

**Beiträge zur Aufklärung des antimetastatischen
Wirkmechanismus von aliphatischen
Lysophosphatidylcholin-Derivaten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thomas Michael Ross

aus

Köln

Bonn 2018

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Massing

Tag der Promotion: 05.06.2018

Erscheinungsjahr: 2018

„Hinterher weiß man immer mehr.“

Die Fantastischen Vier – Sie ist weg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
2. Theorie.....	4
2.1. Lipidstoffwechsel.....	4
2.2. Lysolipide.....	10
2.3. Metastasierung.....	13
2.4. Migration.....	18
2.5. Integrine.....	23
2.6. Syndecane.....	26
2.7. Proteinkinase C.....	27
2.8. Fokale Adhäsionskinase.....	29
2.9. Aktuelle Ansätze der Therapie von Metastasen.....	30
2.10. Ziel dieser Arbeit.....	35
3. Material und Methoden.....	36
3.1. Material.....	36
3.1.1. Chemische und biologische Arbeitsstoffe.....	36
3.1.2. Primäre Antikörper.....	38
3.1.3. Sekundäre Antikörper.....	39
3.1.4. Lysolipide.....	39
3.1.5. Fluoreszenz markierte Lipide.....	40
3.1.6. Lösungen und Puffer.....	41
3.1.7. Verbrauchsmaterialien.....	45
3.1.8. Geräte.....	47
3.2. Methoden.....	51

3.2.1.	Zelllinien und Zellkultur	51
3.2.2.	MTT-Assay.....	55
3.2.3.	Zelladhäsion.....	56
3.2.4.	Zweidimensionale Zellmigration	56
3.2.5.	Inmunofluoreszenz basierte Techniken	58
3.2.6.	FRAP.....	64
3.2.7.	Membranfluiditätsmessungen mittels Fluoreszenz Anisotropie	67
3.2.8.	Proteinanalytik.....	70
3.2.9.	Dynamische Massenumverteilung	72
3.2.10.	Statistische Auswertung	74
4.	Ergebnisse und Diskussion.....	75
4.1.	Toxizität von LysoPC und Bindung an BSA.....	75
4.1.1.	Murines Zellsystem B16.F10.....	75
4.1.2.	Humanes Zellsystem MV3	80
4.1.3.	Zusammenfassung Viabilität	85
4.2.	Zweidimensionale Wundheilung.....	87
4.2.1.	B16.F10	87
4.2.2.	MV3.....	89
4.2.3.	Zusammenfassung Migration	90
4.3.	Membranfluidität	91
4.3.1.	Fluoreszenzanisotropie.....	92
4.3.2.	AFM.....	93
4.3.3.	Fluoreszenzwiederherstellung nach Photobleichen (FRAP).....	98
4.3.4.	Zusammenfassung Membranfluidität	102
4.4.	GPCR-Effekte.....	104
4.4.1.	Dynamische Massenumverteilung	106

4.4.2.	Expression vermuteter GPCR-Rezeptoren im B16.F10 Zellsystem	108
4.4.3.	Internalisierung GPR 4 im B16.F10-Zellsystem.....	109
4.5.	Adhäsions-Signalisierung.....	112
4.5.1.	Syndecan-4	112
4.5.2.	Proteinkinase C.....	115
4.5.3.	Fokale Adhäsionskinase.....	123
5.	Fazit.....	126
6.	Quellenverzeichnis.....	129
7.	Abbildungsverzeichnis	140
8.	Zusammenfassung	143
9.	Danksagung.....	145

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ATX	Autotaxin
Cdc42	Cell division control protein 42
CDP	Cytidindiphosphat
CMC	Kritische Mizellenbildungskonzentration
CoA	Coenzym A
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
DAG	Diacylglycerol
DMR	Dynamische-Massenumverteilung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPR	Enhanced Permeation and Retention
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FFA	Freie Fettsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase
LPLAT	Lysophospholipidacyltransferase
LysoPA	Lysophosphatidsäure
LysoPC	Lysophosphatidylcholin
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MLC	Leichte Kette des Myosin Moleküls
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
PAK	P21 activated kinase
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PtdIns _{4,5} P ₂	Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat

PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROCK	Rho-associated protein kinase
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
TAG	Triacylglycerid
TAG	Triacylglycerol
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WASP	Wiskott–Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASP-family verprolin-homologous protein

1. Einleitung

Neoplasien stellen in unserer Gesellschaft eine der dominanten Ursachen für Mortalität dar. Im Jahr 2015 machten Krebserkrankungen alleine rund 25 % aller Todesfälle in Deutschland aus und sind damit die zweithäufigste Todesursache nach Krankheiten des Kreislaufsystems mit ca. 38 % aller Todesfälle [1].

Neue diagnostische Methoden sowie verbesserte therapeutische Optionen zeigen dabei für die Vereinigten Staaten von Amerika und auch für Deutschland eine Reduktion der altersstandardisierten krebsbedingten Sterberaten seit den 1990er Jahren [2,3]. Ein allgemein steigendes Gesundheitsbewusstsein in der Gesellschaft und verbesserte Arbeitsbedingungen stellen durch das Vermeiden von Kontakt mit Kanzerogenen sicherlich wichtige Faktoren zur Reduzierung maligner Tumorerkrankungen dar.

Demgegenüber steht eine immer älter werdende Gesellschaft und der Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Auftreten von Krebserkrankungen. Denn mit jeder weiteren Zellteilung steigt die Wahrscheinlichkeit von Fehlern in der Replikation von Erbinformation sowie für den Kontakt mit kanzerogenen Substanzen. Berücksichtigt wird dies auch in den Statistiken durch die Altersstandardisierung [4].

Neben der steigenden Lebenserwartung stellt auch das Übergewicht als weiterer Nebeneffekt unserer Wohlstandsgesellschaft einen nicht zu unterschätzenden Risikofaktor für Krebserkrankungen dar. Der derzeit postulierte Mechanismus basiert dabei auf der vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und der generell chronisch entzündeten Stoffwechsellage des Adipositas-assoziierten metabolischen Syndroms [5–8]. Die perspektivische Bedeutung dieses Zusammenhangs zeigt sich, wenn man bedenkt, dass in Deutschland im Zeitraum von 2008 bis 2011 23 % der Männer und 24 % der Frauen stark übergewichtig waren [9] und die Prävalenz für Übergewicht mit dem Lebensalter steigt.

Trotz aller Fortschritte in der Krebstherapie ergibt sich immer noch ein grundlegendes Problem. Eine antineoplastische Therapie stellt einen massiven Eingriff in physiologische Abläufe dar. Daraus resultiert ein fast zwingendes Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Dabei kann z.B. die Targetierung schnell proliferierender Zellen zu Mukositis, Gastritis und Haarausfall führen. Und gerade

Therapieansätze, die auf die DNA zielen, können selbst Mutationen auslösen. Oft stellen diese Nebenwirkungen den therapielimitierenden Faktor dar. Dabei muss noch nicht einmal eine Substanztoxizität auftreten. Alleine der Verlust von Lebensqualität kann mit einer einhergehenden Depression eine negative Prognose bezüglich der Mortalität bedingen [10–12].

Darüber hinaus stellt die Bildung von Metastasen eine der größten Komplikation einer malignen Neoplasie dar. Es existiert keine universell einsetzbare antimetastatische Therapie und, wie im Kapitel 2.9 näher ausgeführt, sind je nach Tumorentität antimetastatische Therapien sogar selbst prometastatisch.

Es erscheint daher nicht überraschend, dass die Entwicklung antineoplastischer Medikamente auf eine Minimierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen durch optimale Targetierung maligner Zellen mit minimalen Kollateralschäden abzielt und auch die Entwicklung antimetastatischer Therapien einen Fokus einnimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit bietet sich nun die Gelegenheit den antimetastatischen Mechanismus eines Zufallsbefundes näher zu ergründen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Massing [13] konnte zeigen, dass auch leere Liposomen einen antimetastatischen Effekt aufweisen. Die vermutete Effektor-Substanz LysoPC ist dabei sicherlich kein Unbekannter. Da LysoPC bei der Freisetzung von Arachidonsäure entsteht und auch ein Bestandteil des LDL ist, wurde es allerdings über etliche Jahre vornehmlich mit arteriosklerotischen Erkrankungen und Entzündungen assoziiert. Im Rahmen dieser Arbeit kann durch seine antimetastatischen Effekte eine weitere Facette des LysoPCs betrachtet werden.

Die Aufklärung eines Mechanismus bedingt natürlich, dass zahlreiche Hypothesen gebildet, Ansätze zur Verifizierung oder Falsifizierung dieser etabliert und durchgeführt werden und aus den Ergebnissen wiederum neue Erkenntnisse und Ansätze für folgende Experimente resultieren.

Diese in der Forschungszeit durchgeführte Arbeitsweise soll sich auch in der Arbeit wiederfinden. In klassischer Weise beginnt diese mit der Theorie und den notwendigen Grundlagen für das tiefergehende Verständnis der Thematik. Kurze Wiederholungen und vertiefte Einblicke sollen dem Leser im Bereich der Diskussion die wichtigsten Aspekte dann noch einmal vor Augen führen.

Die Beschreibung der Methoden beinhaltet in dieser Arbeit nur erfolgreich etablierte Versuchsaufbauten. Angedachte und durchgeführte Methoden, die sich trotz intensiver Bemühungen als nicht geeignet herausgestellt haben, werden nur im Bereich des Ergebnisteils bezüglich ihrer Etablierung und der nicht zu überwindenden Limitierungen besprochen.

Aufgrund des logischen Aufeinanderfolgens der einzelnen Experimente, ihrer Ergebnisse und Implikationen für die ursprünglichen Hypothesen, und den konsequenterweise nachfolgenden Versuchen, wird auch auf die sonst anzutreffende Aufteilung von Ergebnissen und Diskussion in verschiedene Abschnitte bewusst verzichtet.

Resultierend kann in dieser Arbeit der Effekt des LysoPCs aufgezeigt werden, der durch die Beeinflussung der an der Adhäsion beteiligten Proteinkinasen weit über die biophysikalische Veränderung von Membraneigenschaften hinausgeht.

Auch für den Bereich der regulatorischen Pharmazie mag diese Arbeit sicherlich interessant sein. So zeigt doch ein vermeintlicher Hilfsstoff selbst eine nicht zu verachtende physiologische Wirkung und ist somit potentiell als Wirkstoff anzusehen.

2. Theorie

2.1. Lipidstoffwechsel

Lipide, definiert als „wasserunlösliche Biomoleküle, die in organischen Lösungsmitteln sehr gut löslich sind“ [14], spielen eine bedeutende Rolle im Aufbau und in der Funktionalität von Zellen. Dies zeigt sich alleine schon dadurch, dass ca. 5 % der Gene Lipid-assoziierte Proteine codieren. Verwendung finden Lipide in Form unterschiedlicher amphiphiler Phospholipide oder Sphingolipide als Hauptbestandteile von Membranen und ermöglichen durch die Hydrophobie der Lipidmembranen erst eine Kompartimentierung von Zellen. Darüber hinaus dienen sie zumeist als Triglyceride der Speicherung von Energie und fungieren oftmals in Form von Abbauprodukten als Signalmoleküle [15].

Zellmembranen zeichnen sich durch einen asymmetrischen Aufbau aus. Dabei unterscheiden sich, neben der Grundmatrix Phosphatidylcholin (PC), die Lipide der cytosolischen von denen der luminalen Seite. Durch die höhere Packungsdichte der, in der luminalen Seite gehäuft vorkommenden, Sphingolipide und Cholesterole, kann zum Beispiel eine höhere Stabilität erreicht werden [16]. Zellphysiologische Vorgänge setzen diese Asymmetrie auch zwingend voraus. Zum einen wirkt sie an der Aufrechterhaltung des elektrischen Membranpotentials mit, zum anderen ist sie eine Bedingung für den Einbau von Membranproteinen, wie z.B. Transporten oder Rezeptoren, in der physiologisch korrekten Orientierung. Veränderungen dieser physiologischen Ordnung können somit unmittelbar Auswirkungen auf die individuelle Zellfunktion haben, aber auch in Zellverbänden Signalwirkung ausüben [17]. Beispielhaft erwähnt, dient das eigentlich der Cytosolseite zugewandte Lipid Phosphatidylserin, sofern auf der Zelloberfläche präsentiert, als „Friss mich“ Signal für Phagozyten [18].

Auch zeigen Zellen laterale Unterschiede in der Lipidmembran-Zusammensetzung. Lipid Rafts sind hier eine bedeutende strukturelle Komponente. Diese klar geordneten flüssigkristallinen Strukturen können, sehr bildlich betrachtet, wie Flöße durch die fluidere umgebende Membran schwimmen. Zahlreiche Rezeptoren befinden sich in Lipid Rafts oder wandern im Rahmen von Signalisierungsprozessen in diese ein [19].

Beispielhaft erwähnt sei das an der Adhäsion von Zellen beteiligte Syndecan-4, welches sich im Zuge des Clusterings nach Aktivierung in die Lipid Rafts einlagert [20].

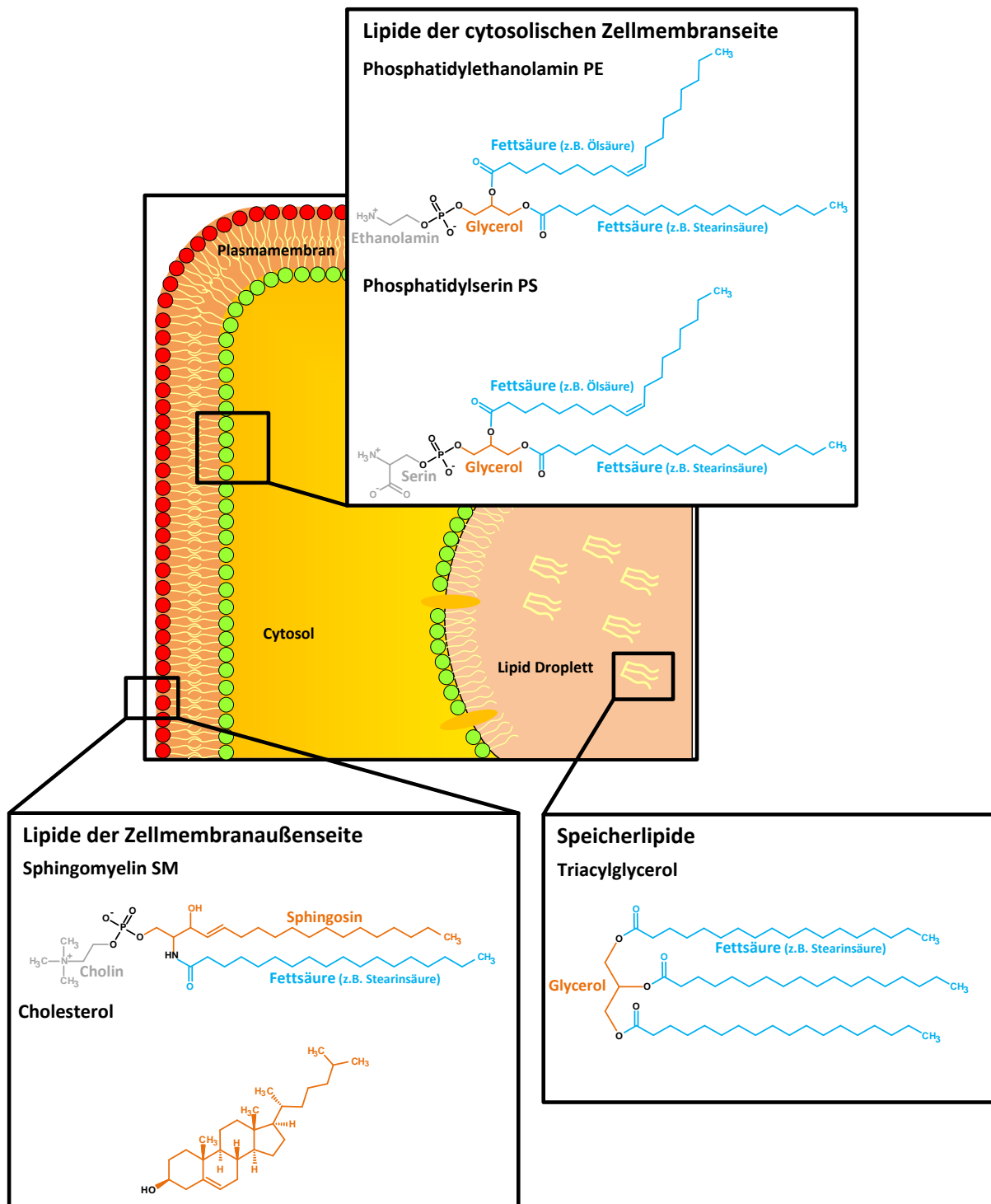


Abbildung 1 Schematischer Aufbau der Zellmembran von Säugetieren

Zu erkennen ist der asymmetrische Aufbau. Neben der hier nicht explizit gezeigten Phosphatidylcholin (PC) – haltigen Grundmatrix der Zellmembran befinden sich in der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht bevorzugt Sphingomyelin (SM) und Cholesterol. Besonders das Vorhandensein des Sphingomyelins führt zu hoher Packungsdichte. In der cytosolischen Seite dominieren die Glycerolipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS). Basierend auf [16].

