzentrationen erreicht. Die Analyse der Ergebnisse lieferte keinen Hinweis auf die Regulation der Apoptoseinduzierung. Denkbar wäre, daß als einziger Vertreter der gesättigten Fettsäuren, die 10-Methyl-Palmitinsäure über den Sphingomyelin-Zyklus die Apoptose induziert. Der Sphingomyelin-Zyklus beinhaltet den ständigen Auf- und Abbau des Sphingomyelins über Ceramide durch das Enzym Sphingomyelinase. Wird die Sphingomyelinase getriggert durch exogene Agonisten, kommt es zu einem Überfluß an Ceramiden, die ihrerseits zur Induktion der Apoptose führen können (Geilen et al., 1997 und Paumen et al., 1997). Die ungesättigten Fettsäuren werden mit hoher Wahrscheinlichkeit über den Weg der Lipidperoxidation den programmierten Zelltod auslösen (Chen et al., 1997, Czech et al., 1997).

Eine Induzierung der Apoptose wurde auch schon bei einer kurzen Einwirkzeit (2 h) von γ -Linolensäure beobachtet (Abb. 39). Wurde die freie Fettsäure durch Mediumwechsel nach 2 Stunden entfernt, erfolgte dennoch keine Reorganisation der Zellen in den originären Zustand. Der eingeleitete Apoptoseprozeß ist demzufolge auch nach dieser verkürzten Fettsäure-Inkubationszeit irreversibel (Abb. 40).

Native Keratinozyten, die dem *in vivo* System menschlicher Epidermis mehr entsprechen als HaCaT-Keratinozyten, zeigten erwartungsgemäß ebenfalls Apoptose (Abb. 38). Allerdings war der spätapoptotische bzw. nekrotische Anteil von vonherein höher als die apoptotischen Zellen, bzw. beide Anteile stiegen parallel an. Die nativen Keratinozyten reagieren viel sensitiver auf die Ölsäure als die HaCaT-Zellen, welches sich in einer viel deutlicheren Abnahme der lebenden Zellen ausdrückt.

Apoptosenachweis mit dem TUNEL-Test

Die Messung der Apoptose durch Translokation von Phosphatidylserin ist eine Methode, die allein auf Membranveränderungen beruht. Im weiteren Ablauf der Apoptose treten auf molekularer Ebene DNA-Fragmente auf, die auf die Wirksamkeit von Endonucleasen (oft Ca^{2+} -, Mg^{2+} - abhängig) zurückzuführen sind (Paus et al., 1995, Darzynkiewicz et al., 1997).

Der Grad und das Ausmaß der DNA-Fragmentierung sind sowohl mit der TUNEL-Methode als auch mit dem Cell Death Detection ELISA nachweisbar.

Der TUNEL-Test beruht auf einer Endmarkierung der DNA-Fragmente mittels fluoreszenzmarkierten dUTP durch die terminale Desoxynucleotidyltransferase. Die gleichzeitige Anwendung der TUNEL-Methode und des Annexin-V-Testes wird häufig zur Charakterisierung der Apoptose eingesetzt (u.a. O'Brien et al., 1997, Eijende et al., 1997). Das typische Zeichen für das Vorliegen apoptotischer Zellen ist eine DNA-Leiter. Der Nachweis dieser Bruchstücke ist mit der Durchflußzytometrie möglich und kann Hinweise auf das Vorliegen und dem Anteil apoptotischer Zellen geben. Als Positivkontrolle beim Nachweis der Apoptose am Durchflußzytometer wurde der Abbau der DNA von HaCaT-Zellen zu DNA-Fragmenten mittels DNase genutzt. Unter den angewandten Bedingungen konnte dabei eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzsignals gemessen werden (Abb. 41).

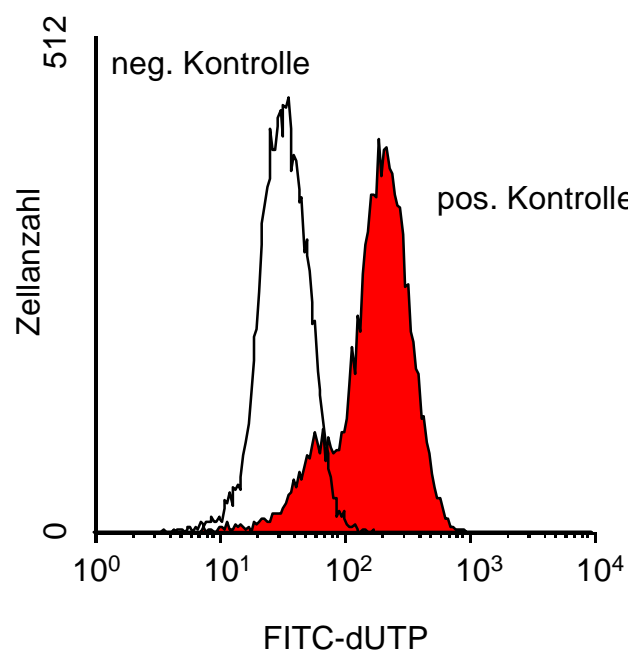


Abb. 41 Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach enzymatischer Behandlung mit DNase (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)

Bei HaCaT-Zellen, die mit Ölsäure behandelt wurden, konnte eine DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden. Bereits eine Konzentration von 15 μM Ölsäure zeigte eine beginnende DNA-Fragmentierung (Abb. 42). Mit steigender Konzentration wurde eine Zunahme der DNA-Fragmentierung erzielt, die bei einer Konzentration von 45 μM Ölsäure hier ein Maximum erreichte (Abb. 43).

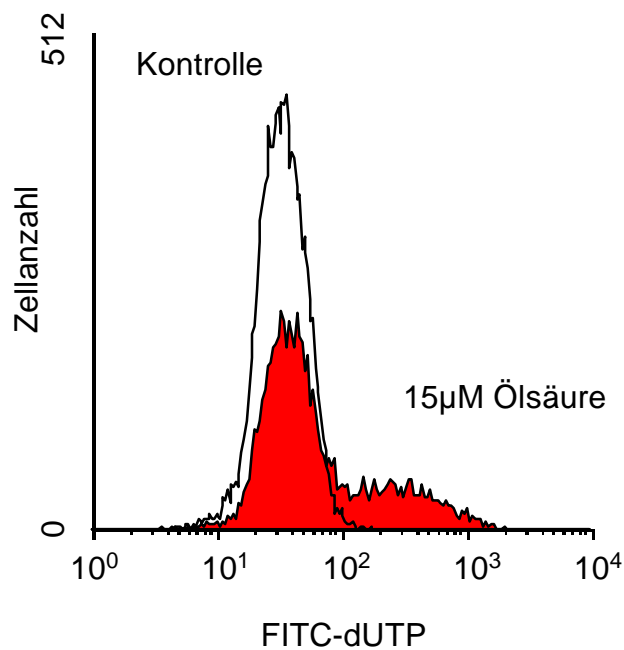


Abb. 42 Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung von 15 µM Ölsäure (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)

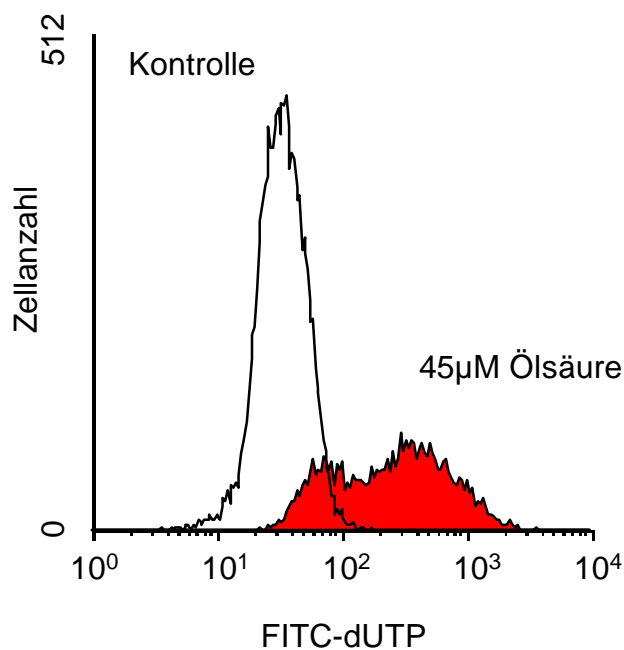


Abb. 43 Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung von 45 µM Ölsäure (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)

Durch den Nachweis einer DNA-Fragmentierung in den Zellen konnte auch mit der TUNEL-Methode die Apoptose-Induktion in humanen Keratinozyten durch Fettsäuren bestätigt werden.

Apoptosenachweis über Histon-assozierte-DNA-Fragmente

Der Cell Death Detection ELISA (Boehringer Mannheim) Test beruht auf dem Nachweis zytoplasmatischer Histon-assoziierter DNA-Fragmente nach induzierter Apoptose.

Für diesen Test wurden die Fettsäure-Konzentrationen eingesetzt, bei denen mit Annexin-V-FLUOS eine minimale bzw. maximale Apoptose-Induktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 44). Zunächst ist festzustellen, daß bei jeder Fettsäure-Inkubation eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Apoptoserate nachweisbar war. Darüber hinaus war durch die Steigerung der Konzentration von 10-Methyl-Palmitin-, Linol- und γ -Linolensäure auch eine signifikant höhere Apoptoserate meßbar. Das trifft für Ölsäure und Arachidonsäure nicht zu. Bei diesen Fettsäuren konnte durch erhöhte Konzentrationen das Apoptosesignal nicht weiter gesteigert werden.

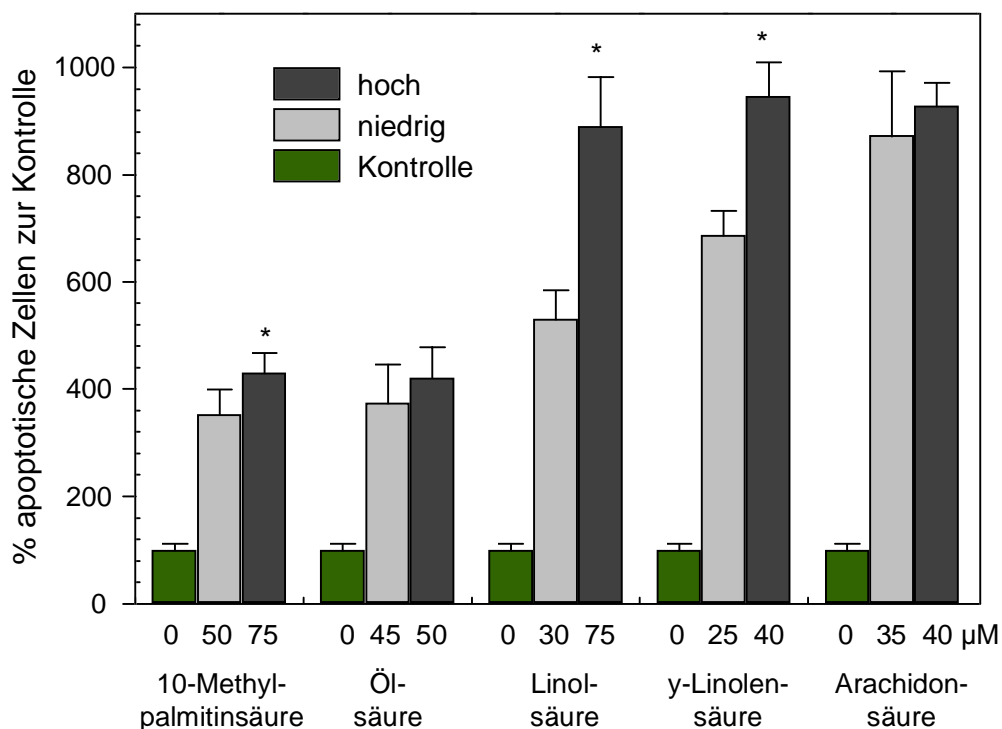


Abb. 44 Vergleich der Apoptoseraten von HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung strukturell unterschiedlicher Fettsäuren (* signifikanter Unterschied im Vergleich zur niedrigeren Konzentration ($p < 0,05$); $n=6$)

Diskussion

Insgesamt ist unter Einfluß von Linol-, γ -Linolen- und Arachidonsäure eine signifikant höhere apoptoseinduzierende Wirkung nachweisbar. Grundsätzlich lag bei diesen Fettsäuren die Apoptoserate über 400 % gegenüber denen der Kontrolle. Allgemein zeigen Fettsäuren mit mehr als einer ungesättigten Bindung stärkere Apoptose als ihre gesättigten Vertreter, wobei die Ölsäure scheinbar eine Mittelrolle einnimmt. Ein Alternativweg zwischen Sphingomyelin-Zyklus-auslösender Apoptose (10-Methyl-Palmitinsäure), Ölsäure und Lipidperoxidation auslösender Apoptose (Linol-, γ -Linolen- und Arachidonsäure) wäre denkbar. Eine Aussage über den Anteil nekrotischer Zellen ist mit diesem Test nicht möglich.

Einfluß von freien Fettsäuren auf die Mobilisierung Apoptose-assoziiierter Proteine

Ein Protein, das am Apoptosegeschehen entscheidend beteiligt sein kann, ist das Tumorsuppressorprotein p53 (Stewart, 1994, Kink und Funk, 1997). Allerdings konnte nicht in allen Formen der Apoptose eine Einbeziehung von p53 nachgewiesen werden. Ist eine Beteiligung gegeben, dann übt p53 einen signifikanten und dosisabhängigen Effekt auf die Initiierung der Apoptose aus, aber nur, wenn die induzierenden Agenzien DNA-Strangbrüche hervorgerufen haben.

Die derzeitige modellhafte Vorstellung zur p53-Funktion in der Apoptose lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- p53 wird durch DNA-Schäden sensibilisiert und arretiert den Zellzyklus in der G1- oder G2-Phase zur DNA-Reparatur.
- Ist die Reparatur nicht erfolgreich, dann wird durch p53 die Apoptose zur Vorbeugung genetischer Defekte im weiteren Generationswechsel der Zellen eingeleitet.
- Es wurde bewiesen, daß p53 direkt in die Apoptose durch Herunterregulierung der bcl-2 Expression und Heraufregulierung der bax Expression eingreifen kann.

Ein Modell der Funktion von p53 als ein Mitinitiator der Apoptose ist in Abb. 45 dargestellt.

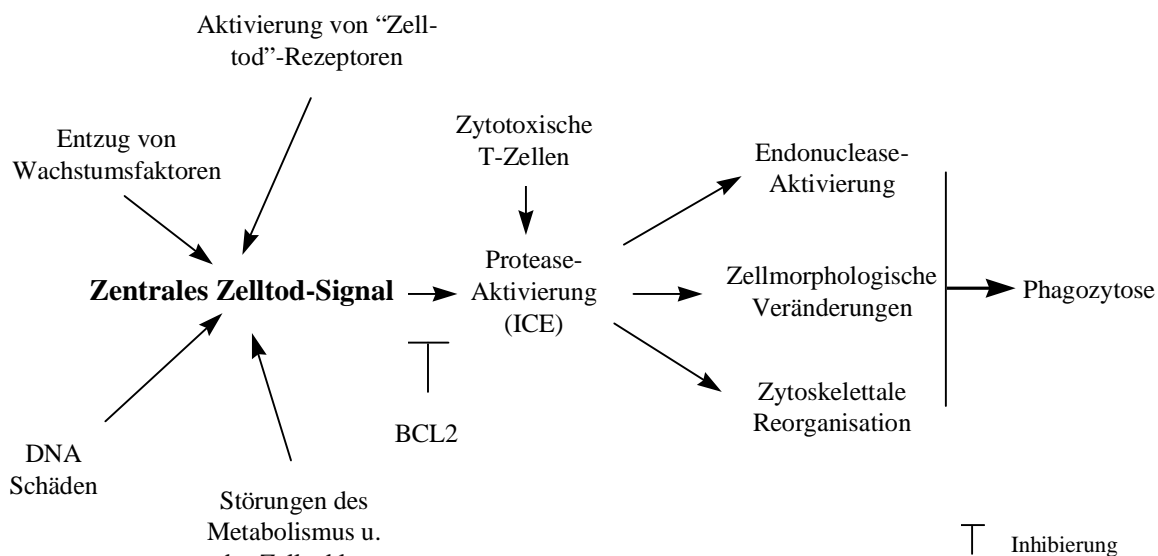


Abb. 45 Ein hypothetisches Modell für die Regulation des apoptotischen Zelltodes
Höhepunkt des apoptotischen Zelltodes ist die Phagozytose der sterbenden Zelle. Die beiden Zelltod-Repressoren BCL-2 und ICE sind Mitglieder einer großen Genfamilie (BCL-2-Familie, ICE Interleukin Converting Enzym-Familie) (Calbiochem-Novabiochem p53 ELISA Kit)

Die ubiquitäre Verbreitung des Tumorsuppressorproteins und dessen hohe Frequenz von Mutationen in humanen Malignomen zeigt, daß p53 wichtige Aufgaben in der Aufrechterhaltung und Kontrolle des normalen Wachstums hat. Viele Publikationen behandeln die Verteilung der Mutationen von p53 in unterschiedlichen Tumoren (u.a. Lübke et al., 1994, Wang et al., 1995, Lehmann et al., 1996) mit dem Ziel, die Gründe der Mutationen zu klären bzw. ihre Auswirkungen auf die Zellen zu charakterisieren. In der Haut erfüllt das Protein p53 wichtige Schutzfunktionen, die einer durch UV-Licht erzeugten Schädigung entgegenwirken sollten (Oram et al., 1994, Rees, 1995, Urano et al., 1995).

Die p53-Bestimmungen an Keratinozyten wurden bisher hauptsächlich nach UV-Bestrahlung durchgeführt (Gniadecki et al., 1997).

Es wurde das mutierte p53 nachgewiesen, welches in HaCaT-Zellen auf beiden Allelen mutiert ist (Boukamp et al., 1995). Die Fettsäure γ -Linolensäure führte mit steigender Konzentration zu einer Abnahme des meßbaren p53-Signals in den HaCaT-Zellen (Abb. 46) nach einer Einwirkzeit von 24 Stunden. Die statistische Auswertung ergab ein signifikantes Ergebnis aller eingesetzten Fettsäurekonzentrationen gegenüber der Kontrolle. Als Signifikanztest wurde „One Way Anova mit dem Student-Newman-Keuls Test“ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ verwendet.

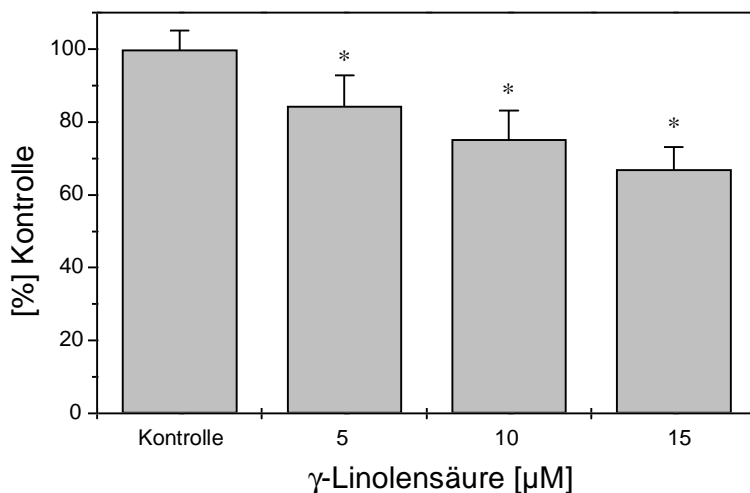


Abb. 46 p53-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=4; Kontrolle mit EtOH; * p < 0.05

Naheliegend war die Frage, ob es einen zeitlichen Einfluß der Fettsäure auf die p53-Expression gibt. Wie aus der Abbildung 47 ersichtlich, kommt es schon nach 3 Stunden Fettsäureeinfluß zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen p53-Abnahme. Die Ergebnisse nach 6 Stunden bzw. 24 Stunden γ -Linolensäureinkubation lassen keine weiteren Änderungen in der p53-Expression von HaCaT-Zellen erkennen.

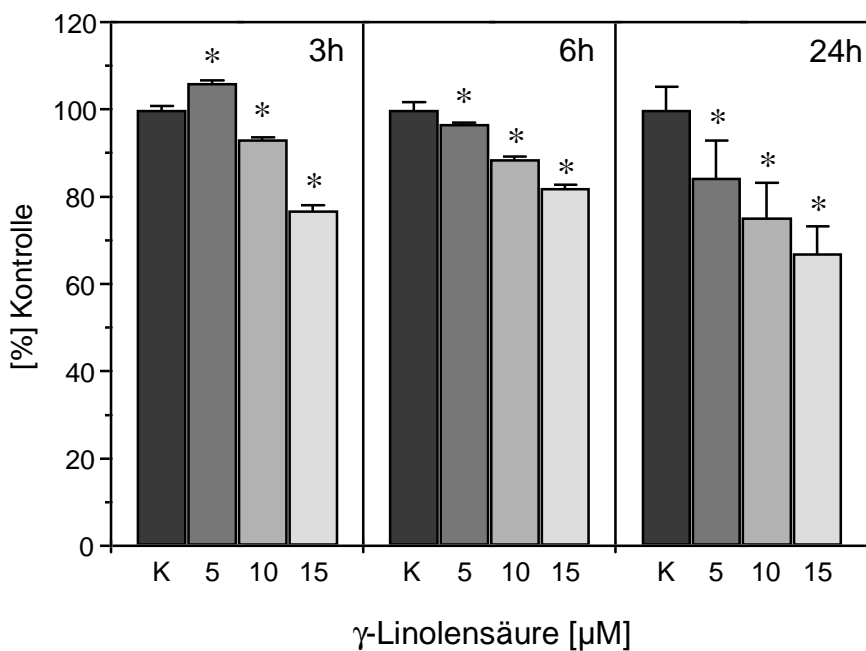


Abb. 47 p53-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration und der Zeit; n=3; Kontrolle mit EtOH; * p < 0.05

Weiterhin wollten wir klären, inwieweit die Fettsäuren einen Einfluß auf die Expression von mutierten p53 in HaCaT-Zellen haben. Eine Erniedrigung von wt-p53 ist durch eine Überexpression von WAF1 (p21) denkbar, aber dieses Protein reagiert, soweit bekannt, nicht mit mt-p53 (Ponten et al., 1995, Vidal et al., 1995). Mutiertes p53 hat außerdem gegenüber wt-p53 eine viel höhere Halbwertszeit (wt-p53 ca. 30 min und mt-p53 > 3 h) und ist auch verstärkt im Zytoplasma nachzuweisen und kann auf eine funktionelle Inaktivität hinweisen (Weinberg, 1991, Saenz-Santamaria et al., 1995). Da die HaCaT-Zellen auf beiden p53-Allelen mutiert sind, kann nicht mehr von einer normalen regulatorischen Funktion ausgegangen werden. Proteine, die mt-p53 binden und damit die scheinbare Expression unterdrücken, sind in der Literatur beschrieben. So konnte Carrier et al. (1996) zeigen, daß das Protein Gadd45 in der Lymphoblasten-Zelllinie (WI-L2-NS) verstärkt mt-p53 bindet. Burkart (1994) erwähnt die Bindung von mt-p53 an das zelluläre Hitzeschockprotein und die weitere Möglichkeit, mit MDM2 Komplexe zu bilden. Auch Meltzer (1994) beschrieb die wichtige Balance zwischen p53 und MDM2 als stabile Kontrolle für die Zellzyklusprogression und Apoptose. Weiterhin wurde von Avita et al. (1994) berichtet, daß die Applikation des Flavonoids Quercetin an menschlichen Brustkrebszellen eine Senkung der mt-p53 Expression hervorruft. Eine Bestätigung einer dieser hier erwähnten regulativen Möglichkeiten steht noch aus. Ob in den HaCaT-Zellen das mutierte p53-Protein in das nachgewiesene Apoptosegeschehen involviert ist, kann nach bisherigen Erkenntnissen noch nicht beantwortet werden. Auf Grund der Expressionsänderung von mt-p53 durch unterschiedliche Fettsäurekonzentrationen könnte von einer Blockierung der de novo Synthese von mt-p53 ausgegangen bzw. die selektive Bindung an eventuell Zellzyklus-assoziierten Proteinen (z.B.: Gadd45, MDM2 und Hitzeschockprotein) diskutiert werden. Weinberg et al. (1995) beschrieb auch eine mögliche Erniedrigung der p53-Expression durch eine eingeleitete Differenzierung von Keratinozyten. Allerdings konnte bei unseren Untersuchungen an HaCaT-Zellen unter Fettsäureeinwirkung keine Änderung der Differenzierungsmarker Involucrin und Filaggrin nachgewiesen werden.