Die zelleigene Neusynthese der in Biomembranen dominierenden Lipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin findet über den Kennedy Pathway statt. Dabei wird der jeweilige Aminoalkohol über mehrere Phosphorylierungsschritte enzymatisch auf bereitgestellte Diacylglycerole übertragen [21].

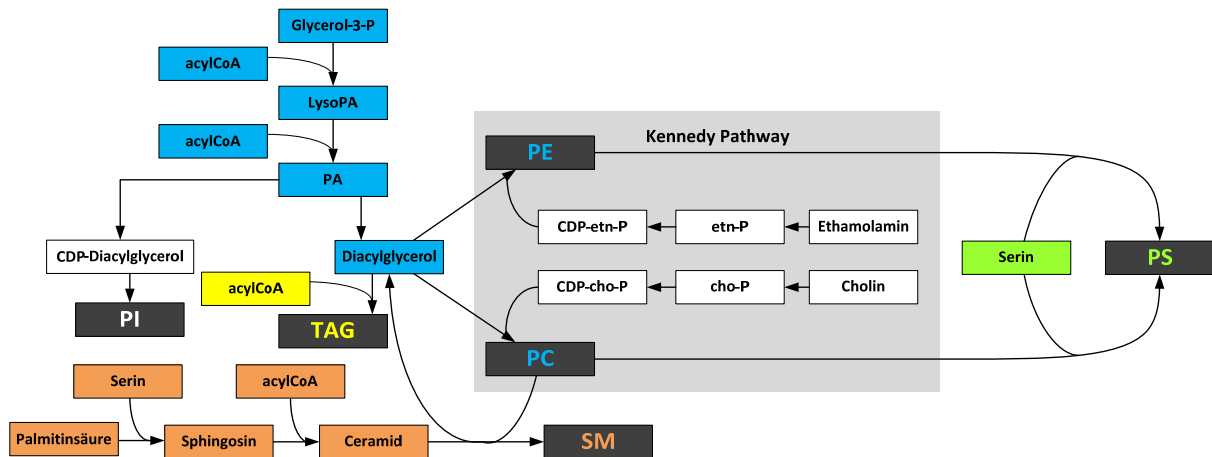


Abbildung 2 Intrazelluläre Lipidsynthese von Säugetierzellen

Ausgehend von aktiviertem Glycerol findet über mehrere Schritte eine Acylierung mit durch CoenzymA (CoA) bereitgestellten Fettsäuren statt. Das zunächst resultierende Diacylglycerol stellt die Ausgangsstufe für die Synthese des Energiespeichers Triacylglycerol (TAG) sowie der Membranlipide Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylcholin (PC) über den Kennedy Pathway dar. Diesem angeschlossen ist die potentielle Umwandlung beider hin zu Phosphatidylserin (PS). Das Phosphatidylcholin liefert darüber hinaus die Cholin-veresterte Phosphatgruppe zur Umwandlung des Ceramids in ein Sphingomyelin (SM). Die Synthese des an zahlreichen Signalisierungsschritten beteiligten Phosphatidylinositol (PI) geschieht ausgehend von Cytidindiphosphat (CDP) – aktiviertem Diacylglycerol. Basierend auf [16,21,22].

Vom Ort der Synthese zum Zielort gelangen Lipide entweder durch die Verschmelzung von Vesikeln, durch Transport der Monomere oder mit Hilfe von zielortspezifischen, in die Lipide eingebauten Proteinen [15].

Neben der de novo Synthese sind Zellen auch in der Lage die vorhandenen Lipide zu verändern. Dies geschieht im Zuge des Lands-Cycles. Durch die Phospholipase A₂ wird hierbei die Fettsäure an der 2-Position der Glycerolteilstruktur abgespalten und es entsteht ein Lysolipid. Auf dieses Lysolipid kann nun durch die Lysophospholipidacyltransferase (LPLAT) eine neue, durch das Coenzym A (CoA) aktivierte, Fettsäure übertragen werden [23].

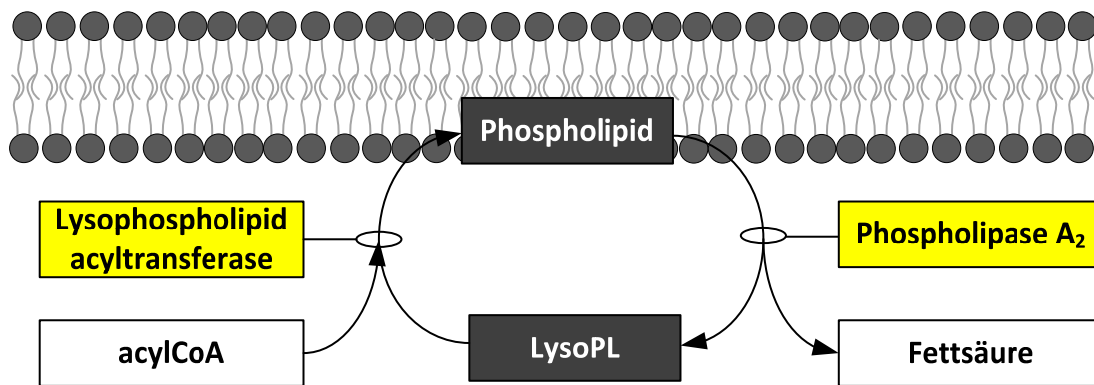


Abbildung 3 Membranlipidremodulierung durch den Lands-Cycle

Die Zusammensetzung der in der Membran befindlichen Phospholipide kann kontinuierlich verändert werden. Dabei wird eine Fettsäure durch die Phospholipase A₂ entfernt. Auf das dabei entstehende Lysophospholipid (LysoPL) kann mittels der Lysophospholipidacyltransferase eine neue durch CoA aktivierte Fettsäure übertragen werden. Basierend auf [23].

Die Speicherung von Energie erfolgt in Form von Triglyceriden, aus denen bei Bedarf die mit Glycerol veresterten Fettsäuren gelöst und anschließend oxidiert werden können [14]. Als Ausgangssubstanz für die Triglyceridsynthese dient hier Lysophosphatidsäure (LysoPA) [15]. Im Cytosol werden die Lipide in Form von Lipid Droplets gespeichert. Diese nutzen Lipide der cytosolischen Membranseite um die neutralen Speicherlipide im wässrigen Cytosol zu emulgieren [24].

Neben der Einlagerung von Proteinen kann die Mitwirkung von Lipiden an Signalkaskaden auf mehreren Wegen erfolgen.

Zum einen können Lipide selber Liganden von membranständigen Rezeptoren sein. Zu nennen sind hier Sphingosin-1-phosphat (S1P), Lysophosphatidsäure (LysoPA) sowie freie Fettsäuren (FFA). Diese können Zellmembranen relativ frei passieren, und somit neben exogener Genese auch aus dem Abbau von membranständigen Phospholipiden durch Phospholipasen stammen [25].

Darüber hinaus können wie zuvor beschrieben auch membranständige Lipide wie Phosphatidylserin Ligand werden, wenn sie an der Zelloberfläche präsentiert werden.

Die Mitwirkung von Lipiden an Signalkaskaden ist jedoch nicht nur auf die Bildung von Messenger Molekülen beschränkt, sondern kann auch durch Veränderung der in der Membran verbleibenden Lipide erfolgen. Die Veränderung der Kopfgruppe kann durch Ladungsänderungen erst ein Anlagern von Proteinen ermöglichen [25]. Hier ist Phosphatidylinositol als einer der prominentesten Vertreter zu nennen. Der Inositol-

6-Ring der Kopfgruppe kann in 8 verschiedenen Mustern von der unphosphorylierten Variante über das am häufigsten vorkommende Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat ($\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$) bis hin zum Phosphatidylinositol Triphosphat ($\text{Pi}(3,4,5)\text{P}_3$) phosphoryliert werden und dadurch spezifisch die Anlagerung von Proteinen ermöglichen. Analog zur zuvor genannten Abspaltung des Kohlenwasserstoff-Restes kann auch die hydrophile Kopfgruppe des Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat durch die Phospholipase C abgespalten werden, wodurch ein lösliches Inositol 1,4,5 Triphosphat und ein in der Membran zurückbleibendes Diacylglycerol resultiert. Beide fungieren ihrerseits als Second Messenger [26]. Inositol 1,4,5 Triphosphat bewirkt, unabhängig von extrazellulärem Calcium, eine Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum [27]. Diacylglycerol ist zusammen mit Calcium Aktivator von Isoenzymen aus der Familie der konventionellen Proteinkinase C [28].

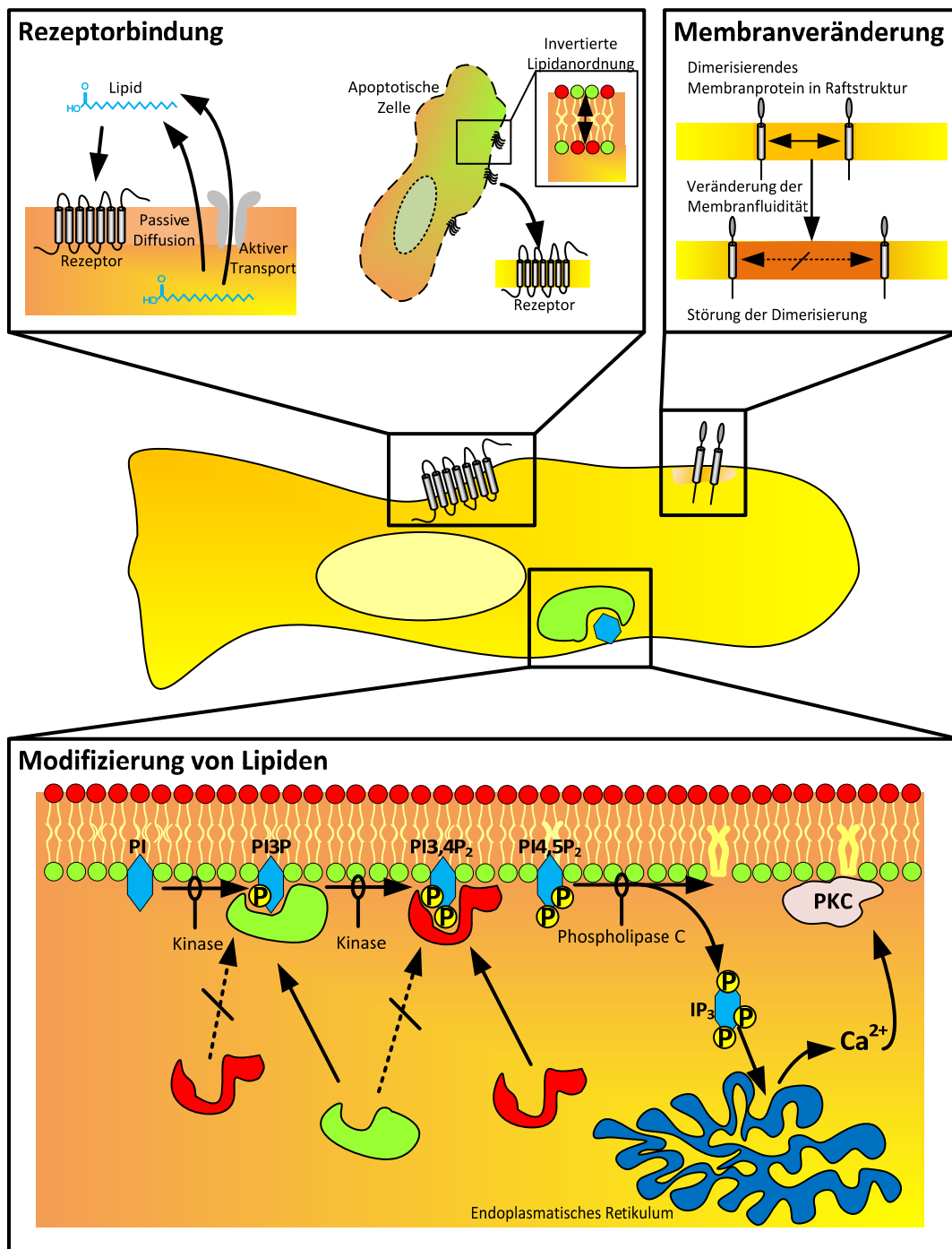


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Lipidsignalisierung

Lipide können zahlreiche Funktionen innerhalb von Signalisierungsvorgängen einnehmen. Gezeigt sind einige Exemplarische.

Die Signalisierung kann in Form einer klassischen Ligand-Rezeptor-Interaktion erfolgen. Dabei können einzelne exogene sowie auch endogene Lipide Liganden darstellen. Diese können aktiv sezerniert werden oder abhängig von ihrer Lipophilie passiv durch die Zellmembran diffundieren. Ebenso können membranständige Lipide anderer Zellen als Liganden agieren.

Rezeptoren, die im Zuge die Signalweiterleitung ihre Position verlagern, können durch die Veränderung der Membranfluidität beeinflusst werden.

Ebenso basiert eine Vielzahl von Signalisierungsvorgängen auf der Anlagerung von Proteinen an der Membrannenseite. Modifikationen der Kopfgruppen der dem Cytosol zugewandten Lipide der Zellmembran wie

z.B. dem Phosphatidylinositol können diese überhaupt erst ermöglichen oder verhindern. Auch kann die Kopfgruppe des Phosphatidylinositol abgespalten werden, wodurch ein phosphoryliertes Inositol als Second Messenger entsteht. Das IP_3 kann in dieser Funktion zu einer intrazellulären Calcium-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum führen. An dem dabei in der Membran zurückbleibenden Diacylglycerol (DAG) können sich Isoenzyme der Proteinkinase C-Familie anlagern. Basierend auf [19,25–27].

2.2. Lysolipide

Lysolipide zeichnen sich durch ein ubiquitäres Vorkommen in Lipid-assoziierten Stoffwechselfvorgängen aus. Physiologische LysoPC Serumspiegel liegen im Bereich von 200 bis 300 $\mu\text{mol} / \text{L}$ [29,30] wovon mit ca. 30 $\mu\text{mol} / \text{L}$ ein Zehntel auf das gesättigte Stearinsäurederivat LysoPC C18:0 entfällt [31]. Im Rahmen von neoplastischen Erkrankungen zeigt sich eine Reduktion der LysoPC Plasmaspiegel [30]. Umgekehrt zeigen aktuelle Studien, dass höhere LysoPC Plasmaspiegel als ein positiver prognostischer Marker bei malignen Erkrankungen gewertet werden können [32]. Im Blut herrscht ein chemisches Gleichgewicht zwischen freiem LysoPC, an Albumin-gebundenem LysoPC, temporär in der Zellmembran befindlichem LysoPC sowie durch den Lands-Cycle letztendlich in die Membran eingebautem Phosphatidylcholin. Albumin kann effizient als Transportprotein für LysoPC fungieren. Es sind fünf Bindungsstellen für LysoPC pro Albumin Molekül beschrieben. Aufgrund der fünf nacheinander besetzten Bindungsstellen liegt ein Großteil des Plasma-LysoPCs an Albumin gebunden vor, wodurch Albumin eine Reservoir Funktion besitzt [33,34].

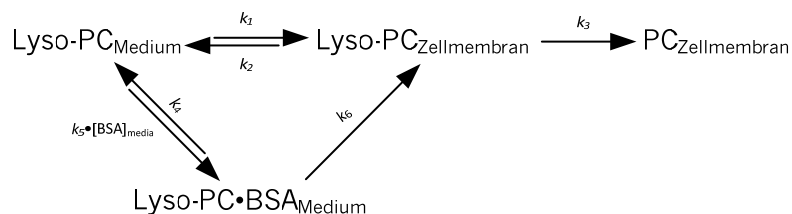


Abbildung 5 Kinetische Betrachtung der LysoPC-Verteilung

Im Rahmen der Zellkultur appliziertes LysoPC befindet sich zunächst in einem chemischen Gleichgewicht zwischen einem im Medium an BSA-gebundenen Zustand und einem im Medium freien Zustand. Darüber hinaus kann sich das LysoPC auch kurzfristig innerhalb der Zellmembran aufhalten. Aufgrund seiner Eigenschaft als Detergenz und Substrat im Rahmen des Lands-Cycles besteht dieser Zustand allerdings nur kurzfristig, sodass entweder eine Lyse der Zellmembran erfolgt oder das LysoPC weiter verstoffwechselt wird. Aus [34].

Funktionell wird LysoPC zum Teil als „Find me“ Signal für Zellen des Immunsystems angesehen [35]. Gerade auch, weil LysoPC im Rahmen von Entzündungsgeschehen bei der Phospholipase A₂ vermittelten Freisetzung von Arachidonsäure entsteht [36].

Zunächst durchaus im Gegensatz zu dieser Meinung stehen die Beobachtungen, dass LysoPC bei dendritischen Zellen des Immunsystems eine reduzierte Adhäsion und Migration bewirkt. Als Mechanismus wurde eine Syndecan-4 Inaktivierung als Konsequenz der LysoPC Exposition festgestellt. Die Autoren erklären dies jedoch als möglichen Schutzmechanismus vor Autoimmunreaktionen [35].