Expriemierung der Proteine bcl-2 und bax in Abhängigkeit zur Fettsäure-konzentration

Das bcl-2 Protein ist in den Membranen des Kerns, des endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien lokalisiert. Eine gesteigerte Expressionsrate bzw. erhöhte Proteinmengen von bcl-2 konnten in zahlreichen Tumoren hämatopoetischer Systeme sowie verschiedener Gewebe wie Lunge, Prostata und Darm nachgewiesen werden (Reed, 1995). Das bcl-2 supprimiert die Induktion des apoptotischen Zelltodes, der durch unterschiedliche Signale und Effektoren ausgelöst wird (z.B. Chemotherapeutika, γ - und UV-Bestrahlung, Hitzeschock, p53, c-myc, TNF, Ca^{2+} , Verlust essentieller Faktoren). Die Deregulierung von

bcl-2 ist also maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt (Collins und White, 1995, Chiarugi und Ruggiero, 1996). Das bcl-2 Protein (26 kd) enthält hoch konservierte Domänen, die mit anderen Proteinen heterodimerisieren können und dadurch auch zur Apoptoseinhibierung führt.

Ein Anstieg des bcl-2 Proteins könnte man als Schutzreaktion der HaCaT-Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch freie Fettsäuren ansehen. Nach Auswertung der durchflußzytometrischen Daten konnte keine Beeinflussung von γ -Linolensäure auf die Expression von bcl-2 nachgewiesen werden (Abb. 48). Bei der Auswertung konnte nur bei der Konzentration von 15 μ M γ -Linolensäure ein signifikanter Unterschied gesichert werden. Als Signifikanztest wurde „One Way Anova on Ranks mit dem Dunn's-Test“ und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ verwendet.

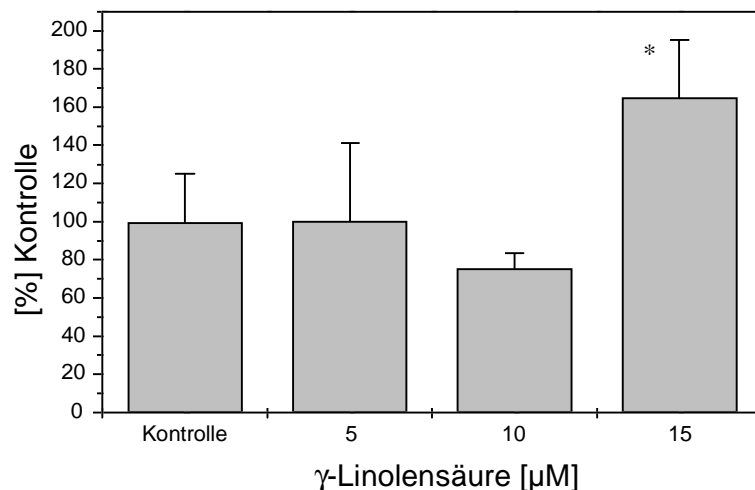


Abb. 48 bcl-2-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=6; Kontrolle mit EtOH; * $p < 0.05$

Als Antagonist zu bcl-2 wurde die Expression des bax-Proteins untersucht. Eine Erhöhung von bax sollte das Apoptoseverhalten maßgeblich mitbestimmen. Die Ergebnisse zum Einfluß von γ -Linolensäure auf die Expression von bax zeigten gegenüber der Kontrolle keine Änderungen (Abb. 49). Es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Als Signifikanztest wurde „One Way Anova on Ranks mit dem Kruskal-Wallis-Test“ verwendet und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

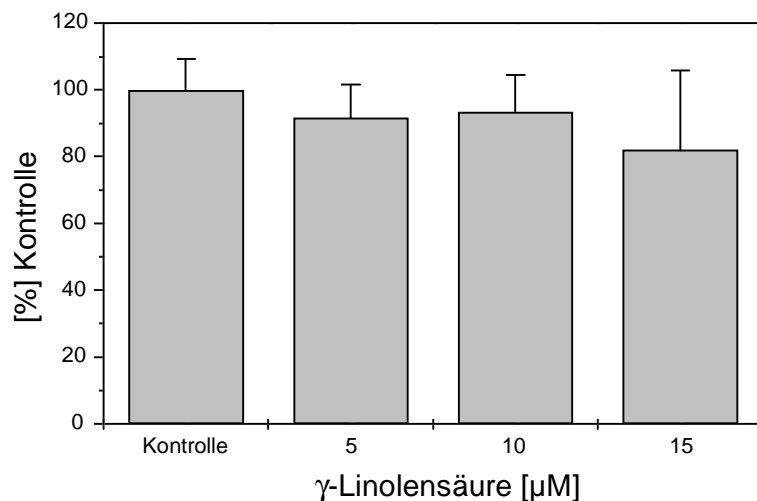
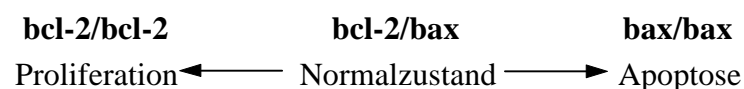


Abb. 49 bax-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=4; Kontrolle mit EtOH

Diskussion

Das bax Protein selbst fördert die Apoptose und unterdrückt die Tumorprogression. Es kann mit bcl-2 Heterodimere bilden und somit Wirkungen von bcl-2 unterdrücken (Stewart, 1994, Rudin und Thompson, 1997). Die Balance dieser Proteine unter normalen Bedingungen kann sowohl in Richtung einer gesteigerten Proliferation als auch einer Apoptoseinduktion verschoben werden.



Sermadiras et al. (1997) untersuchte die Expression von bcl-2 und bax in kultivierten nativen menschlichen Keratinozyten und Melanozyten auf ihre Beziehung zur Differenzierung und Melanogenese. Die Expression von bcl-2 ist in Keratinozyten höher als in Melanozyten, aber ein Fortschreiten der Differenzierung führte zu einer Abnahme von bcl-2 in den Keratinozyten. Eine Veränderung der Expression des bax Proteins konnte nicht festgestellt werden. Mit Cisplatin behandelte Hodenkrebszellen (Linie NT2) zeigten einen frühen Anstieg der bax Expression nach 24 Stunden, nachdem erste Apoptosesignale beobachtet wurden (Boersma et al., 1997).

Nach den Untersuchungen führt die γ -Linolensäure bei HaCaT-Keratinozyten nicht zu einer nachweisbaren Expressionsänderung der Apoptose-assoziierten Proteine bcl-2 und bax.

Der scheinbare Anstieg von bcl-2 (Abb. 48) bei höherer Fettsäurekonzentration ist signifikant gegenüber der Kontrolle. Selbst wenn dieser Anstieg eine tatsächliche Expressionserhöhung von bcl-2 widerspiegeln sollte, so ist der Apoptosemechanismus zu weit fortgeschritten. Das bax-Protein blieb über die gesamte Fettsäurekonzentration

unverändert. Entweder die eingeleitete Apoptose ist bax-Protein unabhängig oder eine Änderung konnte mit den eingesetzten Mitteln nicht nachgewiesen werden.

Western-Blotting von p53- und MDM2-Protein

Neben der Durchflußzytometrie zur Bestimmung bestimmter zellulärer Proteine ist das Verfahren des Western-Blotting eine klassische Protein-Trennmethode. Durchflußzytometrisch konnte das mit p53-Protein bestimmt und eine Abhängigkeit des p53-Signals hinsichtlich der eingesetzten Fettsäurekonzentration gefunden werden. Außerdem wurde darauf hingewiesen, daß eine mögliche Herunterregulierung von mutiertem p53 ursächlich in einer Überexpression von MDM2-Protein in HaCaT-Zellen begründet sein könnte. In Abbildung 50 ist der Nachweis von p53 mittels Western-Blotting dargestellt.

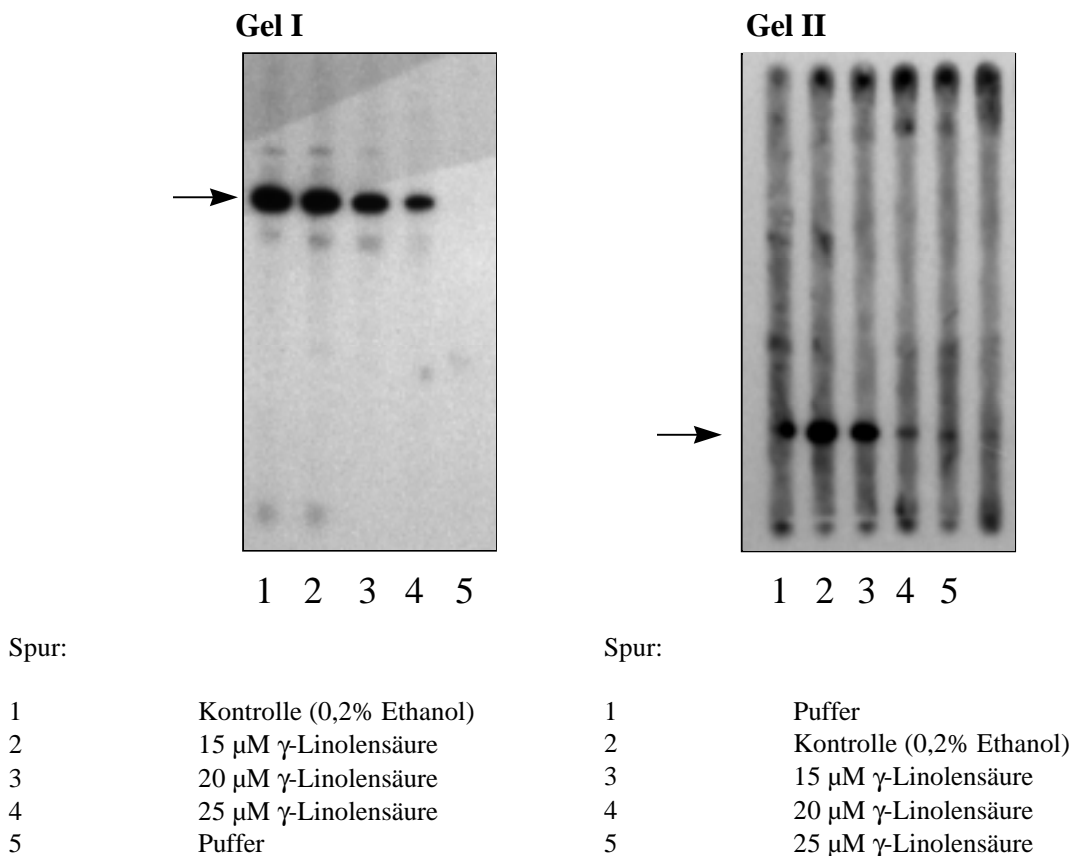


Abb. 50 Gelchromatografischer Nachweis der p53-Expression in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von γ -Linolensäure (Western-Blotting)

Gel I zeigt die deutliche Abnahme der Bandenstärke des p53-Signals mit steigender Fettsäurekonzentration. Im Gel II mit verlängerter Laufzeit konnte die Konzentrationsabhängigkeit des p53-Signals bestätigt werden. Aus der optischen Dichte der Gelbanden ist ein wahrscheinlicher linearer Zusammenhang zwischen der γ -Linolensäurekonzentration und der Abnahme des p53-Signals abzuleiten (Abb. 51).