Im Tiermodell zeigt LysoPC, welches hier als Abbauprodukt von Liposomen aus gesättigten Lecithinen resultierte, einen antimetastatischen Effekt [13]. Die Liposomen sammeln sich bedingt durch EPR Effekte (Enhanced Permeability and Retention), die aus einer Hypoxie-induzierten Vaskularisierung resultieren [37], vornehmlich im neoplastischen Gewebe an. Dort findet durch die Phospholipase A₂ ein Abbau des Phosphatidylcholins zum LysoPC statt. Ebenso führt eine direkte Präinkubation von B16.F10 Melanomzellen mit dem gesättigten LysoPC C18:0 vor Injektion in Mäuse zu einer bedeutend geringeren Metastasierung. In vitro Untersuchungen zeigen eine reduzierte Adhäsion und Migration der Tumorzellen als wahrscheinlichen funktionellen Hintergrund [38].

Wenngleich die Bedeutung von Lysophosphatidylcholin in der zuvor skizzierten Remodellierung von Lipiden weitestgehend unbestritten ist und sich die Effekte auf neoplastische Zellen wie auch auf Zellen des Immunsystems in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben finden lassen, sind die genauen Mechanismen der Interaktionen mit zellulären Strukturen nicht unbedingt Gegenstand des wissenschaftlichen Konsenses. Im Besonderen wird die Rolle des LysoPC als Ligand an G Protein-gekoppelten Rezeptoren wie z.B. GPR 4, GPR 68 und G2A sehr kontrovers diskutiert [39]. Artikel, die LysoPC-Bindungen am G2A und GPR4 Rezeptor zeigten, wurden aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit im Nachhinein von den Autoren wieder zurückgezogen [40]. Zugesprochen wird diesen Rezeptoren hingegen eine Empfindlichkeit für Protonen [41].

Es ist nicht auszuschließen, dass einige der beobachteten GPCR Effekte nicht auf das LysoPC zurückgehen, sondern entweder der Lysophosphatidsäure (LysoPA)

zuzuschreiben sind, bei der Konsens bezüglich ihrer Eigenschaft als GPCR Ligand besteht, oder die Konsequenz einer LysoPC induzierten Membranremodellierung sind.

Die extrazelluläre Bildung von LysoPA aus LysoPC wird durch das zelleigene Enzym Autotaxin (ATX) vermittelt. Dabei handelt es sich um eine sekretierte Lysophospholipase D. Die gebildete LysoPA dissoziiert dabei nicht vollständig ab, sondern wird gebunden an Autotaxin entlang der Plasmamembran zu LysoPA-Rezeptoren transportiert [42]. Die Bindung von Autotaxin an der Zelloberfläche wird durch das Integrin $\beta 3$ vermittelt, welches an die Somatomedin B Domäne bindet [43]. Unter diesem Hintergrund ist es durchaus denkbar, dass eine reduzierte Integrinaktivität auch mit einer verminderten Autotaxin-Aktivität einhergeht. Generell zeigt Autotaxin in Abhängigkeit des Substrates unterschiedliche Katalysegeschwindigkeiten. Das Ölsäurederivat LysoPA C18:1 zeigt sogar eine partielle Inhibition der Autotaxin-Aktivität [44]. Auch zeigt das strukturell ähnliche FTY720P, die durch die Sphingosin Kinase phosphorylierte Wirkform des bei Multipler Sklerose eingesetzten Immunsuppressivums Fingolimod, eine Autotaxin-Inhibition [45].

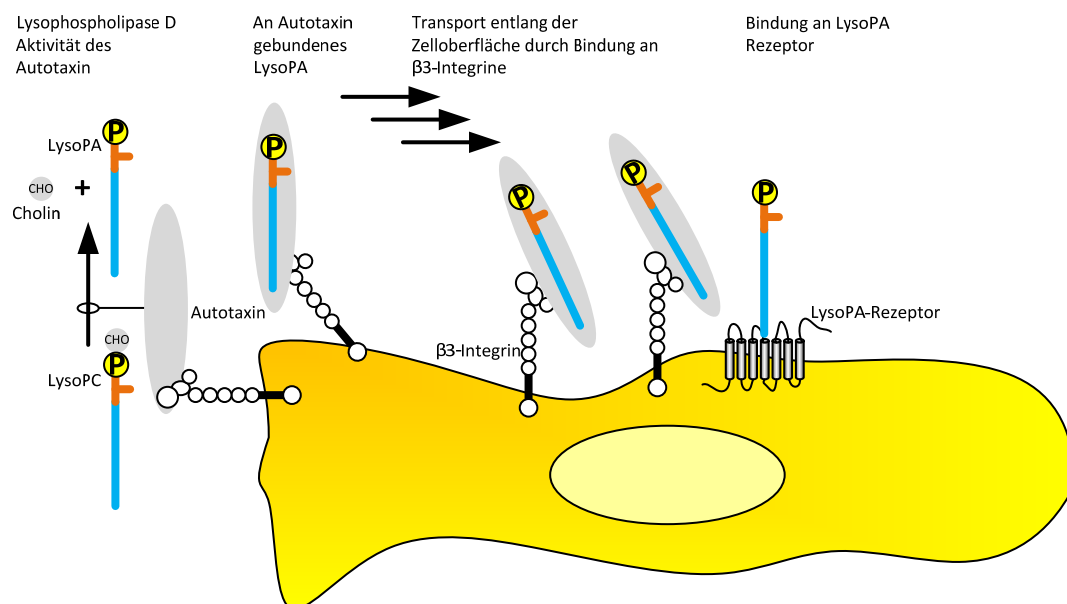


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Autotaxin Signalisierung

Das von der Zelle sezernierte Autotaxin besitzt eine Lysophospholipase D Aktivität, wodurch der Cholinrest des Lysophosphatidylcholins abgespalten werden kann. Die resultierende Lysophosphatid verbleibt gebunden an das Autotaxin. Das Autotaxin selbst ist an die $\beta 3$ -Untereinheit von Integrinen gebunden. Basierend auf [43,45,46].

LysoPA wird generell als prometastatischer Faktor angesehen. Vermittelt über die verschiedenen LysoPA GPCRs führt LysoPA zu einer verstärkten Zellproliferation sowie

auch verstärkter Migration [46]. Mit dem in klinischen Studien der Phase 2 zur Behandlung der idiopathischen pulmonalen Fibrose befindlichen LPA₁ Antagonisten BMS-986020 scheint LysoPA auch in den therapeutischen Focus zur Immunmodulation zu rücken [39].

2.3. Metastasierung

Als Metastasierung wird der Prozess der Auswanderung neoplastischer Zellen vom Primärtumor durch das umgebende Bindegewebe und anschließend über Blut- oder Lymphgefäße zu einem neuen Ort, mit dortiger Ausbildung eines Sekundärtumors, verstanden. Dieser aus fünf Schritten bestehende Prozess wird auch als metastatische Kaskade bezeichnet.

Dabei müssen sich zunächst einzelne Zellen oder kleinere Zellverbände aus dem Gewebe des Primärtumors lösen. Man spricht hier von der **Dissoziation** [47]. Funktionell betrachtet findet dabei eine Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) statt. Dieser sowohl bei der Embryogenese als auch der Geweberegeneration stattfindende biologische Prozess führt einhergehend mit zahlreichen morphologischen Veränderungen unter anderem zu einer Reduktion der gewebebildenden Zell-Zell-Kontakte [48]. Diese Zell-Zell-Kontakte werden vornehmlich durch die membranständigen und intrazellulär mit dem Aktinzytoskelett verbundenen Glykoproteine der Cadherin-Familie vermittelt, im Besonderen durch das E-Cadherin. Eine Reduktion der E-Cadherin Expression, ebenso wie deren beschleunigter Abbau durch Proteasen, kann dementsprechend einen prometastatischen Effekt haben [49]. Auch führt eine stärkere Expression von N-Cadherin zu einer Reduktion der E-Cadherin Expression, was mit einer verstärkten Invasion und Sterblichkeit von Metastasen korreliert [47].

Die losgelösten Zellen entwickeln eine morphologische Asymmetrie ihrer Adhäsionsmoleküle, die eine gerichtete Bewegung durch das Bindegewebe ermöglicht. Die Migration findet dabei analog den Zellen des Immunsystems statt [50]. Stellt das Bindegewebe eine Barriere dar, kann durch Ausbildung zelleigener Enzyme wie den Matrixmetalloproteinasen (MMP) ein Abbau der Extrazellulären Matrix erfolgen. Dabei ist jedoch eine sorgsame Koordination mit den Adhäsionsmolekülen erforderlich, da

die Zelle sonst im Falle eines zu starken Abbaus das umgebende Gerüst zur Kraftkopplung verliert [51]. Diese als **Invasion** bezeichnete Migration erfolgt solange bis die Zellen ein Gefäßsystem erreicht haben.

Dort angekommen findet die **Intravasation** in das entsprechende Gefäßsystem statt. Dabei muss die Zelle aus der das Gefäßsystem umgebenden extrazellulären Matrix durch das Gefäßendothel in das Gefäßlumen eindringen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den viskoelastischen Eigenschaften der Zellen. So zeigt sich für Ovarialkarzinomzellen ein klarer Zusammenhang zwischen Verformbarkeit und Invasivität [52]. Ist die Zelle zu rigide, kann sie die engen Bereiche zwischen den endothelialen Zell-Zell-Verbindungen nicht durchqueren. Ist die Zelle hingegen zu fluide, kann nicht genug Kraft übermittelt werden um überhaupt eine Lücke zu erzeugen [53].

In den Gefäßen sind die nun zirkulierenden Tumorzellen zum einem den Scherkräften des Blutflusses, zum anderen der verstärkten Detektion durch Zellen des Immunsystems, ausgesetzt. Beiden Problemen begegnen die metastasierenden Zellen durch Ummantelung mit Thrombozyten. Gebunden über unter anderem L- und P-Selektin führt dieser Thrombozytenüberzug zu einer verlängerten Lebensdauer in den Gefäßsystemen [54]. Die zirkulierenden Tumorzellen (CTC) werden auch als diagnostischer Marker für das Ansprechen auf eine Chemotherapie verwendet. Dabei gelten Werte von 5 CTC / 7,5 mL Ganzblut als erhöht [55].

Analog zu Zellen des Immunsystems können die metastasierenden Zellen vermittelt über Selektine und Integrine am Gefäßendothel adhären und damit die Gefäße verlassen. Dieser Prozess wird als **Extravasation** bezeichnet [54]. In besonders kleinen Gefäßen kann die Extravasation auch ohne vorherige Adhäsion rein durch Okklusion stattfinden. Dies ist der Fall, wenn der Gefäßdurchmesser unterhalb von 10 µm liegt, somit bedeutend kleiner als der von Tumorzellen ist [53].

An diesem neuen Ort angekommen, kann nun in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Zielgewebes **ein neuer Tumor etabliert** werden. Allerdings ist es auch möglich, dass sich die Zelle im Gewebe einnistet, aber im Stadium der Mikrometastase über einen längeren Zeitraum verbleibt.

Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang ist die nach den Gründen der Ortspräferenz. So strahlen Brusttumore bevorzugt in Lunge, Knochen und Gehirn, Pankreastumore in Lunge und Leber und Prostatatumore vornehmlich in Knochen aus.

Zum einen ist dies sicherlich dem Blutfluss geschuldet. So ist die Leber nicht nur Teil des klassischen Körperkreislaufs, sondern auch noch des gastrointestinalen Pfortadersystems und damit erstes Ziel für metastasierende Zellen des Gastrointestinal-Systems. Analog stellen die Lungenkapillaren die finale Verengung des venösen Körperkreislaufsystems dar. Doch darüber hinaus, spielen auch die Eigenschaften des Zielgewebes eine bedeutende Rolle [54].

Es existiert die „seed and soil“ Hypothese. Diese sieht in Analogie zur Pflanzenphysiologie die zirkulierende Tumorzelle als Samen und den Ort der letztendlichen Metastasenbildung als spezifischen Mutterboden für die Zelle [56]. Zirkulierende Tumorzellen können demnach an einer Vielzahl von Orten extravadiieren und dort Mikrometastasen bilden. Aber nur wenige Orte bieten ein Umfeld an Wachstumsfaktoren und Bindegewebe, welches tatsächlich in der Lage ist ein umfangreicheres Anwachsen und eine Vaskularisierung des neuen Tumors sicherzustellen, sodass letztendlich die Rate der Zellneubildung die der Apoptose übersteigt.

Beispielhaft können Tumorzellen im Knochengewebe Faktoren sezernieren, die zu einem verstärkten Knochenmetabolismus führen, woraufhin die Knochensubstanz abbauenden Osteoklasten Wachstumsfaktoren sezernieren, die ihrerseits zu Tumorwachstum führen [57].

Erweitert wird dieses Modell des präferierten Gewebes durch das Konzept der metastatischen Nische. Dabei hat auch schon der Primärtumor einen Einfluss auf das Gewebe, in dem sich die Metastase bilden wird, bevor die zirkulierenden Tumorzellen dort eintreffen. Als Antwort auf Wachstumsfaktoren, gebildet von der primären Neoplasie, findet dort eine Remodellierung statt, wodurch sich die prämetastatische Nische bildet [56].

Eine besondere Rolle spielen dabei die Makrophagen, deren Verhalten in hohem Maße zytokingesteuert ist. Während Interferon- γ und Toll-like-Rezeptor-Stimulation zu einer verstärkten Elimination fremder Zellen führen und somit in letzter Konsequenz

antimetastatisch wirken, haben die Interleukine-4 und 13 durch die induzierte Geweberemodellierung den nahezu gegenteiligen Effekt [58].

Hier eintreffende zirkulierende Tumorzellen können nun schnell über das Stadium der Mikrometastase zur Makrometastase heranwachsen. Letztendlich ist dies auch eine mögliche Erklärung für das späte Wiederkehren einer Krebserkrankung nach vorheriger vollständiger Remission. Durch Veränderung der Wachstumsfaktoren kann ein Gebiet zur metastatischen Nische werden und dort zuvor stumm vorhandene vereinzelte Tumorzellen aktivieren.

Bedenkt man, dass sich metastasierende Zellen in ihrem Verhalten doch beachtlich von den Zellen des ursprünglichen Primärtumors unterscheiden, überrascht es kaum, dass sie sich auch über eine höhere genetische Variabilität, verglichen mit den Zellen der ursprünglichen Neoplasie, auszeichnen [47]. Diese genetische Vielfalt scheint auch eins der größten Probleme bei der zielgerichteten Therapie von Metastasen zu sein. Im Gegensatz dazu findet allerdings durch die Umgebung der metastatischen Nische wiederum eine genetische Selektion, als Anpassung an die Mikromilieus statt [59].

Generell drückt der Begriff der metastatischen Kaskade aus, dass der zuvor skizzierte Vorgang lange Zeit als unidirektional empfunden wurde. Hierbei sollte man allerdings bedenken, dass eine Metastase wiederum neue metastasierende Zellen produzieren kann. Diese können sich unter Umständen auch lange nach einer eigentlichen Remission oder sogar vollständigen Heilung am Ort des eigentlichen Primärtumors ansiedeln. Somit spricht derzeit auch einiges für die Vorstellung des metastatischen Zyklus [59].

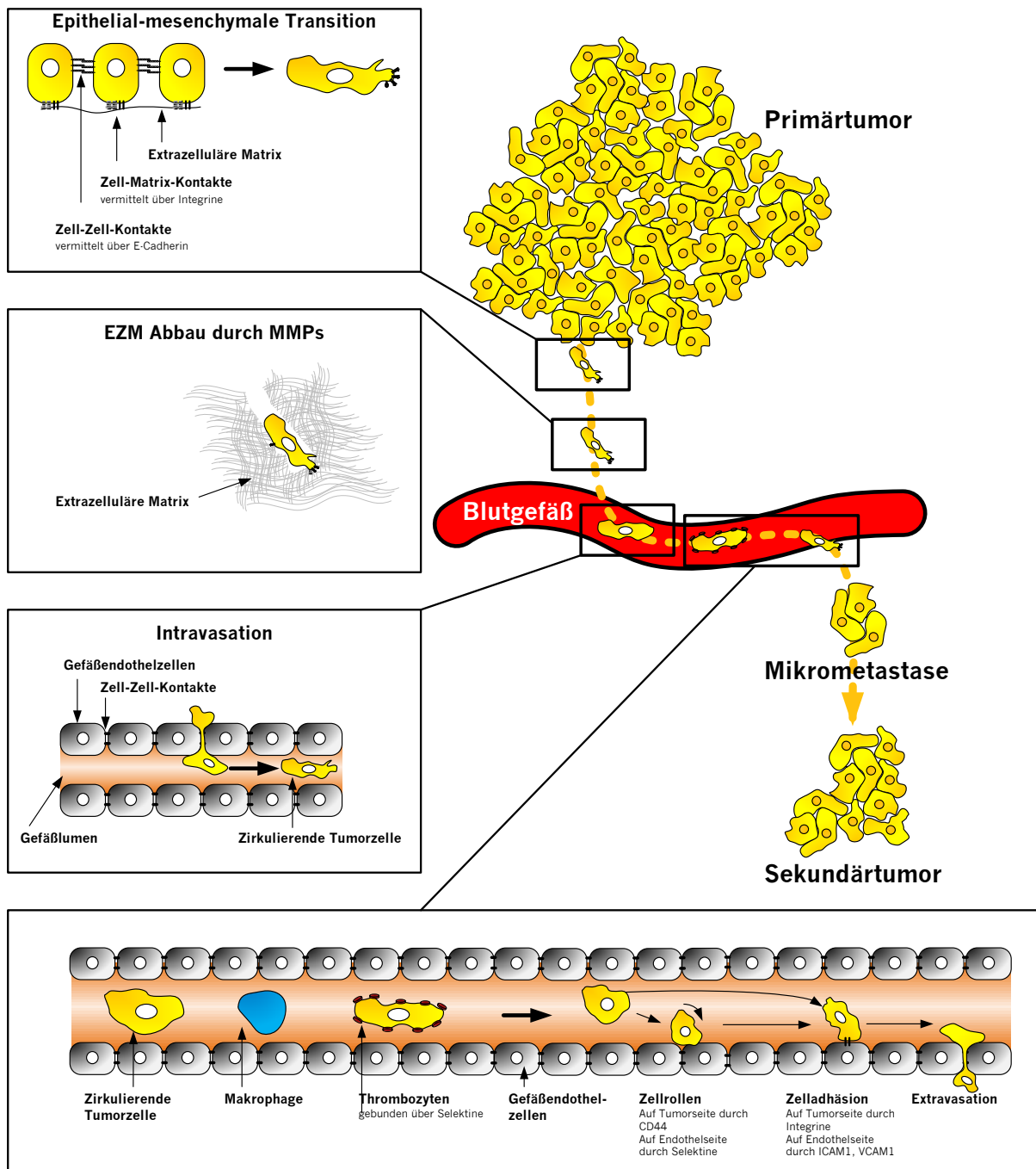


Abbildung 7 Vereinfachter schematischer Ablauf der hämatogenen Metastasierung

Die metastatische Kaskade ist im Interesse einer anschaulichen Abbildung sehr vereinfacht dargestellt und blendet zahlreiche mittlerweile bekannte weitergehende Interaktionen zwischen Zellen der Neoplasie und des restlichen Organismus aus.

Im Zuge der epithelial mesenchymalen Transition verlassen metastasierende Zellen das Gewebe des Primärtumors in Richtung von Blutgefäßen. Extrazelluläre Matrix die eine Barriere darstellt wird proteolytisch abgebaut. Nach Intravasation in das Blutgefäß kann sich die Zelle vor Detektion durch Zellen des Immunsystems durch Bedeckung mit Thrombozyten schützen. Durch Interaktion von Tumorzell-eigenem CD44 mit Selektinen des Endothels kann eine Verlangsamung der Zelle in Form des Zellrollens stattfinden, welches durch die Wechselwirkung von Integrinen der Tumorzelle mit ICAM oder VCAM der Endothelzelle in eine stabile Adhäsion übergeht. Nach Austritt aus dem

Gefäßsystem bildet die Tumorzelle eine Mikrometastase, die in einen Sekundärtumor übergehen kann, eine optimale Umgebung an Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix vorausgesetzt. Basierend auf [53,60].

2.4. Migration

Im Zuge der Epithelial-mesenchymalen Transition erlangen vormals ortsfeste Tumorzellen die Fähigkeit zur Fortbewegung durch Migration [48]. Physiologisch ist die Migration von Zellen auch in einer Vielzahl von Prozessen involviert, die von der embryonalen Entwicklung, über Reaktionen des Immunsystems bis hin zur Neubildung von Bindegewebe nach Verletzungen reichen [60].

Wenngleich der Zelltyp sowie die jeweilige Umgebung maßgeblichen Einfluss auf die Art der Migration haben, lässt sich für die meisten Zellen folgendes Prinzip verallgemeinern: Als Konsequenz eines migrationsinduzierenden Stimulus findet eine Polarisierung der Zelle statt. Diese geht einher mit einem Umbau des Aktincytoskeletts, einem Mikrotubuli unterstütztem Transport von Zellorganellen wie Zellkern oder auch Golgi-Apparat und nach Verlagerung von Zell-Matrix-Kontakten, einer Aktomyosin-Kontraktion [61].

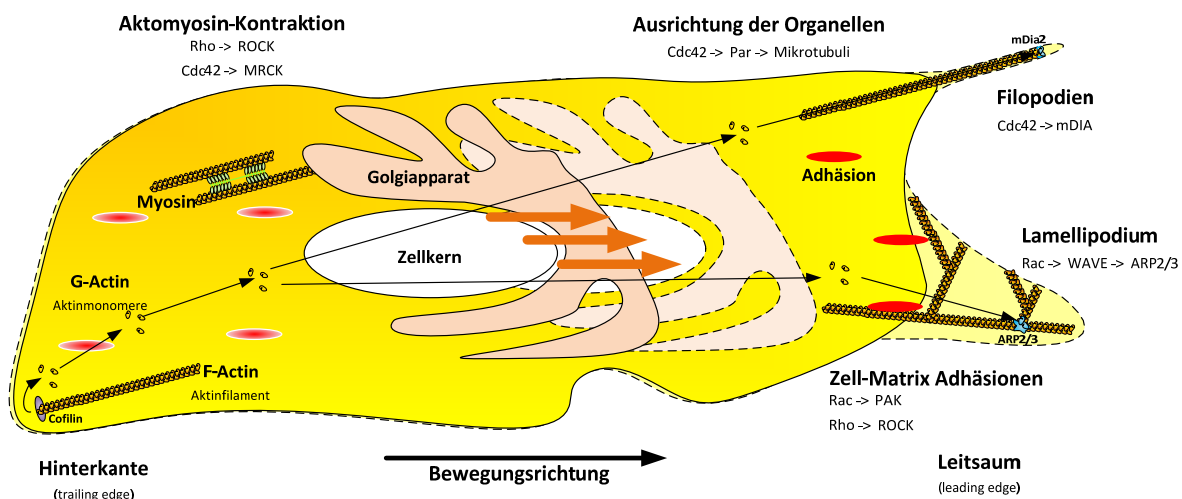


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Migration

Die zelluläre Migration ist eine Konsequenz einer konzertierten Polarisierung innerhalb der Zelle. An der Hinterkante der Zelle findet ein Abbau von Aktinfilamenten (F-Aktin) statt. Unterstützt wird dieser durch das Protein Cofilin. Die Aktinmonomere (G-Aktin) werden in einem als Tretmühlenmechanismus bezeichneten Prozess zum Leitsaum transportiert, wo sie mit Hilfe der mDia Formine wie auch des ARP2/3 Komplexes vorhandene Aktinstränge verlängern und verzweigen. Dabei resultieren aus unverzweigten Aktinsträngen Filopodien, die meist als Sensoren fungieren. Die aus verzweigtem Aktin resultierenden breiteren Ausstülpungen werden als Lamellipodien bezeichnet. Entlang der Aktinstränge kann sich das Motorprotein Myosin anlagern und nach

Phosphorylierung zu einer Akto-Myosin-Kontraktion führen. Die resultierenden Kräfte können durch Zell-Matrix-Kontakte auf die unmittelbare Umgebung der Zelle wirken. Zu der Polarisierung gehört auch eine Verlagerung der Zellorganellen wie dem Zellkern oder dem Golgiapparat entlang der Mikrotubuli. Basierend auf [62–65].

An der Hinterkante der Zelle (trailing edge) werden Aktinstränge vom Minusende (pointed end) aus abgebaut. Enzymatisch wird dies durch das Cofilin beschleunigt [65]. Da die spontane Aggregation der resultierenden Aktinmonomere zu kurzen Aktinfilamenten, wie auch die Wiederanlagerung am Minusende ohne enzymatische Hilfe bei den vorherrschenden Konzentrationen energetisch betrachtet sehr unwahrscheinlich ist, findet ein Transport der Monomere zum Leitsaum der Zelle (leading edge) statt. Dort können die Monomere enzymatisch katalysiert an das Plusende (barbed end) der vorhandenen Aktinstränge angelagert werden und diese verlängern. Dieser Vorgang aus Abbau, Transport und Wiederaufbau wird auch als Tretmühlenmechanismus bezeichnet [14,66,67].

Die Verlängerung der Aktinfilamente kann dabei linear und verzweigt erfolgen. Die lineare Verlängerung wird durch Proteine der Gruppe der Formine wie mDia1 und mDia2 katalysiert. An der Verzweigung ist der ARP2/3 Komplex beteiligt [65,67].

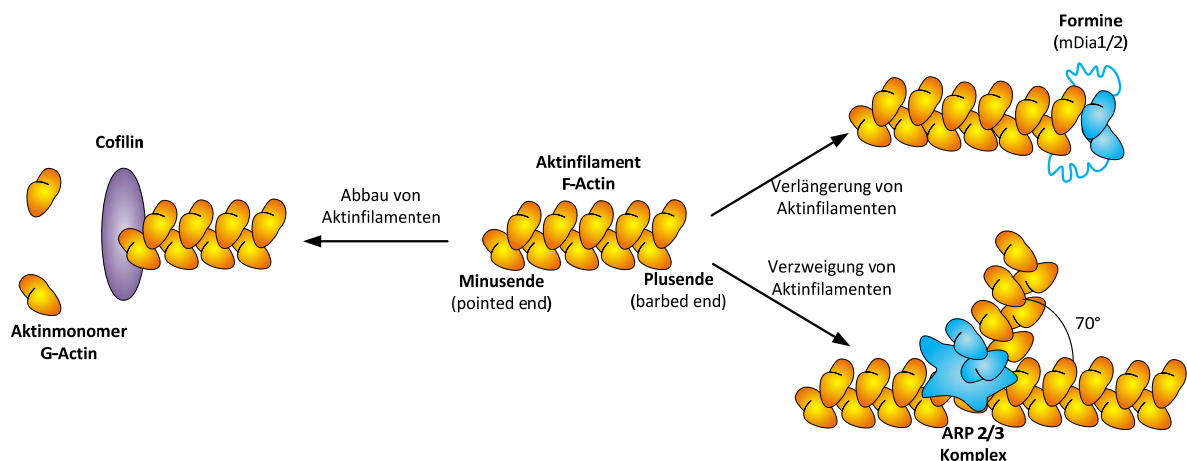


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation und Depolymerisation

In schematischer Vereinfachung kann bei der Betrachtung der Aktinpolymerisation von einem Abbau am Minusende der Filamente ausgegangen werden. Katalysiert wird dieser durch das Enzym Cofilin. Die Verlängerung der Filamente findet mit Unterstützung von Enzymen der Gruppe der Formine wie dem mDia1 und mDia2 am Plusende statt. Die der Ausbildung der Lamellipodien zugrunde liegende Verzweigung von Aktinsträngen ist die Konsequenz des ARP2/3 Komplexes. Basierend auf [65,67,68]

Die länger wachsenden Aktinfilamente im Bereich des Leitsaums können nun ihrerseits Ausstülpungen der Zellmembran erzeugen. Sind diese schmal, spricht man von

Filopodien, die vornehmlich als Sensoren für EZM Strukturen und Chemokine fungieren [60]. Im Gegensatz dazu dienen die breiten Lamellipodien hauptsächlich der Fortbewegung und Zell-Matrix-Interaktion. Ihre Ausbildung ist im Gegensatz zu den Filopodien das Ergebnis des ARP2/3 Komplexes, der sich an die zu verlängernden Aktinfilamente bindet [67]. Zellen können auch ohne Ausbildung von Lamellipodien migrieren, allerdings geschieht dies dann bedeutend langsamer [63]. Der verzweigte Aufbau des den Lamellipodien zu Grunde liegenden Aktingerüsts ermöglicht eine gerichtete Bewegung, mittels derer die Zellen einem Chemokingradienten folgen können [68]. Die punktuell verstärkten Membranausstülpungen führen einhergehend mit einer Rho induzierten Akto-myosin Kontraktion zu einer Bewegung nach dem Prinzip der molekularen Ratsche [69,70]. Die Interaktion von Zellen mit der EZM findet unter anderem durch Integrine statt. Diese haben im Ruhezustand selber keine Verbindung zum Aktinzytoskelett, können aber im Rahmen der Ausbildungen von fokalen Adhäsionskomplexen durch weitere Proteine eine kraftschlüssige Verbindung zwischen EZM und dem Aktinzytoskelett aufbauen [60].

Gesteuert wird die konzertierte Aktinpolymerisation und punktuelle Ausbildung von Adhäsionskomplexen durch GTPasen der Rho Familie. An der Zellvorderseite sind dies Rac und Cdc42. Diese werden ihrerseits im Rahmen der Outside-In Signalisierung als Konsequenz einer Syndecan- oder Integrinstimulation aktiviert. Die GTPase Rho hat einen antagonistischen Effekt auf die Polymerisation und unterdrückt die Rac-Aktivität an der Zellrückseite. Somit wird die gerichtete Adhäsion weiter verstärkt. Ebenso wird die Akto-Myosin-Kontraktion durch Rho verstärkt, wodurch eine Zellbewegung ausgelöst werden kann. Die Lösung von Adhäsionskomplexen auf der Zellrückseite kann entweder aktiv erfolgen oder mechanisch durch erhöhten Zug der fortschreitenden Zelle [60,70].

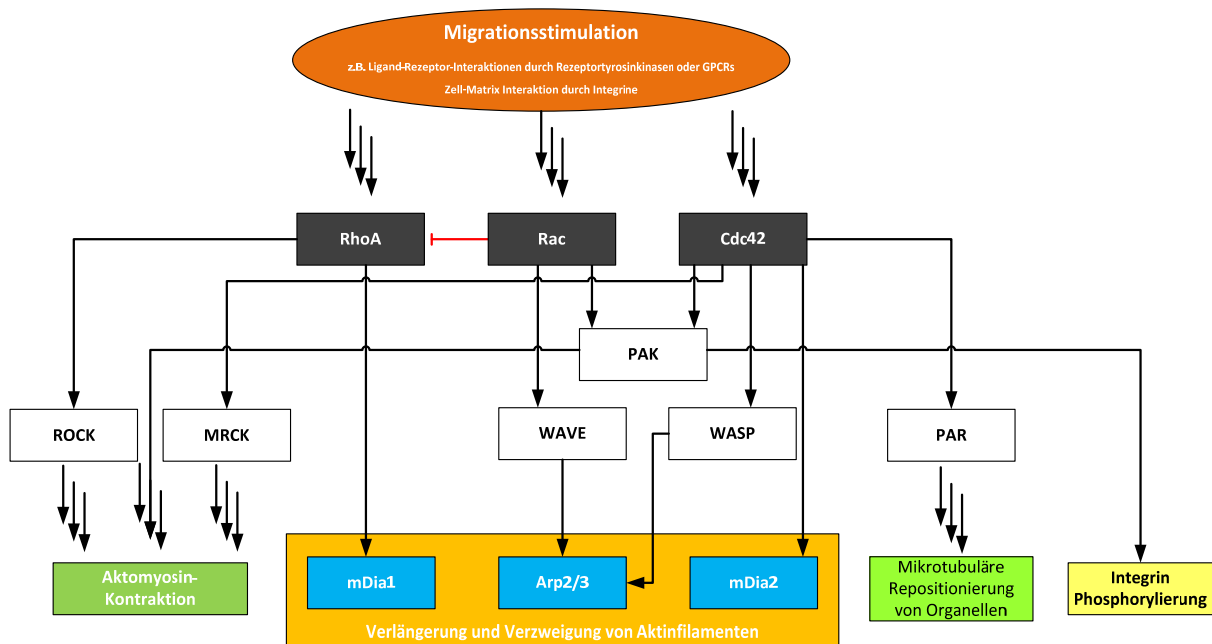


Abbildung 10 Vereinfachte schematische Darstellung der Migrationssignalisierung

Die drei zentralen GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 besitzen ein vielfältiges Aktivierungs- und Aktivitätsmuster, welches von der jeweiligen Protein- und Lipid-Mikroumgebung abhängig ist und darüber hinaus gegenseitig beeinflusst werden kann. So unterdrückt z.B. aktives Rac am Leitsaum die Rho-Aktivität und verhindert damit seitliche Protrusionen [60].

Ausgehend von einem Migrationsstimulus werden die Rho-GTPasen RhoA, Rac oder Cdc42 aktiviert. Über die nachgeschalteten Proteine WAVE und WASP kann eine ARP2/3 vermittelte verzweigte Aktinpolymerisation ausgelöst werden. RhoA wie auch Cdc42 können über die Formine mDia1 und mDia2 jeweils eine lineare Aktinpolymerisation induzieren. Die Auslösung einer Akto-Myosin-Kontraktion wird erreicht durch eine Phosphorylierung der leichten Kette des Myosinmoleküls (MLC), wodurch sich dieses an die Aktinfilamente anlagern kann. Über die Proteine ROCK und MRCK wird die phosphorylierende Kinase des MLC aktiviert sowie die dephosphorylierende Phosphatase inaktiviert. PAK lässt sich von Rac wie auch von Cdc42 aktivieren und ist im aktivierten Zustand unter anderem in der Lage die leichte Kette des Myosin Moleküls direkt zu phosphorylieren und damit auch zu einer Aktomyosin-Kontraktion zu führen [71]. Auch ist eine direkte Phosphorylierung des Integrins $\beta 5$ durch die PAK Isoform 4 beschrieben. Dies führt zu einer Reduktion der Integrinadhäsion und zu einer verstärkten Migrationsgeschwindigkeit [72]. Die für die Polarisierung der Zelle notwendige mikrotubuläre Reorganisation wird über einen Cdc42 und PAR vermittelten Weg ausgelöst.

Basierend auf [62,63,73].

Neben einzelnen Zellen können auf diese Weise auch Zellverbände migrieren. Dabei übernehmen die vorderen Zellen analog dem zuvor Beschriebenen die Führungsrolle und sind über verbliebene Zell-Zell-Kontakte mit den restlichen Zellen verbunden [74].