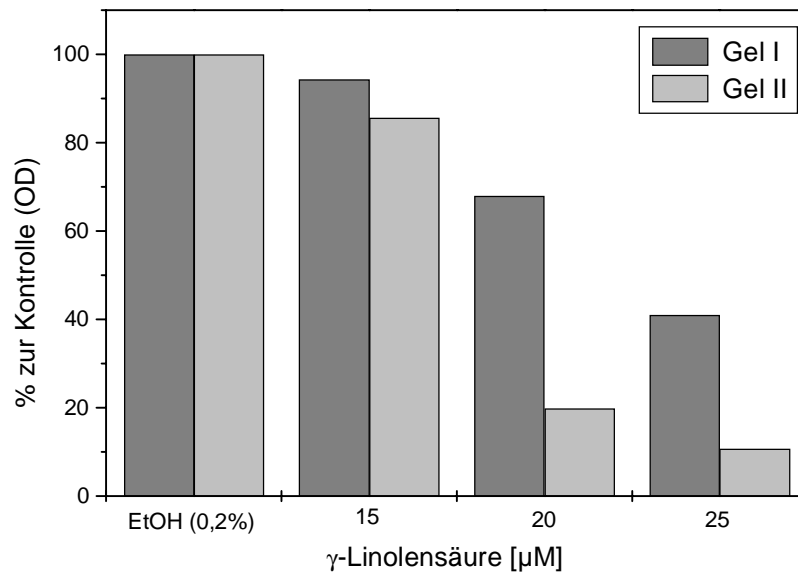


Abb. 51 Optische Dichte des gelchromatografischen Nachweises der p53-Expression

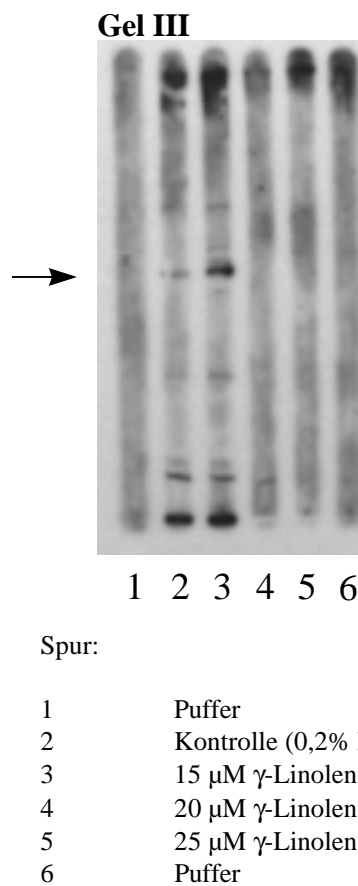


Abb. 52 Gelchromatografischer Nachweis der MDM2-Expression in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von γ -Linolensäure (Western-Blotting)

Außerdem wurde ein gelchromatografischer Nachweis der MDM2-Expression geführt (Abb. 52). Der Pfeil in Abbildung 52 markiert die Stelle der möglichen MDM2-Bande im Gel III. Auf Grund der Zunahme der MDM2-Bande mit steigender Fettsäurekonzentration könnte von einer Expressionserhöhung ausgegangen werden. Als theoretisches Ergebnis kann angenommen werden, daß das mt-p53-Protein vom MDM2-Protein gebunden wird. Die Abnahme der p53-Konzentration kann einerseits durch steigende γ -Linolensäurekonzentrationen hervorgerufen sein; andererseits ist es denkbar, daß eine Erhöhung der MDM2-Expression die Bindung des p53 bewirkt und die Abnahme der p53-Konzentration zur Folge hat. Die Abnahme der scheinbaren p53-Expression durch steigende γ -Linolensäure-Konzentration ist mit einer Expressionserhöhung von MDM2 verbunden. Bestätigende Versuche müssen noch geführt werden.

Die Expressionsänderung von mt-p53 unter Einfluß von γ -Linolensäure konnte mit der Western-Blot-Technik bestätigt werden. Da grundsätzlich immer gleiche Proteinkonzentrationen verwendet wurden, wurde auf einen intrazellulären konstanten Marker, wie z.B. Actin, verzichtet. Auf Grund der besonderen Eigenschaften von Keratinozyten in bezug auf eine mögliche Induzierung der Differenzierung durch freie Fettsäuren kann eine Änderung von Actin als Marker nicht ausgeschlossen werden. Actin ist mit hoher Wahrscheinlichkeit im Differenzierungsprozeß von Keratinozyten (Änderung des Zytoskelettes) beteiligt und unterliegt somit starken strukturellen Wandlungen in der Zelle. So wurde zum Beispiel eine Reorganisation von Actin bei HaCaT-Zellen unter Einfluß von Bradykinin von Coutant et al. (1997) beschrieben.

Da der Nachweis einer eventuellen verstärkten Expression von MDM2-Protein nicht gesichert erscheint, ist die diskutierte MDM2-Beteiligung bei der gefundenen mt-p53-Expressionsänderung noch nicht ausreichend geklärt.

DISKUSSION

Insgesamt gesehen lassen sich aus den vorliegenden Befunden zum Einfluß freier Fettsäuren auf in vitro kultivierte Keratinozyten eine Reihe von Mechanismen ableiten. Wir haben versucht, eine Übersicht zu den möglichen biochemischen Abläufen zusammenzufassen, wobei neben experimentell gesicherten Kenntnissen auch mehr oder weniger hypothetische Ableitungen aufgenommen sind (Abb. 53).

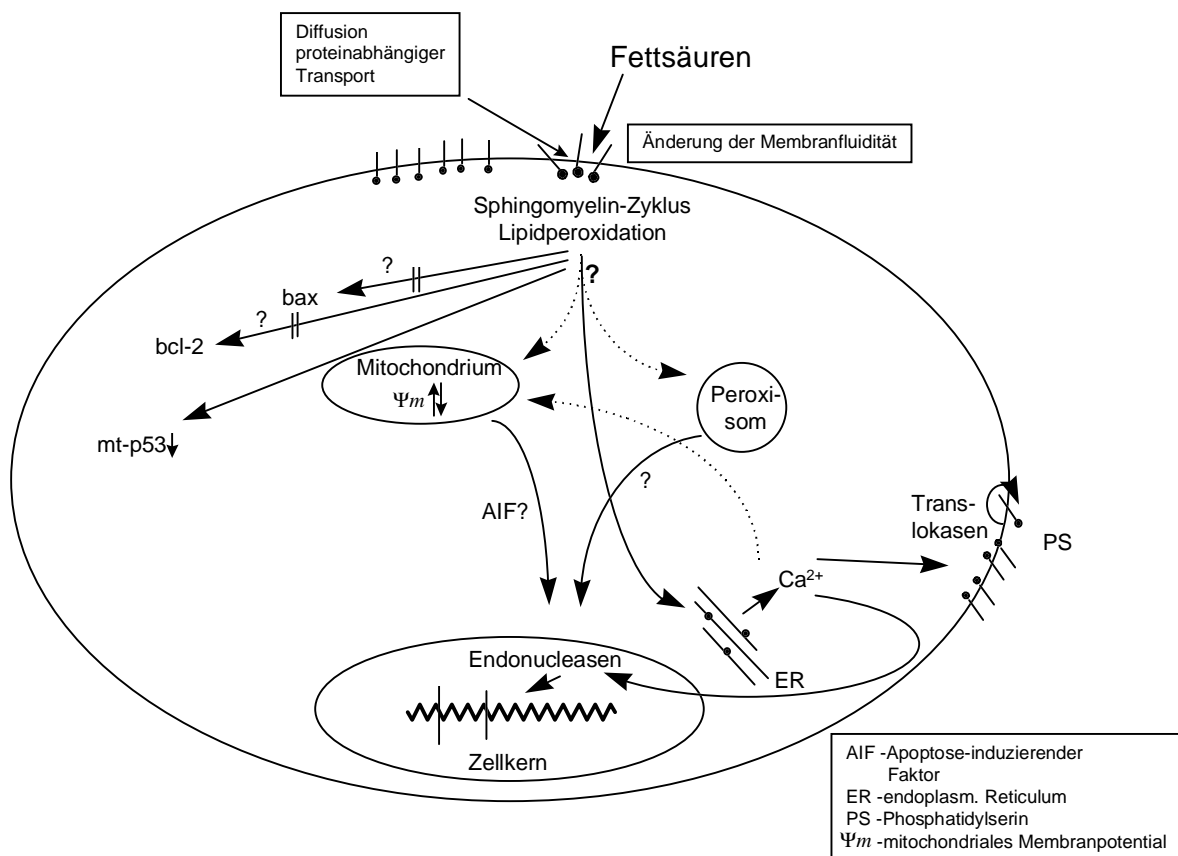


Abb. 53 Schema über mögliche biochemische Reaktionen ausgelöst durch freie Fettsäuren in humanen Keratinozyten (HaCaT)

Zunächst ist festzustellen, daß durch freie Fettsäuren in der Kultur von HaCaT-Zellen weder wachstumsstimulatorische noch zelladhäsionsfördernde Eigenschaften initiiert werden. Freie Fettsäuren induzieren konzentrationsabhängig die Apoptose und in höheren Konzentrationen auch die Nekrose von Keratinozyten.

Vorstellbar ist als erste Reaktion der Zelle auf die freie Fettsäure eine Änderung der Membranfluidität und intrazellulär die Mobilisierung fettsäureabbauender Prozesse in den

Mitochondrien bzw. Peroxisomen (β -Oxidation). Die vermehrte Bildung von Peroxisomen nach Behandlung von Keratinozyten mit Fettsäure läßt auf einen rasch ablaufenden regulatorischen Prozeß schließen. Eine Stimulierung des PPAR α -Rezeptors könnte die Ausbildung von Peroxisomen verursachen. Die Peroxisomen übernehmen dabei neben den Mitochondrien die β -Oxidation der Fettsäuren. Ziel dieser Vorgänge ist, das Überangebot der Fettsäuren auf schnellstmöglichen Weg auf einen intrazellulären Normalzustand zu bringen. Wenn der β -oxidative Abbauprozess für eine Schadensregulierung nicht ausreicht, leiten die Schutzmechanismen der Zelle die Apoptose ein. Es ist denkbar, daß die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen und die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials im gleichen Maße erfolgt. Dabei ist es in diesem Zusammenhang wichtig, ob die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum oder den Mitochondrien erfolgt, wobei das endoplasmatische Reticulum der zum Teil rapiden Freisetzung von intrazellulärem Calcium am ehesten wahrscheinlicher gerecht wird.