Alternativ können Zellgruppen auch ohne Kontakte gemeinsam migrieren, dabei sezernieren die führenden Zellen Chemokine [70].

Wie eingangs dieses Abschnittes erwähnt, handelt es sich bei der Migration per se um einen physiologischen Vorgang innerhalb eines Organismus. Dennoch kommt im Zusammenhang mit metastasierenden Tumorzellen auch der Migration ein besonderes Augenmerk zuteil. Doch spielen hier Zellmembranprotrusionen nicht nur bei der Bewegung eine Rolle, sondern in Form der Invadopodien auch bei der Infiltration von Bindegeweben. In Analogie zur Cdc42 induzierten, Arp2/3 vermittelten Aktinverzweigung in den Lamellipodien, sind die Invadopodien auch reich an verzweigten Aktinpolymeren. Neben dem mechanischen Eindringen in die zu infiltrierenden Strukturen findet auch ein chemischer Abbau mit sezernierten ROS (Reaktive Sauerstoff Spezies) sowie ein enzymatischer Abbau durch Matrix Metalloproteinasen statt [75].

2.5. Integrine

Bei den Integrinen handelt es sich um eine Familie von transmembranären Glykoproteinen, die nicht-kovalent gebundene Heterodimere ausbilden. Aus 18 alpha und 8 beta Untereinheiten können 24 bei Säugetieren bekannte α/β -Integrine gebildet werden [76]. Je nach alpha/beta Zusammensetzung resultieren unterschiedliche Substrataffinitäten. Dabei kommt die $\beta 1$ Untereinheit in 12 und die αV Untereinheit in fünf Integrinen vor.

Zu den Erkennungsmustern gehört die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) wie auch die LDV-Sequenz (Leucin-Asparaginsäure-Valin). Fibronektin ist ein klassischer Vertreter dieser RGD-beihaltenden EZM-Bestandteile [77].

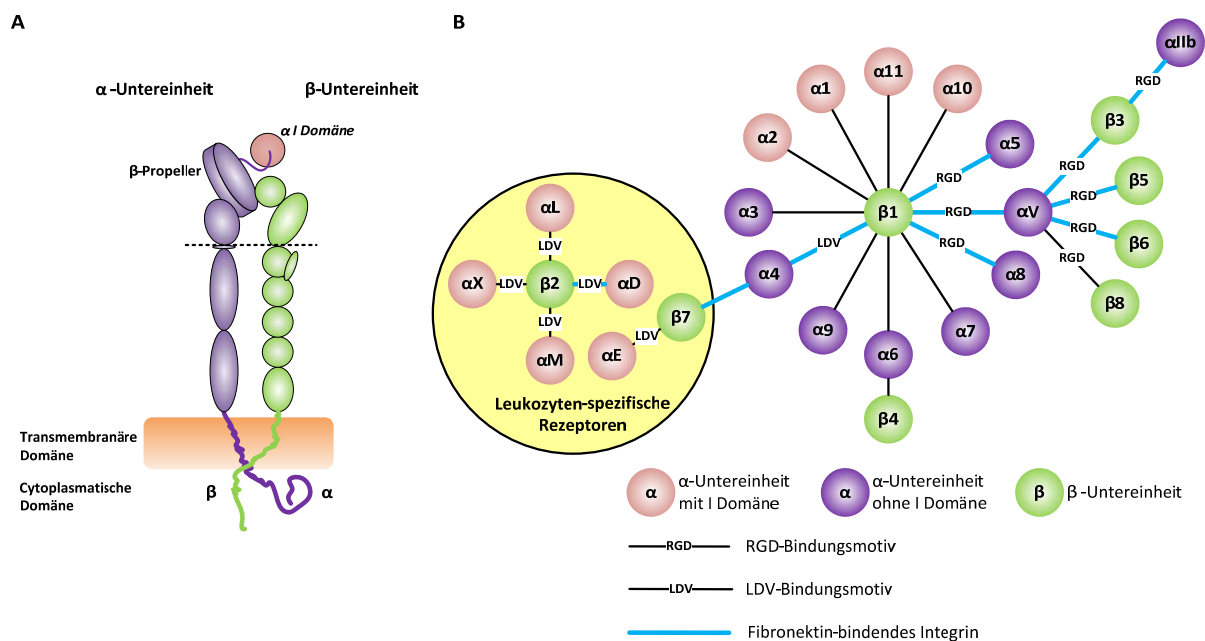


Abbildung 11 Schematischer Integrinaufbau und Bildungsschlüssel der humanen Integrine

A Zu sehen ist der grundlegende Aufbau eines Integrin Heterodimers, bestehend aus α - und β -Untereinheit. Am β -Propeller der α -Untereinheit befindet sich bei einigen Integrinen noch die α I Domäne, welche zu einer veränderten Signalisierung führt. Hier interagieren Liganden nicht mehr direkt mit der β -Untereinheit, sondern mit der α I Domäne, welche mit ihrer Verbindung zum β -Propeller die entsprechende Bindungsstelle der β -Untereinheit besetzt.

B Eingezeichnet in den Bildungsschlüssel der 24 bekannten humanen Integrine ist das Vorkommen der beiden klassischen Bindungsmotive RGD und LDV. Zusätzlich hervorgehoben sind die Fibronektin-bindenden Integrine. α -Untereinheiten, die eine α I Domäne besitzen, sind gesondert gekennzeichnet.

Basierend auf [77–79].

Integrine können als Sensoren fungieren und Informationen über potentielle Adhäsionspartner im Rahmen der Outside-In Signalisierung an die Zelle übermitteln. In

umgekehrter Richtung dienen sie als Adhäsionsmoleküle. Da die Integrine keine unmittelbare Verbindung zum Aktincytoskelett besitzen, setzt eine kraftschlüssige Verbindung eine intrazelluläre Anlagerung von ihrerseits Actin-bindenden Proteinen voraus. Aktiviert, zum Beispiel über eine Bindung von Talin an die intrazelluläre Domäne der β -Untereinheit, findet eine Konformationsänderung der beiden Untereinheiten statt, die zu einer Erhöhung der Bindungsfähigkeit führt. Binden nun einzelne Integrine oder kleinere Cluster von Integrinen an Strukturen der Extrazellulären Matrix, führt dies über weitere Signalkaskaden zu einer Verstärkung der intrazellulären Bindung und Rekrutierung zahlreicher weiterer Integrine, die so größere Cluster bilden [80]. Im Rahmen dieser Signalkaskaden bilden sich fokale Adhäsionskomplexe unter anderem mit Vinculin sowie der Fokalen Adhäsionskinase. Diese sind nicht direkt mit den Integrinen verbunden, aber über deren Bindung an Talin [81].

Die intrazelluläre Anlagerung von Molekülen wird durch die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne gesteuert [78].

Die Qualität der Integrin-vermittelten Bindung zwischen Zelle und Substrat lässt sich bezüglich zweier Parameter steuern. Dies ist zum einen die Affinität, also die Bindungsfähigkeit jedes einzelnen Integrins, und zum anderen die Avidität, die sich über die Anzahl der an der Bindung beteiligten Integrine beeinflussen lässt. So kann die schieere Menge mittelmäßig bindender Integrine eine hohe Gesamtbindung realisieren.

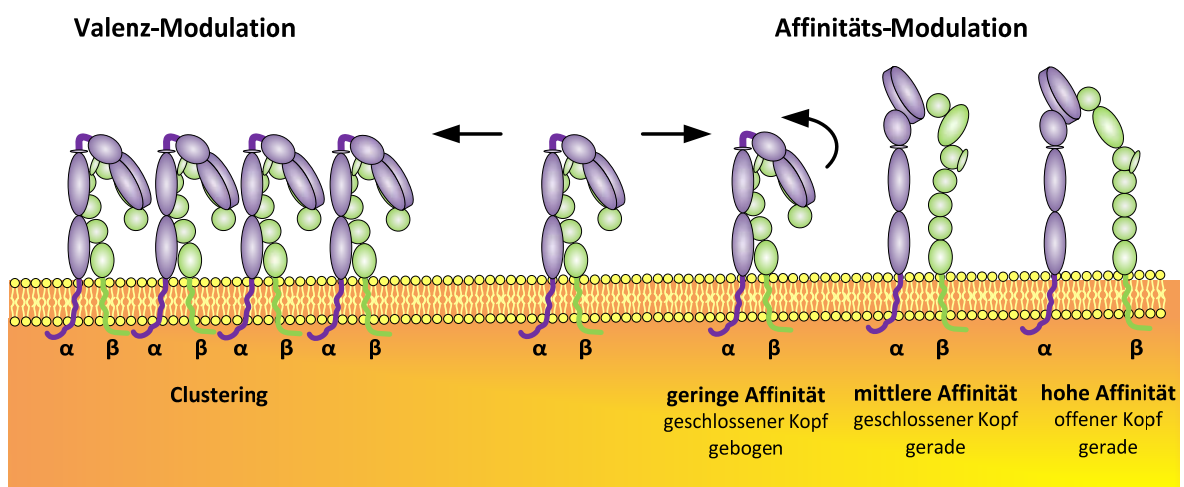


Abbildung 12 Modulation der Integrinbindung

Die Qualität einer Integrin-vermittelten Bindung lässt sich bezüglich zweier Parameter steuern. Zum einen ist dies die Quantität der Integrinbindungen. Im Zuge des Clusterings werden zahlreiche Integrine an eine Stelle der Zellmembran rekrutiert und addieren sich zu einer Gesamtadhäsion, der Bindungsavidität. Man spricht dabei auch von der Valenz-Modulation. Jedes einzelne Integrin kann darüber hinaus in seiner eigenen Bindungsstärke, also seiner Affinität beeinflusst werden. Dies kann intrazellulär durch Phosphorylierung und Anlagerung weiterer Proteine an der cytoplasmatischen Domäne geschehen oder auch extrazellulär durch Superagonisten wie dem Mn^{2+} . Aus [78].

Extrazellulär kann die Affinität der Integrine auch durch die zweiwertigen Ionen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} gesteuert werden. Die Effekte der Ionen sind dabei zum Teil integrinspezifisch. Während Magnesium generell zu einer Aktivierung führt, ist der Calciumeffekt konzentrationsabhängig. Hohe Calciumkonzentrationen in Abwesenheit von Magnesium besitzen beim $\alpha V\beta 3$ Integrin einen inhibierenden Effekt, ebenso beim Integrin $\alpha IIb\beta 3$. Hier können jedoch niedrige Calciumkonzentrationen zu einer verstärkten Ligandenbindung führen. Mangan hat eine Sonderstellung, ähnlich wie die Integrinerkennungssequenz RDG wirkt es superaktivierend auf die Integrine. Wenngleich nicht klar ist, ob die benötigten Konzentrationen physiologisch überhaupt erreicht werden können, wird die Manganstimulation in in vitro Experimenten als Stimulationskontrolle verwendet. Es wird vermutet, dass Mangan sich an der ADMIDAS (adjacent to metal ion-dependent site) der βI Domäne anlagert, wodurch das Calcium verdrängt wird [78,82–84].

Die Abhängigkeit der Adhäsionsmoleküle von zweiwertigen Ionen wird auch in der Zellkultur ausgenutzt, wenn im Rahmen des Passagierens die Zellen durch Zugabe von Chelatbildnern wie EDTA abgelöst werden.

Neben der statischen Adhäsion und der Zellzyklusregulation besitzen die Integrine eine bedeutende Rolle bei der Migration. Zum einen realisieren sie die namensgebende Integrierung von Zytoskelett und EZM, welche zur Kraftkopplung zwingend notwendig ist. Zum anderen stellt die Integrin-Signalisierung einen der Ausgangspunkte für die Rac, Rho und Cdc42 vermittelte Ausbildung von Lamellipodien dar. Die resultierende Migrationsgeschwindigkeit ist von der Integrinexpression wie auch der Substratkonzentration abhängig. Dabei führen mittlere Expressionen wie auch Konzentrationen zu höchstmöglicher Geschwindigkeit, da die Zelle genug Verbindungen zur Kraftübertragung ausbauen kann, aber eben auch nicht unnötig stark adhäriert [85,86].

2.6. Syndecane

Die Syndecane sind membrangebundene Proteoglykane, die bestehend aus Kernprotein und langen extrazellulären Glykosaminoglykanketten u.a. als membranäre Rezeptoren für EZM Strukturen wie das RGD Motiv des Fibronektins, Wachstumsfaktoren wie VEGF und andere lösliche Moleküle dienen. Im Gegensatz zu den Integrinen kommen sie ausschließlich in Form von Homodimeren vor. Es sind vier Syndecane bekannt, wobei das Syndecan-4 die größte Relevanz für Adhäsions- und Migrationsvorgänge im Rahmen der Metastasierung besitzt [87].

Eine Syndecan-4 Aktivierung durch Liganden geht mit einer Oligomerisierung des Rezeptors und einer Einwanderung in die Lipid Rafts einher, von wo aus intrazelluläre Signalisierungskaskaden ausgelöst werden können [20,88].

Syndecan-4 ist auch in größerem Umfang an der zellulären Adhäsion beteiligt. Zum einen kann es über das Protein α -Actinin selber eine Bindung zwischen Bestandteilen der EZM und dem Aktincytoskelett ausbilden. Zum anderen spielt es eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Integrin-vermittelten Adhäsion [88].

An die V-Region des Syndecan-4 bindet das Membranlipid Phosphatidylinositol 4,5 biphosphat ($\text{PtdIns}_{4,5}\text{P}_2$). Dieser Komplex kann zusammen mit der Proteinkinase C alpha einen ternären Komplex ausbilden. Stabilisiert durch $\text{PtdIns}_{4,5}\text{P}_2$ bilden sich Oligomere des Syndecan-4 aus, welche Voraussetzung für eine PKC alpha Aktivierung sind [89,90]. Interessanterweise scheint dieser Weg der PKC alpha Aktivierung nicht Calcium-abhängig zu sein [87].

Die aktivierte PKC alpha ist ihrerseits in der Lage zusammen mit der Talin-Bindung das Integrin zu aktivieren und somit letztendlich ein Integrin-Clustering zu verstärken [76].

Umkehren lässt sich dieser Effekt mittels einer Phosphorylierung des Syndecan-4 am Serin 179 durch die Proteinkinase C delta. Das phosphorylierte Syndecan-4 kann kein $\text{PtdIns}_{4,5}\text{P}_2$ binden, somit auch nicht oligomerisieren und in der Konsequenz nicht die Proteinkinase C alpha aktivieren. Chaudhuri et. al. konnten für bovine Endothelzellen zeigen, dass diese Aktivität der Proteinkinase C delta durch LysoPC induziert wird [91].

In der Literatur finden sich abweichende Angaben für die Stelle der Serin-Phosphorylierung. Dies ist höchstwahrscheinlich Speziesunterschieden der jeweils

zugrunde liegenden Organismen geschuldet. Die in dieser Arbeit verwendeten humanen und murinen Zellen besitzen ein aus 198 Aminosäuren bestehendes Syndecan-4, welches an Position 179 ein phosphorylierbares Serin besitzt [92,93].

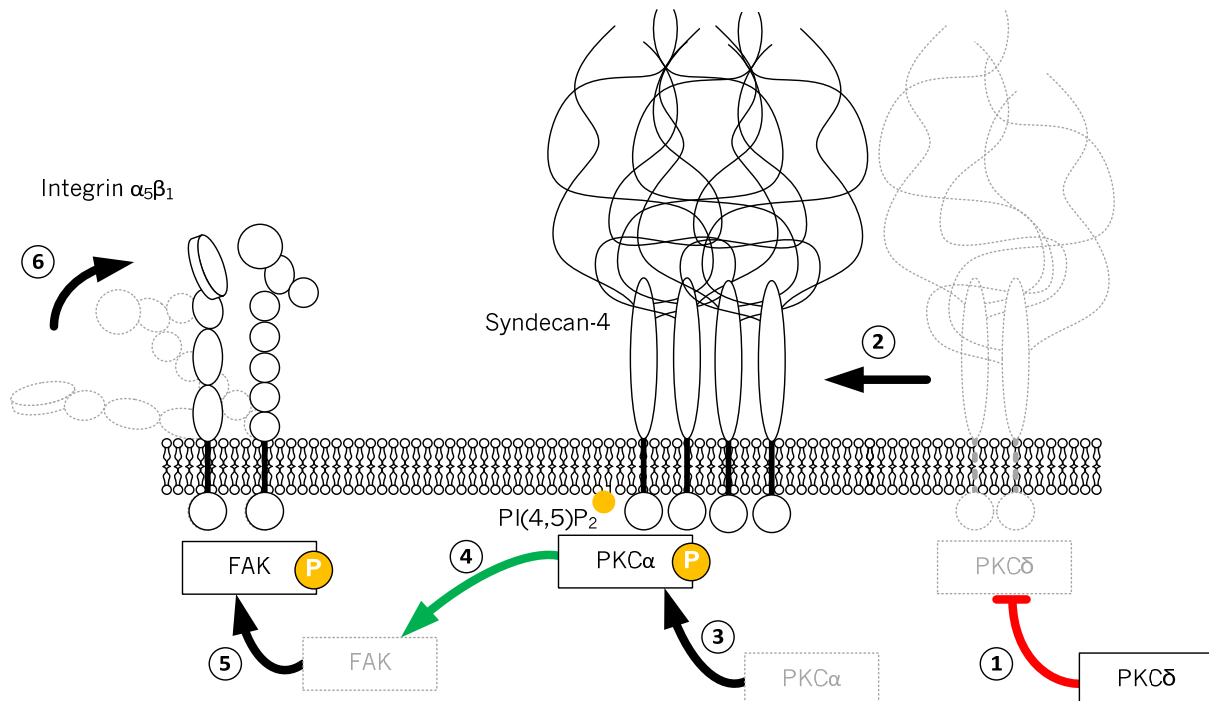


Abbildung 13 Schematischer Ablauf der Syndecan-induzierten Integrinaktivierung

Eine inaktive Proteinkinase C-delta (PKC δ) vorausgesetzt (1), findet als Konsequenz einer Syndecan-4 Stimulation eine durch das Membranlipid Phosphatidylinositol 4,5 biphosphat (PtdIns4,5P₂) stabilisierte Oligomerisierung des Syndecan-4 statt (2). Zusammen mit der Proteinkinase C alpha (PKC α) (3) bildet sich ein ternärer Komplex, der die Aktivierung der PKC-alpha zur Folge hat (4). Die aktivierte PKC-alpha vermittelt über die Talinbindung die Rekrutierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) (5) und aktiviert somit das Integrin (6). Basierend auf [76]

2.7. Proteinkinase C

Proteinkinasen, als Phosphatgruppen übertragende Enzyme fungieren als molekulare Schalter. Im menschlichen Genom sind über 450 verschiedene Proteinkinasen codiert. Für die Adhäsion und Migration von Interesse ist die Proteinkinase C Familie, im Besonderen die schon im Zusammenhang mit der Syndecan-induzierten Integrin-Aktivierung genannten Isoformen PKC-alpha und PKC-delta. Die PKC-alpha verstärkt dabei Integrin-Bindungen, während die PKC-delta einer Adhäsion entgegen wirkt.

Die Enzyme der PKC-Familie sind Lipid-Secondmessenger-reguliert und im aktivierten Zustand Membran-assoziiert. Insgesamt sind acht verschiedene Isoformen der PKC

bekannt, die sich anhand der vorhandenen Domänen in die folgenden drei Subgruppen unterteilen lassen: konventionelle PKC (cPKC), neuartige PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). Als Phosphatgruppendonator fungiert für alle Isoformen ATP, welches im Bereich der C-terminalen Kinasedomäne bindet. Unmittelbar benachbart befindet sich auch die Substratbindungsdomäne. Generell zeichnen sich die Proteinkinase C Isoformen durch eine große Substratvariabilität aus. Sie phosphorylieren Proteine an der Hydroxygruppe des Serins und des Threonins. Die Bedeutung der PKC in neoplastischen Erkrankungen deutete sich durch die Entdeckung an, dass die als Tumorpromotor geltenden Phorbolster unspezifische Aktivatoren aller PKC-Isoformen darstellen [28].

Im inaktiven Zustand bindet ein Pseudosubstrat-Motiv, der am N-terminalen Ende befindlichen regulatorischen Domäne, an die Substratbindungsstelle und sorgt somit für eine Autoinhibition [94]. Durch Bindung von Aktivatoren an die regulatorische Domäne wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch die katalytische Domäne freigegeben wird. An dieser Stelle existieren die Unterschiede der einzelnen Subgruppen. Während bei den Mitgliedern der konventionellen PKC (PKC-alpha, PKC-beta, PKC-gamma) eine Bindungsstelle für Diacylglycerol und Calcium existiert, sind die Mitglieder der neuartigen PKC (PKC-delta, PKC-epsilon, PKC-eta, PKC-theta) in Ermangelung einer Calcium-Bindungsstelle nicht Calcium-sensitiv. Die atypischen PKC (PKC-zeta, PKC-lambda) unterscheiden sich im Bereich der regulatorischen Domäne noch einmal von den beiden anderen Gruppen, sind aber im Zusammenhang dieser Arbeit nicht weiter von Relevanz [95].

Die initiale Aktivierung der im Cytosol befindlichen PKC-Isoenzyme erfolgt durch Phosphorylierung. Die so konformativ veränderten Enzyme bewegen sich anschließend zur Membran [96,97]. Eine entscheidende Phosphorylierungsstelle der PKC-alpha ist das Serin 657. Die Aktivierung stabilisiert darüber hinaus einen Phosphatase-resistenten Zustand, wodurch das Enzym länger aktiv bleibt [98].

Die Aktivierung der PKC-delta durch Phosphorylierung erfolgt u.a. am Threonin 507. Allerdings kann die PKC-delta im Gegensatz zu anderen Isoenzymen der PKC-Familie auch ohne diese Phosphorylierung der Aktivierungs-Schleife in vitro-Aktivität aufweisen [99].

2.8. Fokale Adhäsionskinase

Die Fokale Adhäsionskinase ist eine Tyrosinkinase, die an einer Vielzahl von Prozessen innerhalb von neoplastischen Zellen beteiligt ist. Dabei gibt es Kinase-abhängige, wie auch Kinase-unabhängige Funktionen.

Zu den Kinase-unabhängigen Funktionen zählt die Beteiligung an der Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition. Dabei erzeugt die FAK intrazellulär ein Gerüst für die Endophilin A2 Phosphorylierung, was zu einer verstärkten Transkription von EMT-induzierenden Faktoren führt. Es wird vermutet, dass die FAK darüber hinaus an einer E-Cadherin-Internalisierung beteiligt ist, was wie zuvor beschrieben zu einer Auflösung der Zell-Zell-Kontakte führt.

Durch die Bindung an den ARP2/3 Komplex hat die FAK Einfluss auf die Aktin-Polymerisation. Auch dies geschieht in einer Kinase-unabhängigen Form.

Aufgebaut ist die FAK aus der FERM-Domäne am N-terminalen Ende, der FAT-Domäne (Focal Adhesion Targeting) am C-terminalen Ende sowie der in der Mitte liegenden Kinase-Domäne. Die ARP2/3 Bindung wird dabei von der FERM-Domäne ausgeübt, während die FAT-Domäne die Talin-Bindung vermittelt [100]. Die FAK ist somit in der Lage, unabhängig von der beta-Untereinheit der Integrine, eine Talin Bindung auszuüben [101]. Darüber hinaus ist die FAK maßgeblich an der Integrin-Aktivierung beteiligt und erhöht somit die Kraft der Fokalen-Adhäsionsstellen [102].

Analog zu den Enzymen der PKC-Familie liegt auch die FAK in einer autoinhibierten inaktiven Konformation vor, die durch Phosphorylierung oder auch Anlagerung von Lipid-Secondmessengern in eine aktive Form überführt werden kann [103].

Die Phosphorylierung des Tyrosins 925 ist dabei bedeutend für die Regulation von Adhäsion und Migration. So führt eine reduzierte Phosphorylierung zu einer Verringerung von Fokalen Adhäsion [104].

2.9. Aktuelle Ansätze der Therapie von Metastasen

Metastasierung stellt die dominante Ursache von Tumormortalität dar [105].

Auf den ersten Blick mag dies erstaunlich wirken wenn man bedenkt wie ineffizient dieser Prozess an sich ist. So bildet sich doch aus 60 Millionen durch den Primärtumor sezernierten Zellen nur eine einzige Metastase. Allerdings kristallisiert sich heraus, dass die Ausbildung von Metastasen nicht nur ein unweigerlicher Begleitprozess in der Entstehung von soliden Tumoren ist, sondern auch eine Komplikation der jeweiligen antineoplastischen Therapie darstellen kann [55]. So ist die Radiotherapie per se mutagen. Eine richtige Dosis vorausgesetzt, ist die DNA der Zellen im Anschluss jenseits jeglicher Reparaturaussicht zerstört. Bei zu geringer Dosis können sich aber höchst aggressiv mutierte Zellen ausbilden, die zusätzlich im entzündeten Randbereich der Bestrahlung eine ideale Quelle an Wachstumsfaktoren finden, welche unter Umständen überhaupt erst eine EMT induzieren [106]. Diagnostische Biopsien wie auch das kurative Resezieren von Tumoren bedingen zwangsläufig eine Verletzung von Geweben und Gefäßen. In der Folge lassen sich im Anschluss an diese chirurgischen Eingriffe erhöhte Mengen an zirkulierenden Tumorzellen im Blut finden [55]. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass den klassischer Weise verwendeten Anästhetika wie Propofol und Fentanyl eine immunsuppressive Wirkung zugesprochen wird, die die Überlebensrate der beim chirurgischen Eingriff entstandenen zirkulierenden Tumorzellen, zu Ungunsten des Patienten, deutlich erhöhen können [107].

Die antineoplastische Pharmakotherapie beruht in der Ausnutzung metabolischer Unterschiede zwischen dem Tumor Gewebe und dem restlichen Organismus. Dies sind zum Beispiel eine erhöhte Zellproliferation, verstärkt aktivierte Signalisierungskaskaden, aber auch eine Empfänglichkeit für Wachstumsfaktoren des ursprünglichen Heimatgewebes. Therapielimitierend sind dabei in den meisten Fällen unerwünschte Arzneimittelwirkungen die durch physiologisch sich ähnlich verhaltende Strukturen entstehen. Eine Konsequenz ist, dass es eben nicht die eine universelle antineoplastische Therapie gibt, sondern tumorindividuell und nach entsprechender Gendiagnostik sogar patientenindividuell therapiert wird. Doch auch hier können sich Metastasen als Nebenwirkung der Therapie bilden [108].

Betrachtet man nun die Metastasierung ergibt sich ein neuer Grad der Komplexität. Nicht nur können verschiedenartige Tumore Zellen in ihre Umgebung sezernieren, die resultierenden Zellen durchlaufen darüber hinaus zahlreiche morphologische und metabolische Wandlungen. Zu nennen sind hier die EMT und die MET, aber auch mögliche zwischenzeitliche inaktive Ruhephasen [109]. Die resultierende Variabilität stellt eine der größten Herausforderungen bei der Suche nach einer antimetastatischen Therapie dar.

Theoretisch betrachtet stellt dabei die metastatische Kaskade die Blaupause für mögliche antimetastatische Therapieansätze dar. Verhindert man die EMT, existiert weiterhin nur ein solider, u.U. resezierbarer Tumor. Ist dies nicht möglich sollte verhindert werden, dass die migrierende Tumorzelle ein Gefäßsystem erreicht und zur zirkulierenden Tumorzelle wird. Ist auch dies nicht möglich, sollte der schützende Thrombozytenüberzug sowie die Adhäsion am Gefäßendothel inhibiert werden. Scheitert auch dies, besteht ein Ansatz darin, das Angebot an Wachstumsfaktoren zu minimieren, und somit die Entstehung von metastatischen Nischen zu unterbinden.

In der Vaskularisierung von Geweben spielt die VEGF (vascular endothelial growth factor) Proteinfamilie eine bedeutende Rolle. Ausgesendet von hypoxischem Gewebe bewirken sie eine Migration und erhöhte Proliferation von Endothelzellen mit der Konsequenz der Gefäßneubildung, begleitet von einer temporär erhöhten Permeabilität des Gefäßendothels [110,111].

In der Therapie von soliden Tumoren, begleitend zu anderen Chemotherapeutika, wird unter anderem der humanisierte VEGFA-Antikörper Bevacizumab (Avastatin®) sowie das VEGF-Rezeptor 1 und 2 Fusionsprotein Aflibercept (Zaltrap®) eingesetzt [111]. Aflibercept und Bevacizumab haben dabei eine Zulassung für das metastasierende Kolorektalkarzinom erhalten. Bevacizumab ist darüber hinaus unter anderem noch für die begleitende Behandlung von metastasierendem oder rezidivierendem nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, metastasiertem Nierenzellkarzinom und mit Einschränkungen für das metastasierte Mammakarzinom zugelassen [112,113].

Neben dem Abfangen der VEGF-Moleküle durch Antikörper, kann auch in die intrazelluläre VEGF Signalisierung durch Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren wie Sorafenib (Nexavar®), Sunitinib (Sutent®) und andere eingegriffen werden [114,115].

Anzumerken ist allerdings, dass das Gesamtüberleben in den wenigsten Studien bedeutend erhöht wurde, nur zum Teil das progressionsfreie Überleben [108,111,116]. Dies ist sicherlich ein Hinweis darauf, dass sich weiterhin Metastasen ausbilden können, oder sich schon lange vor Beginn der Therapie ausgebildet haben. Der Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib hat im Tiermodell sogar einen prometastatischen Effekt [117].

Die genauen Ursachen sind Gegenstand der Forschung, bislang werden folgende Probleme der VEGF-Therapie postuliert:

Nicht für jede Metastasierung ist eine umfangreiche Neubildung von Gefäßen notwendig. Gerade etablierte Tumore sind zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon gut vaskularisiert [116]. Auch verfügen Zielorgane der zirkulierenden Tumorzellen wie Lunge und Gehirn bereits über ein sehr detailliert ausgebildetes Kapillarbett [116]. Somit ist die Einschränkung der Gefäßneubildung sicherlich hemmend für das Wachstum des Primärtumors, für die Aussendung von Zellen aber vermutlich bestenfalls nur verzögernd. Allerdings bedingt die Hemmung der Gefäßneubildung auch eine schlechtere Erreichbarkeit der Neoplasie für Zellen des Immunsystems. Problematisch erscheint dies sicherlich gerade im Hinblick auf ortsferne Mikrometastasen. Durch Unterbindung der Vaskularisierung bleibt darüber hinaus weiterhin die Hypoxie bestehen, welche vermittelt über eine Adenosinausschüttung einen zusätzlich immunsuppressiven Effekt hat [118]. Auch existieren neben VEGF noch weitere Wachstumsfaktoren für die Gefäßneubildung, sodass die Kompensation der inhibierten VEGF-Signalisierung ihrerseits überhaupt erst eine EMT in den Zellen der Neoplasie induzieren kann.

Beim malignem Melanom wie auch dem papillärem Schilddrüsenkarzinom verläuft einer der EMT-induzierenden Wege über die Serin-Threonin-Kinase BRAF [119]. Diese ist auch in 40 % der Melanomzellen mutiert [120]. Der Inhibitor der Proteinkinase BRAF Vemurafenib (Zelboraf®) ist zugelassen zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit BRAF^{V600E} Mutation-positivem nicht resezierbarem oder metastasiertem Melanom [121]. Aktuelle Studien legen nahe, dass Vemurafenib zu einer Hemmung der Migration und Metastasierung von BRAF-mutiertem Melanomzellen führt. Allerdings gilt dies nur für Vemurafenib-sensitive Zellen. In Vemurafenib-resistenten Zellen zeigt sich sogar eine verstärkte Aktivierung der bei der Migration beteiligten GTPasen Rac

und RhoA und einer einhergehenden verstärkten Invasivität.[120,122] Bei den meisten Patienten scheint Vemurafenib initial zu wirken. Es treten aber auch innerhalb eines Jahres Rezidive auf [123].

Ein Ansatz im Hinblick auf metastatische Nischen sind Antikörper gegen den Osteoklasten aktivierenden Faktor RANKL (Receptor-activated nuclear factor kappa-B ligand). Im Falle von Knochenmetastasen entsteht meist sehr schnell ein Teufelskreis aus Knochenabbau, Wachstumsfaktor-Synthese als Gegenregulation, Anziehung weiterer Tumorzellen durch Wachstumsfaktoren und verstärkter Synthese von Knochenabbau-induzierenden RANKL durch Tumorzellen [108]. Studien, die mit dem humanen Antikörper Denosumab (XGEVA®) an Patienten mit Knochenmetastasen durchgeführt wurden, konnten eine Überlegenheit von Denosumab verglichen mit Bisphosphonaten bezüglich des Auftretens von Komplikationen des Skelettsystems zeigen [124].

Direkt auf die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ sollte die Therapie mit dem peptidischen Integrin Inhibitor Cilengitide abzielen. Wenngleich dieser Wirkstoff im Osteosarkom-Mausmodell eine bedeutende Reduktion der Metastasierung aufzeigte, scheiterte der Wirkstoff, eingesetzt bei Patienten mit Glioblastoma, in klinischen Studien der Phase 3 [125]. Dennoch scheinen die Integrine eine vielversprechende Zielstruktur zu sein. Das Scheitern von Cilengitide ist sicherlich auch der kurzen in vivo Halbwertszeit zuzusprechen [108].

Das generell bei hospitalisierten Tumorpatienten im Rahmen der antikoagulativen Prophylaxe eingesetzte Antikoagulans Heparin zeichnet sich, über seine Interaktion mit den Enzymen der Gerinnungskaskade hinausgehend, durch eine Inhibition von Adhäsionsmolekülen der Selektin- und Integrin-Familie aus [126]. Eine Anzahl klinischer Studien legen einen möglichen Zusammenhang der Heparin-Gabe mit einem Überlebensvorteil der Patienten nahe. Durch die teilweise kontroversen Ergebnisse lässt sich hierbei noch keine abschließende Bewertung treffen [127].

Außerdem existieren Ansätze Heparin als Grundlage von Nanopartikeln zu verwenden. Dabei wird Doxorubicin mittels der EDC/NHS Technologie kovalent über Gallensäuren an ein Heparingerüst gebunden. Die resultierende nanopartikuläre Arzneiform weist

im Tiermodell einen antimetastatischen Effekt auf und führt zu einer Reduktion klassischer EMT-Marker [128].