Calcium wird durch Stressfaktoren aus dem endoplasmatischen Reticulum freigesetzt und führt zu einem über der Norm liegenden Calciumwert. $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Pumpen befördern das zytosolische Calcium in das Mitochondrium, um die zytosolisch hohe Ca^{2+} -Konzentration zu senken. Hierbei kommt es zu einer mitochondrialen Porenöffnung, in deren Zuge das mitochondriale Membranpotential zusammenbricht (Selbstüberregulierung). In diesem Aufschaukelungsprozeß ist eine zeitweise Potentialerhöhung bis zur endgültigen Porenöffnung der Mitochondrien gegeben (Petronilli et al., 1993; Bernardi, 1996).

Da die Fettsäuren in der Kultur von HaCaT-Zellen keine meßbaren Expressionsänderungen von Involucrin und Filaggrin hervorgerufen haben, ist davon auszugehen, daß der ablaufende Differenzierungsprozeß der Keratinisierung des Keratinozyten nicht direkt beeinflußt wird.

Der gefundene Calciumanstieg könnte über die Stimulierung von Translokasen die Translokation von Phosphatidylserin bewirken. Dies ist einer der ersten zur Zeit bekannten Apoptoseschritte (Bever et al., 1996). Weiterhin könnte die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unspezifische Endonucleasen aktivieren, die die DNA fragmentieren. Eine DNA-Fragmentierung konnte mit zwei unterschiedlichen Meßmethoden nachgewiesen werden.

Möglich wäre auch eine Freisetzung von sogenannten Apoptose-induzierenden Faktoren aus dem Mitochondrium als Antwort auf die mitochondriale Membranpotentialänderung und dem späteren Zusammenbruch dieses Potentials als Einleitung zur Apoptose (Petit et al., 1996; Susin et al., 1997). Die Apoptoserate in den Keratinozyten war einerseits abhängig von der eingesetzten Fettsäurekonzentration und andererseits von der Anzahl der Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Mit steigender Fettsäurekonzentration konnte eine Steigerung der Apoptoserate nachgewiesen werden. Allgemein zeigten die Fettsäuren mit mehr als einer ungesättigten Bindung eine höhere Apoptose als ihre gesättigten Vertreter, wobei die Ölsäure scheinbar eine Mittelrolle einnimmt.

In Abhängigkeit von der Struktur der Seitenkette sind zwei alternative Wege der Apoptoseinduzierung möglich. Geradkettige ungesättigte Fettsäuren induzieren die Apoptose durch die Lipidperoxidation. Dagegen bewirken verzweigtkettige und gesättigte Fettsäuren (10-Methylpalmtinsäure) die Apoptose über den Sphingomyelin-Zyklus, weil eine Lipidperoxidation dabei auszuschließen ist.

Da gleichzeitig keine signifikanten Änderungen in der Expression von Apoptose-assoziierten Proteinen wie bcl-2 und bax nachzuweisen sind, kann man davon ausgehen, daß diese Proteine bei den untersuchten Apoptosevorgängen nicht primär beteiligt sind. Durch die Methode des Western-Blotting ließ sich eine Expressionserhöhung von dem Protein MDM2 nachweisen und die Abnahme des mt-p53-Signals bestätigen. MDM2 besitzt die Möglichkeit, mt-p53 zu binden. Damit könnte die gefundene Signalverringerng von mt-p53 erklärt werden.

Ob die mögliche Erniedrigung der p53-Expression während der ablaufenden Differenzierung von Keratinozyten (Weinberg et al., 1995) von Bedeutung ist, kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl durch Fettsäuren keine Veränderung der Involucrin- und Filaggrinexpression nachgewiesen wurde.

ZUSAMMENFASSUNG

An HaCaT- und nativen Keratinozyten konnte unter in vitro Bedingungen der Einfluß freier Fettsäuren auf den Ablauf und die Regulation verschiedener Prozesse nachgewiesen werden. Die Morphologie der Zellen wird nach Kontakt mit freien Fettsäuren entscheidend verändert. Eine Arretierung in bestimmten Phasen des Zellzyklus unter Fettsäure konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso auch keine Erhöhung der Expression des Zellzyklus-assoziierten Antigens PCNA. Dagegen führte Linolensäure zu deutlichen ultrastrukturellen Veränderungen in der intrazellulären Organellenstruktur, die wahrscheinlich durch eine verstärkte Ausbildung von Peroxisomen gekennzeichnet war.

Hinsichtlich der Einwirkung freier Fettsäuren auf den Differenzierungsablauf humaner Keratinozyten wurden Untersuchungen zur Expressionsänderung von Involucrin und Filaggrin geführt. Ein möglicher Nachweis einer Expressionserhöhung von Involucrin bzw. Filaggrin unter dem Einfluß freier Fettsäuren konnte nicht erbracht werden.

Für einen quantitativen Nachweis der Ca^{2+} -Ionen ist die Ermittlung der minimalen und maximalen Fluoreszenzintensität (F_{\min} , F_{\max}) und die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Ca^{2+} -Konzentrationen (F) notwendig. Mit dem Ionophor A23187 und dem Calcium-Calibration Kit ist die Bestimmung von F , F_{\min} und F_{\max} möglich sowie die daraus resultierende mathematische Herleitung der für dieses System gegebenen Dissoziationskonstanten K_d . Mit diesen Parametern kann eine Eichkurve für Ca^{2+} -Ionen erstellt werden.

Konzentrationen von 500, 5000 μM Linolsäure führten in HaCaT-Zellen zu einem rapiden intrazellulären Calciumanstieg über wenige Minuten. Linolsäure der Konzentrationen 10, 100 μM zeigte einen stetigen Anstieg des Calciumgehalts, gemessen am Durchflußzytometer. Hierbei scheint, daß bei Anwesenheit von extrazellulärem Calcium der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration auf einem höheren Niveau stattfindet. Versuche mit Arachidonsäure (10 μM und 100 μM) am Fluoreszenzreader führten zu den gleichen Aussagen, die mit der Linolsäure am Durchflußzytometer ermittelt wurden. Wesentliche Unterschiede in der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Kettenlänge und -struktur der eingesetzten Fettsäuren konnten nicht nachgewiesen werden.

Fettsäuren führen zu einer konzentrationsabhängigen Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. Sie induzierten eine Erhöhung des MMP über einen Zeitraum von bis zu 2 Stunden.

Die Fettsäuren, 10-Methyl-Palmitin-, Öl-, Linol-, γ -Linolen- und Arachidonsäure, sind in der Lage, die Apoptose in Keratinozyten auszulösen. Mit Hilfe des Annexin-V-FLUOS Kits war die Translokation von Phosphatidylserin, als frühe Phase der Apoptose, nachweisbar. Die Apoptoseinduzierung war abhängig von der Fettsäurekonzentration und von der Anzahl ungesättigter Bindungen in den Fettsäuren. Die eingeleitete Apoptose war nicht reversibel bzw. konnte nicht mit Mediumwechsel (ohne Fettsäure) aufgehalten werden.

Die Bildung von DNA-Fragmenten als Nachweis von Endonuclease-Aktivitäten während der Apoptose konnte mit TUNEL-Technik und Cell Death Detection ELISA geführt werden.

Das Tumorsuppressorprotein p53 liegt in der HaCaT-Zelllinie als mutiertes p53 vor. Es ist auf beiden Allelen mutiert. Wurden Keratinozyten mit γ -Linolensäure behandelt, konnte eine konzentrationsabhängige Herunterregulierung des mt-p53-Signals nachgewiesen werden. Eine Zeitabhängigkeit war dabei nicht zu beobachten. Die Abnahme der mt-p53-Konzentration mit steigender γ -Linolensäurekonzentration in HaCaT-Keratinozyten konnte mittels Western-Blotting bestätigt werden. Eine deutlich verstärkte Expression von MDM2-Protein war nicht nachzuweisen. Die Ursache der mt-p53-Expressionabnahme durch Fettsäure in HaCaT-Zellen konnte nicht geklärt werden.

Die Einwirkung von γ -Linolensäure unterschiedlicher Konzentrationen auf HaCaT-Zellen führte zu keiner nachweisbaren Änderung der Expression der Apoptose-assoziierten Proteine bcl-2 und bax.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1 Aufbau der Haut (schematische Darstellung; modifiziert nach Pfeiffer et al., 1988)	1
Abb. 2 Majorfettsäuren im Stratum corneum (schematische Strukturformeln); 10-Methyl-Palmitinsäure - Minorfettsäure	4
Abb. 3 Präparation der Keratinozyten für die Zellzyklus-Bestimmung am Durchflußzytometer	16
Abb. 4 Präparation zum Nachweis von Proteinen am Durchflußzytometer	20
Abb. 5 Proliferation von humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen) in Abhängigkeit von der Kulturdauer (³ H-Thymidineinbau) n=48	25
Abb. 6 Zellzyklusphasen von HaCaT-Zellen nach Einwirkung mit Linol- und γ-Linolensäure, durchflußzytometrische Bestimmung	26
Abb. 7 Vergleich der PCNA-Expression nach 48 h unter Linolsäureeinfluß; A EtOH 0,2%, B 50 µM Linolsäure	26
Abb. 8 Schematische Darstellung der Phasen des Zellzyklus und korrespondierender charakteristischer Markerproteine (nach Boehringer Mannheim)	28
Abb. 9 unbehandelte HaCaT-Zellen (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	30
Abb. 10 HaCaT-Zellen behandelt mit 50 µM Linolsäure für 2 h (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	31
Abb. 11 HaCaT-Zellen behandelt mit 75 µM Linolsäure für 2 h (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	31
Abb. 12 unbehandelte native Keratinozyten (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	32
Abb. 13 Native Keratinozyten behandelt mit 50 µM Linolsäure für 2 h (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	32
Abb. 14 Native Keratinozyten behandelt mit 75 µM Linolsäure für 2 h (elektronenmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 10000-fach)	33
Abb. 15 Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_d des Ca^{2+} /Fluo-3 Komplexes am Fluoreszenzreader und am Durchflußzytometer	36
Abb. 16 Ca^{2+} -Kalibrierung am Durchflußzytometer und Fluoreszenzreader	37
Abb. 17 Einfluß hoher Linolsäure-Konzentrationen auf die freie Ca^{2+} -Konzentration in HaCaT-Zellen	38

Abb. 18	Einfluß von 10 µM Linolsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung	39
Abb. 19	Einfluß von 100 µM Linolsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung	39
Abb. 20	Einfluß von 10 µM Arachidonsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung; n=16	40
Abb. 21	Einfluß von 100 µM Arachidonsäure auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von der externen Ca^{2+} -Konzentration 2 mM in der Meßlösung; n=16	40
Abb. 22	Schema über „Ein- und Ausschaltmechanismen“ und die Modulation von intrazellulären Calciumspiegeln (nach Calbiochem-Novabiochem, 1996)	41
Abb. 23	Synthese und rezeptorvermittelte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP ₂) (nach Stryer, 1991)	43
Abb. 24	Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials mit R-123 in fettsäurefreier HBSS-Lösung mit 0,2 % Ethanol	44
Abb. 25	Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials in HBSS-Lösung mit 75 µM Linolsäure	45
Abb. 26	Vergleich der Involucrin- und Filaggrinexpression nach 48 h unter Fettsäureeinwirkung auf humane Keratinozyten; A, C EtOH 0,2%; B 10 µM Arachidonsäure; D 25 µM Linolsäure	47
Abb. 27	Schematische Repräsentation von Bereichen der Genexpression wichtiger Proteine in der Epidermis (BL- basal lamina). (modifiziert nach Eckert und Welter, 1996)	48
Abb. 28	Möglichkeiten der Detektion apoptotischer Zellen (modifiziert nach Boehringer Mannheim, 1996)	50
Abb. 29	Schematische Darstellung molekularbiologischer Vorgänge der Translokation von Phosphatidylserin und dessen Nachweis mit Annexin-V (modifiziert nach Calbiochem-Novabiochem, 1997)	51
Abb. 30	Zu erwartende Signalintensitäten bei der Messung der Apoptose mit Annexin-V-FLUOS	52
Abb. 31	Nachweis apoptotischer HaCaT-Zellen mit Annexin-V-FLUOS in fettsäurefreier HBSS-Lösung mit 0,2 % Ethanol	53
Abb. 32	Änderung des Anteils apoptotischer HaCaT-Zellen mit Annexin-V-FLUOS in HBSS-Lösung mit 30 µM Linolsäure	53