Thrombozyten stellen einen weiteren Ansatzpunkt in der antimetastatischen Therapie dar. Sie bilden nicht nur einen Überzug für die zirkulierenden Tumorzellen, der vor den Scherkräften der Blutgefäße und der Erkennung durch das Immunsystem schützt. Durch exprimierte Oberflächenstrukturen und sezernierte Faktoren wie unter anderem Lysophosphatidsäure wird ein komplexes Interaktionsfeld mit den Tumorzellen generiert [129]. Studien zeigen, dass die langfristige und regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure (Aspirin®) eine Reduktion der Inzidenz für das kolorektale Karzinom bewirkt [130]. So erscheinen auch Forschungen mit den weiteren Vertretern der Gruppe der NSAR durchaus plausibel.

Generell wird verstärkt Forschungsarbeit darein investiert etablierte Arzneistoffe auf ihre antimetastatische Wirksamkeit zu überprüfen. Gerade aus einem gesundheitsökonomischen Blickwinkel erscheint dies als sehr sinnvoll. So existieren ein wohlbekanntes Sicherheitsprofil sowie eine gute Verfügbarkeit von Arzneiformen in pharmazeutischer Qualität. Patienten könnten hier im Rahmen der translationalen Medizin sehr schnell von neuen Erkenntnissen profitieren.

Ein aktuelles Beispiel dafür ist die Kombination von Koffein und Valproinsäure mit antimetastatischer Wirksamkeit beim orthotopischen Osteosarkom im Mausmodell. Koffein stört dabei den Zellzyklus und Valproinsäure fungiert als Histondeacetylase-Hemmstoff [131]. Ein weiteres Beispiel ist der antiproliferative und antimetastatische Effekt von Metformin beim Gallengangskarzinom, vermittelt durch Störung der Proteindelokalisierung unter anderem von NF- κ B [132].

Trotz aller Ansätze muss resümiert werden, dass gegenwärtig keine pharmakotherapeutische Option existiert, um direkt in den metastatischen Prozess von Tumorzellen einzugreifen.

2.10. Ziel dieser Arbeit

Die Metastasierung stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, der sich aufgrund der Vielzahl an beteiligten Strukturen, Molekülen und anderweitiger Faktoren in seiner Gesamtheit nur schwer, bis nahezu kaum, im Modell zeigen lässt. Gerade dies bedingt die schwierige Suche nach geeigneten Substanzen zur pharmakologischen Interferenz mit der Metastasierung. So können hoffnungsvolle Substanzen aus Zellversuchen leider zu oft den erwarteten Effekt im Organismus nicht mehr zeigen.

Umso attraktiver ist es den anderen Weg einzuschlagen, nämlich eine deutlich antimetastatisch wirkende Substanz aus dem Tiermodell vorliegen zu haben und sich den zu Grunde liegenden Wirkmechanismen nähern zu können.

Frühere Untersuchungen konnten die antimetastatische Wirksamkeit von LysoPC, als Hauptmetabolit von gesättigten Phosphatidylcholin-haltigen Liposomen, in vivo wie auch in vitro bescheinigen. Die Applikation von gesättigtem LysoPC führt zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran zu Gunsten der jeweils konjugierten Fettsäure sowie einer elektronenmikroskopisch detektierbaren strukturellen Membranveränderung der behandelten Tumorzellen, die zeitgleich mit einer reduzierten Integrinfunktionalität einhergeht.

Trotz dieser sehr interessanten Ergebnisse fehlt bisher die funktionelle Verbindung dieser Effekte, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden soll.

Im Fokus liegen dabei Einflüsse auf die Membranfluidität, die Expression und Funktionalität von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sowie die membranassoziierten Komponenten der Integrin vermittelten Adhäsion und Migration. Dabei ist eine Zielsetzung die Beantwortung der Frage, ob LysoPC über den biophysikalischen Effekt hinaus auch Signalisierungswege beeinflusst und gegebenenfalls, um welche es sich dabei handelt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemische und biologische Arbeitsstoffe

Substanz	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid, MTT	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Bacillo [®] AF	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Bovines Serum-Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY [®] ton	Schärfe Systems GmbH, Reutlingen
Cell Extraction Buffer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
CO ₂	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
DPBS ohne Calcium und Magnesium, steril	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
EDTA-Lösung (0,02 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 96 % (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt
FACS Clean [™]	BD Biosciences AG, Heidelberg
FACS Flow [™]	BD Biosciences AG, Heidelberg
FACS Rinse [™]	BD Biosciences AG, Heidelberg
Fluoromount [™] Mounting-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Gigasept® Instru AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Isopropanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kupfersulfat-pentahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Laemmlli-Probenpuffer, 2x Konzentrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Melsept® SF	B. Braun AG, Melsungen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Grüssing GmbH, Filsum
Natriumcitrat-dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, NL
Natriumhydroxid	Grüssing GmbH, Filsum
Natronlauge, 1 M	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 I.E./mL, 10 mg/mL)	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI-1640® Nährmedium	PAN Biotech GmbH, Aldenbach
Salzsäure, 1 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween™ 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

3.1.2. Primäre Antikörper

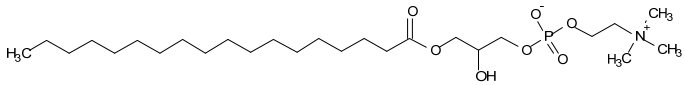
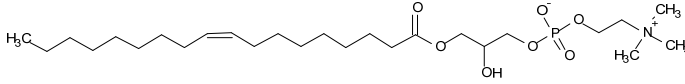
Zielstruktur	Organismus	Herstellerbezeichnung
pAkt1 (Thr308)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-135650
FAK (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-558
pFAK (Tyr-925)	Ziege	Santa Cruz - sc-11766
G2A (A-20)	Ziege	Santa Cruz - sc-23810
GPR4 (N-13)	Ziege	Santa Cruz - sc-70289
GPR68 (H-75)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-98437
PKC α (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-208
PKC α (H-7)	Maus	Santa Cruz - sc-8393
pPKC α (Ser 657)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-12356-R
PKC δ (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-937
pPKC δ (Thr 507)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-11770-R
Syndecan-4 (H-140)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-15350
pSyndecan-4 (Ser 179)	Ziege	Santa Cruz - sc-16852
Vinculin (H-10)	Maus	Santa Cruz - sc-25336
β -actin (C-4)	Maus	Santa Cruz - sc-47778
β -actin (N-21)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-130656
β -catenin (H-102)	Kaninchen	Santa Cruz - sc-7199

3.1.3. Sekundäre Antikörper

Detektionskonjugat	Epitop	Organismus	Herstellerbezeichnung
CFL647	Anti-goat IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-362285
FITC	Anti-goat IgG	Rabbit	Santa Cruz - sc-2777
FITC	Anti-goat IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-2024
FITC	Anti-rabbit IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-2090
FITC	Anti-rabbit IgG	Goat	Santa Cruz - sc-2012
HRP	Anti-goat IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-2020
HRP	Anti-mouse IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-2314
HRP	Anti-rabbit IgG	Goat	Santa Cruz - sc-2004
TR	Anti-mouse IgG	Donkey	Santa Cruz - sc-2785

3.1.4. Lysolipide

Alle verwendeten Lysolipide wurden von der Firma Avanti Polar Lipids Inc. aus Alabaster, AL, USA bezogen.

Lipid	IUPAC-Bezeichnung, Strukturformel	Masse pro mL 180 mM Stocklösung (g)
C18:0- Lyso-PC	1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin 	0,0942
C18:1- Lyso-PC	1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholin 	0,0938

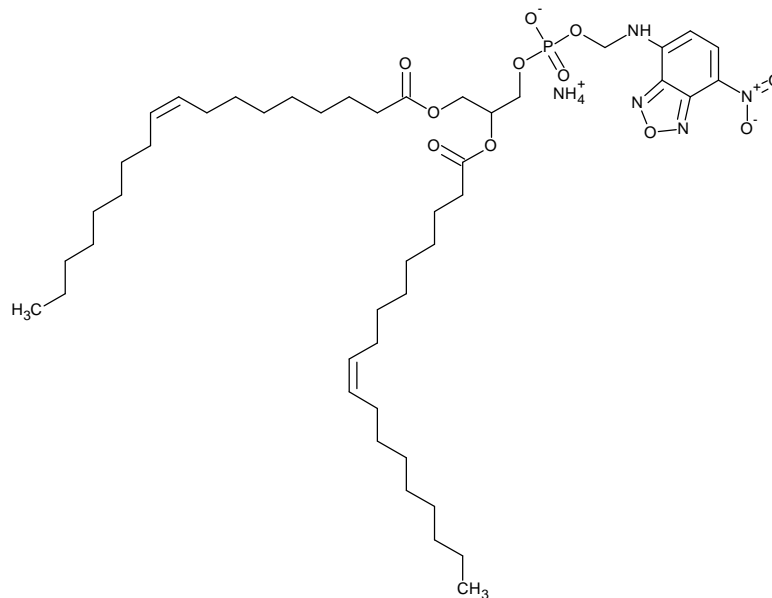
3.1.5. Fluoreszenz markierte Lipide

Alle verwendeten Lipide wurden von der Firma Avanti Polar Lipids Inc. aus Alabaster, AL, USA bezogen.

Lipid IUPAC-Bezeichnung, Strukturformel

18:1 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-

NBD PE benzoxadiazol-4-yl)



3.1.6. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blocking-Lösung	Magermilchpulver	5,0 g
	TBS-T	ad 100,0 mL
Boratpuffer pH 8,8	Borsäure	618 mg
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 M NaOH	
CaCl ₂ Stammlösung	Calciumchlorid	0,111 g
	Aqua millipore	ad 10,0 mL
Calcium Assay Puffer A	HEPES Stammlösung	2,5 mL
	Natriumchlorid	0,73 g
	Kaliumchlorid	0,037 g
	Di-Natriumhydrogenphosphat	0,014 g
	Glucose	0,1 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Calcium Assay Puffer B	MgCl ₂ Stammlösung	1 mL
	CaCl ₂ Stammlösung	1 mL
	BSA	0,1 g
Elektrodenpuffer	Elektrodenpuffer 10x	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000 mL
Elektrodenpuffer 10x	Glycin	72 g
	TRIS-Base	15 g
	SDS	5 g
	Aqua millipore	ad 500 mL
Holotransferrin-Lösung (25 mg/mL)	Holotransferrin	125,0 mg
	Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/v)	5,0 mL

Material und Methoden

Kryo-Medium	FKS	50,0 mL
	DMSO	5,6 mL
Leupeptin-Stammlösung (5 mg/mL)	Leupeptin-hemisulfat	25 mg
	Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/v)	ad 5,0 mL
Lösung A (Peterson-Lowry)	Kupfersulfat-pentahydrat	0,5 g
	Natriumcitrat-Dihydrat	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Lösung B (Peterson-Lowry)	Natriumhydroxid	4,0 g
	Natriumcarbonat	20,0 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
Lösung C, Biuret-Reagenz (Peterson-Lowry)	Lösung A (Peterson-Lowry)	1,0 mL
	Lösung B (Peterson-Lowry)	49,0 mL
Lysepuffer	PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	34 µL
	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	500 µL
	Cell Extraction Buffer	10,0 mL
MgCl ₂ Stammlösung	Magnesiumchlorid	0,102 g
	Aqua millipore	ad 10,0 mL
MTT-Reagenz (5 mg/mL)	MTT	50,0 mg
	PBS-Puffer	ad 10,0 mL
Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/v)	Natriumchlorid	9,0 g
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Natriumdeoxycholat-Lösung (m/v)	0,3% Natriumdeoxycholat	300,0 mg
	Aqua millipore	ad 100,0 mL
Paraformaldehyd-Lösung (4%)	Paraformaldehyd	1,0 g

	Aqua dem.	25,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 M NaOH	
PBS-Puffer 20x	Kaliumchlorid	2,0 g
	Kaliumhydrogenphosphat	2,0 g
	Natriumchlorid	80,0 g
	di-Natriumhydrogenphosphat	12,6 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
PBS-Puffer pH 7,4	PBS-Puffer 20x	50,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
Pepstatin A-Stammlösung	Pepstatin A	10 mg
	Natriumchlorid-Lösung 0,9% (m/v)	ad 10 mL
PMSF-Stammlösung (0,3 mol/L)	PMSF	250 mg
	DMSO	4,783 mL
Proteinstandard-Lösung (0,2 mg/mL)	BSA	2,0 mg
	Aqua millipore	ad 10,0 mL
TBS	TBS 10x	100,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL
TBS 10x	Natriumchlorid	40,0 g
	TRIS-Base	6,060 g
	Aqua Millipore	ad 500,0 mL
	pH-Einstellung mit 1 M Salzsäure auf 7,3	
TBS-T	TBS 10x	100,0 mL
	Tween™ 20	2,0 mL
	Aqua millipore	ad 1000,0 mL

Material und Methoden

Transferpuffer	Transferpuffer 10x	100 mL
	Aqua millipore	ad 1000 mL
Transferpuffer 10x	Glycin	72,0 g
	TRIS-Base	15,0 g
	Aqua millipore	ad 500,0 mL
Trichloressigsäure 70% (m/m)	Trichloressigsäure	70,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 g
Triton [®] X-100-Lösung 1% (m/v)	Triton X-100	1,0 g
	Aqua millipore	ad 100,0 mL

3.1.7. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BioRad Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free™	Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany
CASY® cups	Schärfe System GmbH, Reutlingen
CytoOne® 6-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 24-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
CytoOne® 96-Well-Platte, TC-behandelt	Starlab GmbH, Ahrensburg
Deckgläser Stärke No. 1, rund	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Einmalkanüle Sterican 0.90 x 50 mm (gelb)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® (10 mL)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen Injekt® (20 mL)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Gel-Pipettenspitzen MultiFlex Round	Sorenson BioScience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Kryoröhrchen PP, mit Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mini-PROTEAN® TGX™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Objektträger Stärke ca. 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten, Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen (101-1000 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-10 µL), natur	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (1-200 µL), gelb	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (5 mL) Plastibrand®, natur	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Reagiergefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Material und Methoden

Röhrchen, 15 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 mL, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Roti®-PVDF Membran	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
Serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC Platte 24 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturflaschen, 250 mL, 75 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 50 mL, 25 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 550 mL, 175 cm ² , PS	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.8. Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugsystem BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim
Accu-Jet [®] pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysenwaage Mettler Toledo Classic Plus AB135-S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Sartorius basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
Badgefäß LAUDA ecoline 019	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
ChemiDoc [™] XRS+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ -Inkubator NuAire [™] DH AutoFlow	NuAire Inc., Plymouth, MN, USA
CO ₂ -Inkubator Thermo	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Durchflusszytometer BD FACSCalibur	BD Biosciences AG, Heidelberg
Einhängethermostat LAUDA ecoline E 100	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Epic [®] System	Corning Inc., Tewksbury, MA, USA
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Nikon A1R	Nikon GmbH, Düsseldorf
Laborschüttler KS-15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Laminar-Air-Flow-Werkbank Heraeus Herasafe HSP 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Laminar-Air-Flow-Werkbank Holten safe 2010	Heto-Holton A/S, Allerød, DK
Lichtmikroskop Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop Wilovert Standard HF/K	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG,

	Kelheim
Mehrfachdispenser HandyStep [®] electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep [®] S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (1 L)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (100 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (2 L)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (250 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (50 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messkolben BLAUBRAND [®] , Klasse A (500 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 1 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 10 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Messpipetten Klasse AS, 5 mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell and Blotting Module mit PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette [®] M4	Eppendorf AG, Hamburg
Multiskan [®] EX	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold
Multiwellreader POLARstar [™] OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Offenburg
PARAFILM [®] M	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Peleusball	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
pH-Meter S20 SevenEasy [™] pH	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Pinzetten, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette (10 µL) Research [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (10 µL) Transferpette [®] S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Research [®]	Eppendorf AG, Hamburg

Pipette (100 µL) Transferpipette [®] S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (100 µL) Transferpipette [®] -12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (1000 µL) Research [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette (1000 µL) Transferpipette [®] S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (1-5 mL) Finnpipette [®]	Thermo Fisher Scientific GmbH, Langenselbold
Pipette (200 µL) Transferpipette [®] S-12	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipette (200 µL) Transferpipette [®] -12 electronic	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Probenaufbereiter MicroCal ThermoVac	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Purelab [®] Plus Wasseraufbereitungsanlage	ELGA LabWater, Celle
Reagenzglasschüttler VWR Collection	VWR International GmbH, Darmstadt
Rotationsverdampfer Rotavapor R-3	Büchi AG, Essen
Rundkolben, Klarglas (10 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rundkolben, Klarglas (5 mL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schraubdeckelgefäße Rotilabo [®] ND11 (4 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schraubdeckelgefäße Rotilabo [®] ND8 (1,5 mL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schüttelinkubator Unimax [®] 1010	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Spatel, diverse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
the Nano Wizzard I	JPK Instruments AG, Berlin
Thermomixer comfort (IsoTherm 1,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank 60°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Ultraschallbad Sonorex [®] Super RK 103 H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vakuum-Chemiepumpstand PC5	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim

Material und Methoden

Wasseraufbereitungsanlage Elix	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
Zellzähler CASY [®] 1 Model TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Allegra [™] R5	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Micro 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Microfuge [®] Lite	Beckmann-Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Universal 32 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

3.2. Methoden

3.2.1. Zelllinien und Zellkultur

3.2.1.1. B16F10

Die B16 Zelllinien haben ihren Ursprung in 1954 spontan in der etablierten C57BL/6J Labormaus entstandenen Melanomzellen [133].

Über die Zeit wurden zahlreiche Subformen selektiert und beschrieben, wovon die B16.F10 Zelllinie die größte Verbreitung erfahren hat und sich durch eine hohe Aggressivität sowie ein ausgesprochen hohes in vivo Metastasierungspotential auszeichnet [134]. Dies zeigt sich auch in der, verglichen mit anderen B16-Melanom-Zelllinien, hohen in vitro Proliferationsrate. Die Proliferationsrate der B16.F10 Zelllinie ist dabei von der FKS-Konzentration abhängig und zeigt ein Optimum bei 10 % [135].

Kultiviert werden B16.F10 Zellen bei 37°C und unter einer 5 % CO₂ Atmosphäre. Als Medium wird Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FKS (V/V), 1 % Penicillin/Streptomycin (V/V) und 1 % L-Glutamin-Zusatz (V/V) verwendet.

Beibehalten hat die Zelle eine hohe Melanin-Produktion, die sich durch eine Schwarzfärbung des Mediums bei ungünstigen Kultivierungsbedingungen zeigt.

3.2.1.2. MV3

Im Gegensatz zur B16F10 Zelllinie handelt es sich bei MV3 Zellen um humane Melanomzellen. Besonders im Hinblick auf Ansätze translationaler Medizin stellt sich die somit potentiell höhere Übertragbarkeit auf Krebserkrankungen im menschlichen Körper als Vorteil heraus.

Ihren Ursprung hat die MV3 Zelllinie in metastasierenden Melanozyten eines 76-jährigen Patienten mit malignem Melanom. Zur Etablierung dieser Zelllinie wurden dem Patienten Metastasen im Bereich des Lymphknotens entnommen und die am stärksten metastasierenden Zellen in Nacktmäusen selektiert [136].

Die Zellen werden in RPMI1640 Medium mit 10 % FKS (V/V) und 1 % Penicillin/Streptomycin (V/V) Zusatz, unter einer 5 prozentigen CO₂ Atmosphäre und bei einer Temperatur von 37°C kultiviert.

3.2.1.3. Zellkultur

Nahezu alle Untersuchungen dieser Arbeit werden an Zellen oder an aus Zellen extrahierten Bestandteilen durchgeführt. Ziel der Zellkultur ist es, dafür Zellen in gleichbleibend hoher Qualität bereit zu stellen. In grober Annäherung kann man abhängig von der Zelllinie, der ausgesäten Zellzahl und der Wachstumsdauer aus einer T75 Flasche $2-5 \cdot 10^6$ sowie $5-10 \cdot 10^6$ Zellen aus einer T175 Flasche gewinnen.

Zu Wahrung reproduzierbarer Wachstumsbedingungen, besonders ohne gewebeartige dreidimensionale Strukturen mit partieller Nährstoffunterversorgung, werden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche passagiert, sobald der Boden einer Zellflasche nahezu konfluent bewachsen ist.

Hierzu wird das alte Medium unter der Sterilwerkbank abgesaugt, die Zellkulturflasche mit 10 mL PBS gespült und nach weiterem Absaugen der Flaschenboden entsprechend der Grundfläche der Zellkulturflasche mit 2 oder 4 mL 0,02 % EDTA Lösung benetzt. Abhängig von der momentanen Adhäsionskraft der Zellen können diese nach 5-10 min Inkubationszeit mittels des Shake-off-Verfahrens von der Zellkulturflasche abgelöst werden [137]. Befinden sich nach 10 min trotzdem noch zahlreiche Zellen am Boden, werden diese mittels eines sterilen Zellscharbers abgekratzt. Dieser Vorgang ist notwendig, um eine negative Selektion hin zu schlecht adhärenen Zellen zu verhindern, ganz besonders im Hinblick auf die Tatsache, dass die funktionelle Beeinflussung von Adhäsionsrezeptoren einen elementaren Bestandteil dieser Arbeit ausmacht.

Auf die auch häufig in der Zellkultur anzutreffende Methodik der Trypsin-unterstützten Ablösung von Zellen wurde bewusst verzichtet, um eine weitere Reduktion der Adhäsionsfähigkeit der Zellen durch die Einwirkung der Protease zu verhindern.

Die vorhandene EDTA-Zellsuspension wird durch Zugabe von Zellmedium auf ein Volumen von 10 mL aufgefüllt, in eine sterile 15 mL PP-Röhre mit Schraubverschluss überführt und bei 1680 rpm für 4 min zentrifugiert. Das über dem Zellpellet stehende Medium wird abgesaugt und das Zellpellet selbst in frischem Medium resuspendiert, sodass eine Konzentration von 10^7 Zellen pro mL resultiert.

Zur Weiterkultivierung werden 100 μ L dieser Zellesuspension und somit 10^6 Zellen in eine mit 30 mL Medium gefüllte T175 Flasche gegeben.

3.2.1.4. Kryokonservierung und Wiederinkulturnahme

Wenngleich die untersuchten neoplastischen Zelllinien, bedingt durch Telomeraseaktivität immortal sind [138], können sie, alleine schon aufgrund der mit der Zeit zunehmenden Gefahr von spontan auftretenden Mutationen, nicht endlos kultiviert werden.

Aus diesem Grunde werden nach Empfang neuer Zelllinien zahlreiche kältelangzeitkonservierte Zellbackups erstellt, die bei Bedarf in Kultur genommen werden können.

Praktisch werden dazu zwischen $1 \cdot 10^6$ und $5 \cdot 10^6$ Zellen in 1 mL einer 90 % (V/V) FKS und 10 % DMSO (V/V) haltigen Lösung suspendiert und unmittelbar bei -80°C eingefroren. Die Langzeit Aufbewahrung findet anschließend in flüssigem Stickstoff statt.

Zur Wiederinkulturnahme werden die Cryovials aufgetaut, die Cryomediumsuspension mit Zellmedium verdünnt, das Zellpellet abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt, sodass sich die Zellen schnellst möglich wieder in einer DMSO freien Umgebung befinden. In Abhängigkeit vom Zelltyp werden die Zellen anschließend in T25 oder größeren Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.1.5. Zellzählungen

Zellen werden automatisch mittels eines Casy Modell TT Cell Counters der Firma Schärfe System GmbH aus Reutlingen gezählt. Die Zellzählung basiert auf dem Stromausschlussverfahren. Dabei durchlaufen kapillarvereinzelte Zellen ein hochfrequent pulsierendes elektrisches Feld. Die intakte Zellmembran lebender Zellen fungiert als detektierbarer elektrischer Isolator. Bei apoptotischen Zellen zeigt nur noch der Zellkern eine Isolation. Aus dem resultierenden Diagramm der Zellereignisse als Funktion der Zellgröße lassen sich die in einer Probe befindlichen lebenden Zellen bestimmen [139]. Zur Messung werden 20 μL der zu bestimmenden Zellsuspension in 10 mL der Casy Ton Elektrolytlösung gegeben.

3.2.1.6. Lysophosphatidylcholin Applikation

LysoPC zeigt in höheren Konzentrationen aufgrund seiner Eigenschaften als Detergens Zelltoxizität. Zur Realisierung physiologischer Konzentrationen ohne toxische Effekte wird LysoPC in nahezu allen Versuchen an BSA gebunden appliziert.

Da LysoPC vorbehandelte Zellen reduzierte Adhäsionsfähigkeit zeigen, lässt man unbehandelte Zellen zuerst für 24 h in LysoPC freiem Medium anwachsen und gibt es erst mit dem folgenden Mediumswechsel zu.

3.2.1.7. Fibronektin Beschichtung

Zahlreiche Versuche erfordern nahezu immobile, aber weiterhin lebende Zellen. Da eine chemische Fixierung diesen Anforderungen nicht genügt, werden Oberflächen mit dem EZM-Bestandteil Fibronektin beschichtet.

Die Beschichtung erfolgt mit einer sterilen Fibronektin in PBS Lösung der Konzentration 10 µg/mL für 60 min bei 37°C. Um eine homogene Beschichtung zu gewährleisten, ist es dabei wichtig, dass die gesamte Well- bzw. Deckgläschenoberfläche über den Inkubationszeitraum vollständig bedeckt ist. Bei 24-Well Platten ist ein minimales Volumen von 250 µL notwendig um den Boden vollständig zu bedecken. Im Anschluss wird die Beschichtungslösung abgesaugt und die Zellsuspension unmittelbar ausgesät, um ein Trockenfallen der Beschichtung zu verhindern.

3.2.2. MTT-Assay

Der MTT Assay dient der Bestimmung der Zelltoxizität von Substanzen. Es wird ausgenutzt, dass die Reduktion des gelben MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) zum violetten Formazan nur durch lebendige Zellen erfolgen kann [140].

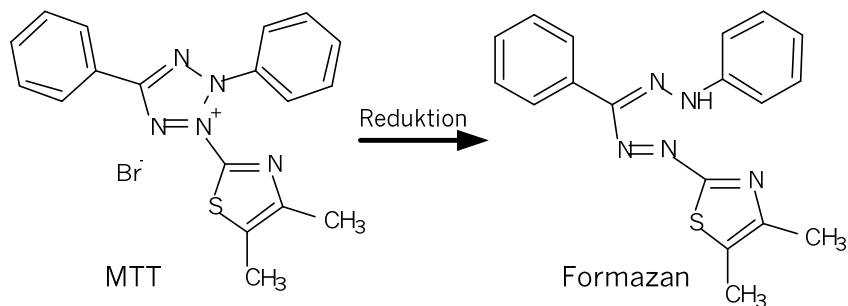


Abbildung 14 Chemische Grundlage des MTT Assays

Zellen werden mittels EDTA aus den Zellkulturflaschen abgelöst. In jedes Well einer 96-Well Platte werden 1.000 Zellen in jeweils 90 μ L Zellmedium gegeben. Die Zellen lässt man über 24 h anwachsen. Am nächsten Tag werden die zu untersuchenden Substanzen als Verdünnungsreihe in jeweils 10 μ L Volumen zugegeben. Mit dem vorgelegten Zellmedium ergibt sich somit eine Verdünnung von 1:10, die Verdünnungsreihe muss also mit der 10-fachen Konzentration hergestellt werden.

Die mit Testsubstanzen behandelten Platten werden für 72 h bei 37°C inkubiert.

Nach 72 h werden in jedes Well 20 μ L einer 5 mg pro mL haltigen MTT-Lösung gegeben. Eine weitere Stunde später wird die Platte ausgeschlagen und die Wells mit 100 μ L DMSO gefüllt. Dadurch werden die Zellen abgetötet und geöffnet, sodass sich das intrazelluläre Formazan lösen kann und eine Blaufärbung des DMSO ergibt.

Die Platten werden anschließend im Plattenreader bei 570 nm und 690 nm vermessen. Formazan führt zu einer Absorption bei 570 nm. Von diesem Wert wird die Absorption bei 690 nm abgezogen. Diese dient zur Korrektur der weitestgehend wellenlängenunabhängigen Absorption der Zellen, des Mediums sowie des Wells.

Die Auswertung der Messwerte mittels nichtlinearer Regression findet in Graph Pad Prism[®] statt.

3.2.3. Zelladhäsion

Die Betrachtung der zellulären Adhäsion unter physiologischen Flussbedingungen findet in einer speziell dafür konstruierten Flusskammer unter Videobeobachtung an einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop statt.

Innerhalb dieser Flusskammer befindet sich ein Deckgläschen, auf dem zuvor VCAM-1 immobilisiert wurde. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über das Deckgläschen geleitet bis die Kammer mit Zellen gefüllt ist. Nach fünfminütiger Ruhephase zur Ausbildung von Adhäsionen wird ein physiologischer Fluss durch hydrostatischen Druck generiert. Das Ablösen der Zellen wird aufgenommen und anschließend durch Zählen der verbleibenden Zellen nach 2 s mit der Imagoquant Multi-Track-AVI-2 Software ausgewertet [141,142].

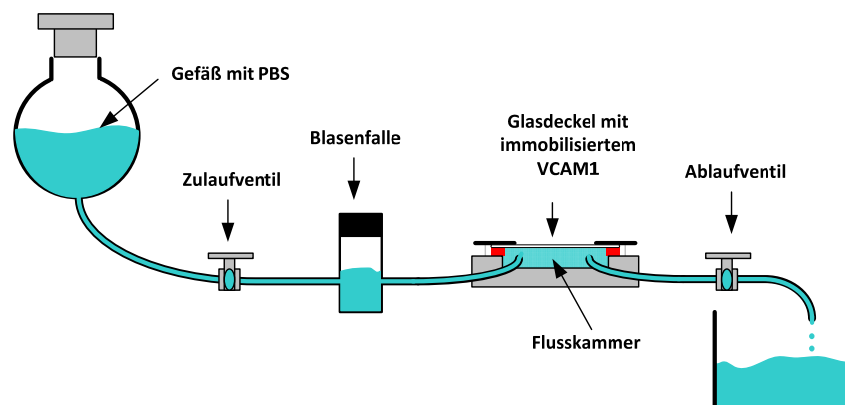


Abbildung 15 Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Zelladhäsion

Die zu untersuchenden Zellen werden in die Basenfalle gegeben. Durch Öffnen des Zulauf- und des Ablaufventils wird die zuvor gebildete Zellsuspension durch die Flusskammer geleitet und diese mit Zellen angereichert. Nach Verschließen der beiden Ventile können sich die Zellen absetzen und Adhäsionen mit dem dort befindlichen immobilisiertem VCAM-1 ausbilden. Durch erneutes Öffnen der beiden Ventile werden physiologische Flussbedingungen realisiert.

3.2.4. Zweidimensionale Zellmigration

Ein zweidimensionaler Wundheilungsassay ist die Grundlage funktioneller Migrationsuntersuchungen.

In 24 Well Platten werden in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Zelllinie 5.000 (B16.F10) oder 7.500 (MV3) Zellen ausgesät. Um einen LysoPC Einfluss auf das initiale

Anwachsen der Zellen auszuschließen, lässt man die Zellen zunächst für 24 h in unbehandeltem Medium anwachsen und setzt sie erst ab dem nachfolgenden Mediumswechsel der zu untersuchenden LysoPC Konzentration aus. Durch Einsatz der vorgenannten Zellzahlen erreicht man nach weiteren 72 h Inkubationszeit einen konfluenten Zellrasen mit für die Dauer der Migrationsbeobachtung lebensfähigen Zellen.

Zu Beginn der eigentlichen Beobachtungszeit wird mit Hilfe einer 200 µL Pipettenspitze eine Linie in den Zellrasen gekratzt ohne dabei jedoch den Untergrund zu beschädigen. In einer auf 37°C temperierten Klimakammer mit 5 % CO₂ Atmosphäre werden mit Hilfe des Durchsichtdetektors einer 10 fach Vergrößerung und eines 488 nm Lasers als Lichtquelle im 30 min Abstand Bilder des Zusammenwachsen der Zellen über einen Zeitraum von 12 h angefertigt. Die resultierende Wundheilungsgeschwindigkeit ist die lineare Regression aus der Veränderung der einzelnen Lücken im Zellrasen ausgemessen mittels der Nikon NIS Elements Software.

Zur stärkeren Fokussierung auf Integrin vermittelte Migration werden die Wells vor Aussäen der Zellen zum Teil mit dem EZM Bestandteil Fibronektin beschichtet.

3.2.5. Immunfluoreszenz basierte Techniken

Zelluläre Strukturen lassen sich recht spezifisch mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper anfärben. In den meisten Fällen bedient man sich einer Sandwich Technik, bei der ein primärer Epitop-spezifischer Antikörper mit einem zweiten fluoreszenzmarkierten und für den FC-Teil des ersten Spezifischen kombiniert wird.

Ziel kann es dabei sein quantitative Aussagen über die Expression von Proteinen mittels Durchflusszytometrie zu erzielen oder aber Bilder von Proben mittels eines Fluoreszenzmikroskops zu erstellen.

3.2.5.1. Konfokale Mikroskopie

Die unzureichende Ausblendung von Streulicht aus der unmittelbaren Nachbarschaft der Fokusebene ist ein prinzipieller Nachteil klassischer Mikroskopie. Besonders bei der Fluoreszenzmikroskopie macht sich dies aufgrund der geringeren Leuchtintensität durch unscharfe Bilder bemerkbar.

Ein Lösungsansatz hierfür ist die Einführung von Lochblenden in den Strahlengang des Mikroskops. Licht, welches nicht aus der gerade fokussierten Ebene stammt, kann die Lochblenden nicht mehr passieren und somit auch kein Störsignal auf dem Detektor erzeugen.

Da sich mit sinkendem Durchmesser der Lochblende der zu betrachtende Bildausschnitt in allen 3 Dimensionen verringert, wird bei konfokalen Mikroskopen das Bild gerastert. Es setzt sich somit aus einer Vielzahl von Einzelmessungen zusammen, die mit Hilfe eines Computersystems zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden. Als Resultat ergeben sich bedeutend feiner aufgelöste Bilder als dies mit klassischer Mikroskopie realisierbar wäre. Darüber hinaus ist die Konfokalität auch zwingende Voraussetzung für Techniken, die ein präzises Photobleichen erfordern.