Abb. 33	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der 10-Methyl-Palmitinsäure-Konz.; n=4	54
Abb. 34	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Ölsäure-Konz.; n=4	55
Abb. 35	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Linolsäure-Konz.; n=4	56
Abb. 36	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der γ -Linolensäure-Konz.; n=4	56
Abb. 37	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der Arachidonsäure-Konz.; n=4	57
Abb. 38	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer nativer Keratinozyten nach 24 h als Funktion der Ölsäure-Konz.; n=4	58
Abb. 39	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 2 h als Funktion der γ -Linolensäure-Konz.; n=6	59
Abb. 40	Induktion der Apoptose Änderung des Verhältnisses vitaler, nekrotischer und apoptotischer HaCaT-Zellen nach 24 h als Funktion der γ -Linolensäure-Konz.; n=6 (Fettsäure-Einwirkzeit 2 h)	59
Abb. 41	Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach enzymatischer Behandlung mit DNase (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)	61
Abb. 42	Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung von 15 μ M Ölsäure (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)	62
Abb. 43	Nachweis von DNA-Fragmenten in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung von 45 μ M Ölsäure (TUNEL-Technik, Durchflußzytometer)	62
Abb. 44	Vergleich der Apoptoseraten von HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Einwirkung strukturell unterschiedlicher Fettsäuren (* signifikanter Unterschied im Vergleich zur niedrigeren Konzentration ($p < 0,05$); n=6)	63

Abb. 45	Ein hypothetisches Modell für die Regulation des apoptotisches Zelltodes Höhepunkt des apoptotischen Zelltodes ist die Phagozytose der sterbenden Zelle. Die beiden Zelltod-Repressoren BCL-2 und ICE sind Mitglieder einer großen Genfamilie (BCL-2-Familie, ICE Interleukin Converting Enzym-Familie) (Calbiochem-Novabiochem p53 ELISA Kit)	65
Abb. 46	p53-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=4; Kontrolle mit EtOH; * p < 0.05	66
Abb. 47	p53-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration und der Zeit; n=3; Kontrolle mit EtOH; * p < 0.05	66
Abb. 48	bcl-2-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=6; Kontrolle mit EtOH; * p < 0.05	68
Abb. 49	bax-Expression in HaCaT-Zellen als Funktion der γ -Linolensäure-Konzentration; n=4; Kontrolle mit EtOH	69
Abb. 50	Gelchromatografischer Nachweis der p53-Expression in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von γ -Linolensäure (Western-Blotting)	70
Abb. 51	Optische Dichte des gelchromatografischen Nachweises der p53-Expression	71
Abb. 52	Gelchromatografischer Nachweis der MDM2-Expression in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von γ -Linolensäure (Western-Blotting)	72
Abb. 53	Schema über mögliche biochemische Reaktionen ausgelöst durch freie Fettsäuren in humanen Keratinozyten (HaCaT)	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

γ -LA	γ -Linolensäure
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	desintegrations per minute
dUTP	desoxy Uridintriphosphat
et al.	und Mitarbeiter
etc.	et cetera
extr.	extrazellulär
FITC	Fluoreszein-isothiozyanat
Fluo-3/AM	{ 1-[2-Amino-5-(2,7-dichloro-6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid pentaacetoxymethyl ester }
Gadd45	Protein, assoziiert mit der Wachstumssuppression
Gl.	Gleichung
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperatur Keratinocytes
HBSS-Lösung	HEPES buffered salt solution
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
Kap.	Kapitel
Konz.	Konzentration
LA	Linolsäure
LDH	Lactatdehydrogenase
max.	maximal
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
Mill.	Million
MMP	mitochondriales Membranpotential
MP	10-Methyl-Palmitinsäure
mt-p53	mutiertes p53-Protein

n	Anzahl der Meßwerte
OA	Ölsäure
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PI	Propidiumiodid
R-123	Rhodamin-123
RT	Raumtemperatur
SC	Stratum corneum
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek.	sekundär
spez.	spezifisch
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d <u>U</u> TP <u>n</u> ick <u>e</u> nd- <u>l</u> abeling
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WAF1 (p21)	Protein, inhibiert die Kinaseaktivität des multiplen Cdk-Komplexes
wt-p53	Wildtyp p53-Protein

LITERATUR

- [1] ACKERMANN, Th.: *Physikalische Biochemie: Grundlagen der physikalisch-chemischen Analyse biologischer Prozesse* 1. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1992, S. 84-90
- [2] ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WATSON J. D.: *Molekularbiologie der Zelle* 3. Aufl., Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo: VCH, 1995, S. 773-792
- [3] AUNGST, B. J.; BLAKE, J. A.; HUSSAIN, M. A.: Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption and solvent permeation of the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines. In: *Pharm. Res* 7 (1990), S. 712-718
- [4] AVILA, M. A.; VELASCO, J. A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V.: Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. In: *Cancer-Res.* 54 (1994) S. 2424-2428
- [5] BACHE, M., TAUBERT, H., WÜRL, P., FRÖDE, D., DIETZEL, M., SCHMIDT, H., MEYE, A., RATH, F.-W., DRALLE, H., WOHLRAB, W. und DUNST, J.: Radiation induced G2/M block and apoptosis in two human sarcoma cell lines with different p53 gen status. In: *Int Journal Oncol* 11 (1997), S. 993-997
- [6] BERNARDI, P.: The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1275 (1996), S 5-9
- [7] BEVERS, E. M.; COMFURIUS, P.; ZWAAL, R. F. A.: Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. In: *Lupus* (1996), Nr. 5, S. 480-487
- [8] Biochemica Information: Herausgeber: Boehringer Mannheim GmbH Nr. 90 (1993), S. 28

- [9] BOERSMA, A. W. M.; NOOTER, K.; BURGER, H.; KORTLAND, Ch. J.; STOTER, G.: Bax upregulation is an early event in cisplatin-induced apoptosis in human testicular germ-cell tumor cell line NT2, as quantitated by flow cytometry. In: *Cytometry* 27 (1997), S. 275-282
- [10] BONTE, F.; SAUNOIS, A.; PINGUET, P.; MEYBECK, A.: Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. In: *Arch Dermatol Res* 289 (1997), S. 78-82
- [11] BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N. E.: Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. In: *J Cell Biol* 106 (1988), S. 761-771
- [12] BOUKAMP, P.; PETER, W.; PASCHEBERG, U.; ALTMAYER, S.; FASCHING, C.; STANBRIDGE, E. J.; FUSENIG, N. E.: Step-wise progression in human skin carcinogenesis in vitro involves mutational inactivation of p53, rasH oncogene activation and additional chromosome loss. In: *Oncogene*. 11 (1995), S. 961-969
- [13] BOUKAMP, P.; POPP, S.; ALTMAYER, S.; HÜLSEN, A.; FASCHING, C.; CREMER, TH.; FUSENIG, N. E.: Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosomes content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. In: *Genes Chromosom. Cancer* 19 (1997), S. 201-214
- [14] BOYCE, S. T.; HAM, R. G.: Calcium-Regulated Differentiation of Normal Human Epidermal Keratinocytes in Chemically Defined Clonal Culture and Serum-Free Serial Culture. In: *J Invest Dermatol* 81 (1983), Nr. 1, S. 335-405
- [15] BREUSCH, F. L., KAPICIOGLU, K.: Eigenschaften verzweigter Fettsäuren. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 73 (1971), S. 635-639
- [16] BROWN, W. C.; CAMPBELL, J. L.: Interaction of Proliferating Cell Nuclear Antigen with Yeast DNA Polymerase delta. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 29, S. 21706-21710
- [17] BURKART, C.: Das Tumorsupressorprotein p53. In: *Deutsches Ärzteblatt* 91 (1994), Nr. 13, S. 679-685
- [18] BUSLAU, M.; THACI, D.: Atopische Dermatitis: Borretschöl zur systemischen Therapie. In: *Zeitschr. Dermatologie* 182 (1996), S. 131-136

- [19] CARRIER, F.; BAE, I.; SMITH, M. L.; AYERS, D. M.; FORNACE, A. J. Jr.: Characterization of the GADD45 response to ionizing radiation in WI-L2-NS cells, a p53 mutant cell line. In: *Mutat-Res.* 352 (1996), S. 79-86
- [20] CHEN, Q., GALLEANO, M., CEDERBAUM, A. I.: Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 23, S. 14532-14541
- [21] CHIARUGI, V.; RUGGIERO, M.: Role of three cancer "master genes" p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process. In: *Tumori.* 82 (1996), S. 205-209
- [22] COLLINS, K. A.; WHITE, W. L.: Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 Are Differentially Expressed in Early Evolving Malignant Melanoma. In: *Am J Dermatopathol* 17 (1995), Nr. 4, S. 429-438
- [23] COOPER, E. R.: Increased skin permeability for lipid molecules. In: *J. Pharm. Sci.* 73 (1984), S. 1153-1156
- [24] COUTANT, K.D.; CORVAIA, N.; RYDER, N.S.: Bradykinin induces actin reorganization and enhances cell motility in HaCaT keratinocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 237(2) (1997), S. 257-261
- [25] CZECH, W.; BARBISCH, M.; TENSCHER, K.; SCHÖPF, E.; SCHRÖDER, J. -M.; NORGAEUER, J.: Chemotactic 5-Oxo-Eicosatetraenoic Acids Induce Oxygen Radical, Ca²⁺-Mobilization, and Actin Reorganization in Human Eosinophils via a Pertussis Toxin-Sensitive G-Protein. In: *J. Invest Dermatol* 108 (1997), S. 108-112
- [26] DARZYNKIEWICZ, Z.; JUAN, G.; LI, X.; GORCZYCA, W.; MURAKAMI, T.; TRAGANOS, Fr.: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). In: *Cytometry* 27 (1997), S. 1-20
- [27] DERER, W.; SCHULZ, J.; FUSENIG, N. E.; STARK, H.-J.; GEIGES, D., GSCHWENDT, M.: Spontaneous malignant transformation in vitro of the human epidermal keratinocyte line HaCaT. In: *Proceedings zur XXIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung.* (1996), P51. 115
- [28] ECKERT, R. L.; WELTER, J. F.: Epidermal keratinocytes - genes and their regulation. In: *Cell Death Differentiation* 3 (1996), Nr. 10, S. 373-383

- [29] EIJENDE, St. M.; LUIJSTERBURG, A. J. M.; BOSCHART, L.; ZEEUW, Ch. I. DE; DIERENDONCK, J. H.; REUTELINGSPERGER, Ch. P. M.; VERMEIJ-KEERS, Ch.: In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. In: *Cytometry* 29 (1997), S. 313-320
- [30] ELIAS, P. M.: Stratum corneum architecture, metabolic activity and interactivity with subjacent cell layers. In: *Exp Dermatol* (1996), Nr. 5, S. 191-201
- [31] FAIRLEY, J. A.: Calcium and the Skin. In: *Arch Dermatol* 124 (1988), Nr. 3, S. 443-444
- [32] FARTASCH, M.; BASSUKAS, I. D.; DIEPGEN, T. L.: Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. In: *Br J Dermatol* 128 (1993), S. 1-9
- [33] FITSCHER, B. A.; ELSING, C.; RIEDEL, H.-D.; GORSKI, J.; STREMMEL, W.: Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipathic compounds. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 212 (1996), Nr. 1, S. 15-23
- [34] FRITSCH, P.: Aufbau und Funktion der normalen Haut. In: *Dermatologie*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong- Barcelona (1990), S. 3-32
- [35] FRÖDE, D., KLAPPERSTÜCK, Th., WOHLRAB, W.: Induction of cell death in cultured human keratinocytes exposed to fatty acids. In: Proceedings International SFB Symposium „Lipids as Mediators and Regulators of Cell Function“, Jena, 17.9.-19.9.1997, S. 48
- [36] FUNK, J. O.; KIND, P.: Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. In: *Hautarzt* 48 (1997), S. 157-165
- [37] GEILEN, Ch. C.; BEKTAS, M.; WIEDER, Th.; ORFANOS, C. E.: The vitamin D-3 analogue, calcipotriol, induced sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes. In: *FEBS-Letters* 378 (1996), S. 88-92
- [38] GEILEN, Ch. C.; WIEDER, Th.; ORFANOS, C. E.: Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. In: *Arch Dermatol Res* 289 (1997), S. 559-566

- [39] GLANZ, D., FRÖDE, D., KUHN, B., WOHLRAB, W., GLÄBER, D.: Measurement of fatty acid induced changes of intracellular free calcium-concentration in cultured keratinocytes - a comparison of methods. In: *Biol Chem* 377, Spec. Suppl., (1996), S. 194
- [40] GNIADDECKI, R.; HANSEN, M.; WULF, H. Ch.: Two Pathways for Induction of Apoptosis by Ultraviolet Radiation in Cultured Human Keratinocytes. In: *J Invest Dermatol* 109 (1997), S. 163-169
- [41] GOLDEN, G. M.; MCKIE, J. E.; POTTS, R. O.: Role of stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux. In: *J. Pharm. Sci* 76 (1987), S. 25-28
- [42] GORMAN, A. M.; SAMALI, A.; GOWAN, A. J. MC; COTTER, Th. G.: Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. In: *Cytometry* 29 (1997), S. 97-105
- [43] GOVERN, U. B. MC; JONES, K. T.; SHARPE, G. R.: Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. In: *Brit J Dermatol* 132 (1995), S. 892-896
- [44] GRABBE, J.; WELKER, P.; ROSENBAACH, T.; NÜRNBERG, W.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; ARTUC, M.; FIEBIGER, E.; HENZ, B. M.: Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cell. In: *J. Invest Dermatol.* 107 (1996), S. 219-224
- [45] GRAFT, M.; KRAAN, Y. M.; SEGERS, I. M. J.; RADOSEVIC, K.; DEGROOTH, B. G. AND GREVE, J.: Flow cytometric measurement of $[Ca^{2+}]_i$ and pH_i in conjugated natural killer cells and K562 target cells during the cytotoxic process. In: *Cytometry* 14 (1993), S. 257-264
- [46] GRIFFITHS, Ch. E. M.; ROSENTHAL, D. S.; REDDY, A. P.; ELDER, J. T.; ASTROM, A.; LEACH, K.; WANG, T. S.; FINKEL, L. J.; YUSPA, St. H.; VOORHEES, J. J.; FISHER, G. J.: Short-term retinoic acid treatment increases in vivo, but decreases in vitro, epidermal transglutaminase-K enzyme activity and immunoreactivity. In: *J Invest Dermatol* 99 (1992), S. 283-288

- [47] GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y.: A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. In: *J Biol Chem* 260 (1985), Nr. 6, S. 3440-3450
- [48] HANLEY, K.; JIANG, Y.; HE, SH.-SH.; FREIDMAN, M.; ELIAS, P.M. BIKLE, D.D.; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.: Keratinocyte differentiation is stimulated by activators of the nuclear hormone receptor PPAR α . (1997) in press
- [49] HAYAT, M.A.: *Principles and Techniques of Electron Microscopy [Biological Applications Vol. I]* New York-Cincinnati-Toronto-London-Melbourne: Van Nostrand Reinhold Company, 1970. - 70-129544, S. 35-39
- [50] HEDENFALK, I. A.; BALDETORP, B.; BORG, A.; OREDSSON, St. M.: Activated cell cycle checkpoint in epirubicin-treated breast cancer cells studied by BrdUrd-flow cytometry. In: *Cytometry* 29 (1997), S. 321-327
- [51] HENNINGS, H.; MICHAEL, D.; CHENG, Ch.; STEINERT, P.; HOLBROOK, K.; YUSPA, St. H.: Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cells in Culture. In: *Cell* 19 (1980), S. 245-254
- [52] HENNINGS, H.; KRUSZEWSKI, Fr. H.; YUSPA, St. H.; TUCKER, R. W.: Intracellular calcium alterations in response to increased external calcium in normal and neoplastic keratinocytes. In: *Carcinogenesis* 10 (1989), Nr. 4, S. 777-780
- [53] HESS, K. L.; BABCOCK, G. F.; ASKEW, D. S.; COOK-MILLS, J. M.: A novel flow cytometric method for quantifying phagocytosis of apoptotic cells. In: *Cytometry* 27 (1997), S. 145-152
- [54] IMOKAWA, G.; ANASAKI, S.; KAWAMATA, A.; YANO, S.; TAKAISHI, N.: Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramides. In: *J Soc Cosmet Chem* 40 (1989), S. 273-285
- [55] ISHIDA-YAMAMOTO, A.; KARTASOVA, T.; MATSUO, Sh.; KUROKI, T.; IIZUKA, H.: Invulocrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. In: *J Invest Dermatol* 108 (1997), S. 12-16
- [56] JONES, K. T.; SHARPE, G. R.: Intracellular free calcium and growth changes in single human keratinocytes in response to vitamin D and five 20-epi-analogues. In: *Arch Dermatol Res* 286 (1994), S. 123-129

- [57] KELLER, H.; DREYER, C.; MEDIN, J.; MAHFOUDI, A.; OZATO, K.; WAHLI, W.: Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. In: *Proc Natl Acad Sci* 90 (1993), S. 2160-2164
- [58] KOESTER, St. K.; ROTH, P.; MIKULKA, W. R.; SCHLOSSMAN, St. F.; ZHANG, Ch.; BOLTON, W. E.: Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody apo2.7. In: *Cytometry* 29 (1997), S. 306-312
- [59] LEE, S. H.; ELIAS, P. M.; PROKSCH, E.; MENON, G. K.; MAO-QUIANG, M.; FEINGOLD, K. R.: Calcium and Potassium Are Important Regulators of Barrier Homeostasis in Murine Epidermis. In: *J Clin Invest* 89 (1992), Nr. 2, S. 530-538
- [60] LEE, S. H.; ELIAS, P. m.; FEINGOLD, K. R.; MAURO, Th.: A Role for Ions in Barrier Recovery After Acute Perturbation. In: *J Invest Dermatol* 102 (1994), S. 976-979
- [61] LEHMAN, T. A.; MODALI, R.; BOUKAMP, P.; STANEK, J.; BENNETT, W. P.; WELSH, J. A.; METCALF, R. A.; STAMPFER, M. R.; FUSENIG, N.; ROGAN, E. M.: p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines In: *Carcinogenesis*. 14 (1993), S. 833-839
- [62] LEHMANN, J. M.; PERRY, M. B. A.; LAFFIN, J.: Induction of Tetraploid DNA Content by Mutant Simian Virus 40 T Antigen That Has Reduced Complex Formation With p53. In: *Cytometry* 23 (1996), S. 126-130
- [63] LÜBBE, J.; KLEIHUES, P.; BURG, G.: Das Tumorsuppressor-Gen p53 und seine Bedeutung für die Dermatologie. In: *Hautarzt* 45 (1994), S. 741-745
- [64] MACHO, A.; DECAUDIN, D.; CASTEDO, M.; HIRSCH, T.; SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G.: Chloromethyl-X-Rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. In: *Cytometry* 25 (1996), S. 333-340
- [65] MELTZER, P. S.: MDM2 and p53: a Question of Balance. In: *J Natl Cancer Inst* 86 (1994), S. 1286-1296

- [66] MENONO, G.K.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R.: Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. In: *Br J Dermatol* 130 (1994), S. 139-147
- [67] MERRITT, J. E.; CARTHY, S. A. MC; DAVIES, M. P. A.; MOORES, K. E.: Use of fluo-3 measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. In: *Biochem J* 269 (1990), S. 513-519
- [68] MINTA, A.; KAO, J. P. Y.; TSIEN, R.: Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores. In: *J Biol Chem* 264 (1989), S. 8171-8178
- [69] MORGAN, A.; BURGOYNE, R. D.: Stimulation of Ca^{2+} -independent catecholamine secretion from digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells by guanine nucleotide analogues. In: *Biochem J* 269 (1990), S. 521-526
- [70] NEUNER, P.; POURMOJIB, M.; KLOSNER, G.; TREUTINGER, F.; KNOBLER, R.: Increased release of the tumour necrosis factor receptor p75 by immortalized human keratinocytes results from an activated shedding mechanism and is not related to augmented steady-state levels of p75 mRNA. In: *Arch Dermatol Res.* 288 (1996), S. 691-696
- [71] NIAZY, E. M.: Influence of oleic acid and other permeation promoters on transdermal delivery of dihydroeryotamine through rabbit skin. In: *Int. J. Pharm.* 67 (1991), S. 97-100
- [72] NICOLAIDES, N.; APON, J. M. B.: The saturated methyl branched fatty acids of adult human skin surface lipid. In: *Biomed. Mass Spectrometry* 4 (1977), S. 337-347
- [73] NOLL, M.; ESCHBORN: Apoptose: Mord und Selbstmord im menschlichen Organismus. In: *Pharmazeutische Zeitung* 142 (1997), Nr. 23, S. 11-17 (1885-1891)
- [74] NUHN, P.; GUTHEIL, M.; DOBNER, B.: Vorkommen, Biosynthese und biologische Bedeutung verzweigter Fettsäuren. In: *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 87 (1985), S. 135-140

- [75] O'BRIEN, I. E. W.; REUTELINGSPERGER, Ch. P. M.; HOLDAWAY, K. M.: Annexin-V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. In: *Cytometry* 29 (1997), S. 28-33
- [76] ORAM, Y.; ORENGO, I.; BAER, S. C.; OCAL, T.: p53 Protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. In: *J Am Acad Dermatol* 31 (1994), S. 417-422
- [77] ORMEROD, M. G.: Flow Cytometry „A Practical Approach“ 2. Aufl., Oxford-New York-Tokyo: Oxford University Press Inc., 1994
- [78] PANDE, G.; KUMAR, N. A.; MANOGARAN, P.S.: Flow Cytometric Study of Changes in the Intracellular Free Calcium During the Cell Cycle. In: *Cytometry* 24 (1996), S. 55-63
- [79] PARMIO, J. M.; JORCANO, J. L.: Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. In: *Brit J Dermatol* 137 (1997), S. 44-50
- [80] PAUMEN, M. B.; ISHIDA, Y.; MURAMATSU, M.; YAMAMOTO, M.; HONJO, T.: Inhibition of carnitine palmitoyltransferase i augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 6, S. 3324-3329
- [81] PAUS, R.; MENRAD, A.; CZARNETZKI, B. M.: Nekrobiologie der Haut: Apoptose. In: *Hautarzt* 46 (1995), S. 285-303
- [82] PELLICCIARI, C.; MANGIAROTTI, R.; BOTTONE, M.G.; DANOVA, M.; WANG, E.: Identification of Resting Cells by Dual-Parameter Flow Cytometry of Statin Expression and DNA Content. In: *Cytometry* 21 (1995), S. 329-337
- [83] PETIT, P. X.; SUSIN, S.-A.; ZAMZAMI, N.; MIGNOTTE, B.; KROEMER, G.: Mitochondria and programmed cell death: back to the future. In: *FEBS Letters* 396 (1996), S. 7-13
- [84] PETRONILLI, V.; COLA, C.; MASSARI, St.; COLONNA, R.; BERNARDI, P.: Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin a-sensitive permeability transition pore of mitochondria. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nr. 29, S. 21939-21945

- [85] PFEIFFER, S., PFLEGEL, P., BORCHERT, H.-H. Grundlagen der Biopharmazie. Verlag Volk und Gesundheit Berlin: (1988), S. 71-76
- [86] PONTEN, F.; BERNE, B.; REN, Zh.-Ping; NISTER, M.; PONTEN, J.: Ultraviolet light Induces of p53 and p21 in Human Skin: Effect of Sunscreen and Constitutive p21 Expression in Skin Appendages. In: *J Invest Dermatol* 105 (1995), S. 402-406
- [87] POOT, M.; GIBSON, L.; SINGER, . L.: Detection of Apoptosis in Live Cells by MitoTracker Red CMXRos and SYTO Dye Flow Cytometry. In: *Cytometry* 27 (1997), S. 358-364
- [88] POU MAY, Y.; PITTELKOW, M. R.: Cell Density and Culture Factors Regulate Keratinocyte Commitment to Differentiation and Expression of Suprabasal K1/K10 Keratins. In: *J Invest Dermatol* 104 (1995), S. 271-276
- [89] RADBRUCH, A.: Flow Cytometry and Cell Sorting, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 1992.-3-540-55594-3
- [90] RAMSELL, K. D.: Nitric oxide induce morphological changes in cultured neurohypophysial astrocytes. In: *J Neuroendocrinol* 8 (1996), S. 235-240
- [91] RANDRIAMAMPITA, C.; TSIEN, R. Y.: Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. In: *Natur* 364 (1993), Nr. 26, S. 809-814
- [92] RASKIN, C. A.: Apoptosis and cutaneous biology. In: *J Am Acad Dermatol* 36 (1997), Nr. 1, S. 885-896
- [93] RATMAN, A. V.; BIKLE, D. D.; SU, M. J.; PILLAI, S.: Squamous Carcinoma Cell Lines Fail to Respond to 1.25-Dihydroxyvitamin D Despite Normal Levels of the Vitamin D Receptor. In: *J Invest Dermatol* 106 (1996), S. 522-525
- [94] REED, J.C.: Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. In: *Curr Opin Oncol.* 7 (1995), S. 541-546
- [95] REES, J. L.: p53 and the Origins of Skin Cancer. In: *J Invest Dermatol* (1995), S. 883-884

- [96] RUDIN, Ch. M.; THOMPSON, C. B.: APOPTOSIS AND DISEASE: Regulation and Clinical Relevance of Programmed Cell Death. In: *Annu Rev Med* 48 (1997), S. 267-281
- [97] SACHS, L.: *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden* 7. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York Springer-Verlag, 1992
- [98] SAENZ-SANTAMARIA, M. C.; NUTT, N. S. MC; BOGDANY, J. K.; SHEA, Ch. R.: p53 Expression Is Rare in Cutaneous Melanomas. In: *Am J Dermatopathol* 17 (1995), Nr. 4, S. 344-349
- [99] SAWTELL, R. M.; REW, D. A.; STRADLING, R. N.; WILSON, G. D.: Pan Cycle Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in Human Colorectal Cancer and its Proliferative Correlations. In: *Cytometry* 22 (1995), S. 190-199
- [100] SCHMITZ, G.; ROTHE, G.: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*, Stuttgart-New York: Schattauer, 1994.-3-7945-1578-1
- [101] SCHNEIDER, I.-M.; WOHLRAB, W.; NEUBERT, R.: Fettsäuren und Epidermis. In: *Hautarzt* 48 (1997), S. 303-310
- [102] SCHNEIDER, I.-M.: *Untersuchungen zum Einfluß von Glycolipiden und Fettsäuren auf den Wirkstofftransport in humane Haut und auf das Proliferationsverhalten von humanen Keratinozyten* Dissertation A. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Pharmazie), 1997
- [103] SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J.: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. In: *J Lipid Res* 37 (1996), S. 907-925
- [104] SCHÜRER, N. Y.; MONGER, M. D. D. J.; HINCENBERGS, M.; WILLIAMS, M. L.: Fatty Acid Metabolism in Human Keratinocytes Cultivated at an Air-Medium Interface. In: *Dermatol* 92 (1989), S. 196-202
- [105] SCHÜRER, N.; KÖHNE, A.; SCHLIEP, V.; BARLAG, K.; GOERZ, G.: Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. In: *Exp. Dermatol* (1993), Nr. 2, S. 179-185

- [106] SCHÜRER, N. Y.; STREMMEL, W.; GRUNDMANN, J.-U.; SCHLIEP, V.; KLEINERT, H.; BASS, Nathan M.; WILLIAMS, M. L.: 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. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1211 (1994), S. 51-60
- [107] SCHWARZ, A., BHADWAJ, R., ARAGANE, Y., MAHNKE, K., RIEMANN, H. METZE, D., LUGER, TH. A. and SCHWARZ, TH.: Ultraviolet-B-Induced apoptosis of keratinocytes: Evidence for partial involvement of tumor necrosis factor- α in the formation of sunburn cells. In: *J. Invest Dermatol* 104 (1995), S. 922-927
- [108] SHINOMIYA, N.; TAKEMURA, T.; ROKUTANDA, K. Iwamoto and M.: Caffeine Induces S-Phase Apoptosis in Cis-Diamminedichloroplatinum-Treated Cells, Whereas cis-Diamminedichloroplatinum Induces a Block in G2/M. In: *Cytometry* 27 (1997), S. 365-373
- [109] SHORT, A. D.; BIAN, J.; GHOSH, T. K.; WALDRON, R. T.; RYBAK, S. L.; GILL, D. L.: Intracellular Ca^{2+} pool content is linked to control of cell growth. In: *Proc Natl Acad Sci* 90 (1993), S. 4986-4990
- [110] SIEGENTHALER, G.; HOTZ, R.; CHATELLARD-GRUAZ, D.; DIDERJEAN, L.; HELLMANN, U.; SAURAT, J.-H.: Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro. In: *Biochem J* 302 (1994), S. 363-371
- [111] SINGH, J. K.; DASGUPTA, A.; ADAYEV, T.; SHAHMEHDI, S. A.; HAMMOND, D.; BANERJEE, P.: Apoptosis is associated with an increase in saturated fatty acid containing phospholipids in the neuronal cell line, HN2-5. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1304 (1996), S. 171-178
- [112] STECK, K.; EL-NAGGAR, A. K.: Comparative Flow Cytometric Analysis of Ki-67 and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Solid Neoplasms. In: *Cytometry* 17 (1994), S. 258-265
- [113] STEWART, B. W.: Mechanisms of Apoptosis: Integration of Genetic, Biochemical and Cellular Indicators. In: *J Natl Cancer Inst.* 86 (1994), Nr. 17, S. 1286-1295
- [114] STRYER, L.: *Biochemie* neubearb. Aufl., Heidelberg-Berlin-New York, Spektrum akademischer Verlag, 1991, S. 1021-1024

- [115] SUREDA, Fr. X.; ESCUBEDO, E.; GABRIEL, C.; COMAS, J.; CAMARASA, J.; CAMINS, A.: Mitochondrial Membrane Potential Measurement in Rat Cerebellar Neurons by Flow Cytometry. In: *Cytometry* 28 (1997), S. 74-80
- [116] SUSIN, S.-A.; ZAMZANI, N.; CASTEDO, M.; DAUGAS, E.; WANG, H.-G.; GELEY, S.; FASSY, F.; REED, J.-C.; KROEMER, G.: The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondrial in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. In: *J Exp Med* 186(1) (1997), S. 25-37
- [117] TAKANO, E.; HATANAKA, M.; MAKI, M.: Real-time analysis of the calcium-dependent interaction between calmodulin and a synthetic oligopeptide of calcineurin by a surface plasmon resonance biosensor. In: *FEBS Letters* 352 (1994), S. 247-250
- [118] THIELE, B.: Einfluß von extrazellulärem Calcium auf die Anheftung von Keratinozyten in vitro. In: *Derm* (1995), Nr. 1, S. 85-87
- [119] TRAVALI, S.; KU, De-Hui; RIZZO, M. G.; OTTAVIO, L.; BASERGA, R.; CALABRETTA, B.: Structure of the Human Gene for the Proliferating Cell Nuclear Antigen. In: *J Biol Chem* 264 (1989), Nr. 13, S. 7466-7472
- [120] URANO, Y.; ASANO, T.; YOSHIMOTO, K.; IWAHANA, H.; KUBO, Y.; KATO, Sh.; SASAKI, Sh.; TAKEUCHI, N.; UCHIDA, N.; NAKANISHI, H.; ARASE, S.; ITAKURA, M.: Frequent p53 Accumulation in the Chronically Sun-Exposed Epidermis and Clonal Expansion of p53 Mutant Cells in the Epidermis Adjacent to Basal Cell Carcinoma. In: *J Invest Dermatol* 104 (1995), S. 928-932
- [121] VIDAL, M. J.; LOGANZO, F.; OLIVEIRA, A. R. DE; HAYWARD, N. K.; ALBINO, A. P.: Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas. In: *Melanoma Res* (1995), Nr. 5, S. 243-250
- [122] WEBER, E.: *Grundriß der Biologischen Statistik. Anwendungen der mathematischen Statistik in Forschung, Lehre und Praxis* Gustav Fischer Verlag, 1980
- [123] WEINBERG, R. A.: Tumor Suppressor Genes. In: *Science* 254 (1991), S. 1138-1146

- [124] WEINBERG, W. C.; AZZOLI, CH. G.; CHAPMAN, K.; LEVINE, A. J.; YUSPA, ST. H.: p53-mediated transcriptional activity increases in differentiating epidermal keratinocytes in association with decreased p53 protein. In: *Oncogene* 10 (1995), S. 2271-2279
- [125] Wissenschaftliche Begleitinformation zum Calcium Calibration Buffer Kit, (1995) der Firma Molecular Probes, INC.
- [126] Wissenschaftliche Begleitinformation zum Cell Death Detection ELISA der Firma Boehringer Mannheim GmbH
- [127] Wissenschaftliche Begleitinformation zum Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Boehringer Mannheim GmbH
- [128] Wissenschaftliche Begleitinformation zum In Situ Cell Death Detection Kit der Firma Boehringer Mannheim GmbH
- [129] Wissenschaftliche Begleitinformation zum Protein Assay Kit P5656 der Firma SIGMA Diagnostics
- [130] Wissenschaftliche Begleitinformation zur Keratinozytengewinnung aus neonatalem Vorhautgewebe der Firma GIBCO BRL Life Technologies
- [131] XIA, F.; WANG, X.; WANG, Y.-H.; TSANG, N.-M.; YANDELL, D. W.; KELSEY, K. T.; LIBER, H. L.: Altered p53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. In: *Cancer Res* 55 (1995), Nr. 1, S. 12-15
- [132] YU, K.; BAYONA, W.; KALLEN, C.B.; HARDING, H.P.; RAVERA, C.P.; MCMAHON, G.; BROWN, M.; LAZAR, M.A.: Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. In: *J Biol Chem* 270 (1995), S. 23975-23983
- [133] ZAKIM, D.: Fatty acids enter cells by simple diffusion. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 212 (1996), Nr. 1, S. 5-14

Angaben zur Person

Dirk Fröde

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum 16.06.1968

Geburtsort Dresden

AUSBILDUNG

1987 Allgemeine Hochschulreife in Köthen

1987 - 1989 Grundwehrdienst

1990 - 1995 Studium der Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/1995 Diplom
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1995 - 1998 Mitglied im Graduiertenkolleg (Doktorand)
„Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

BERUFSERFAHRUNG

1987 Praktikant an der Technischen Hochschule Köthen

1989-1990 Technischer Mitarbeiter
Technische Hochschule Köthen

03/1998- wissenschaftlicher Mitarbeiter
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg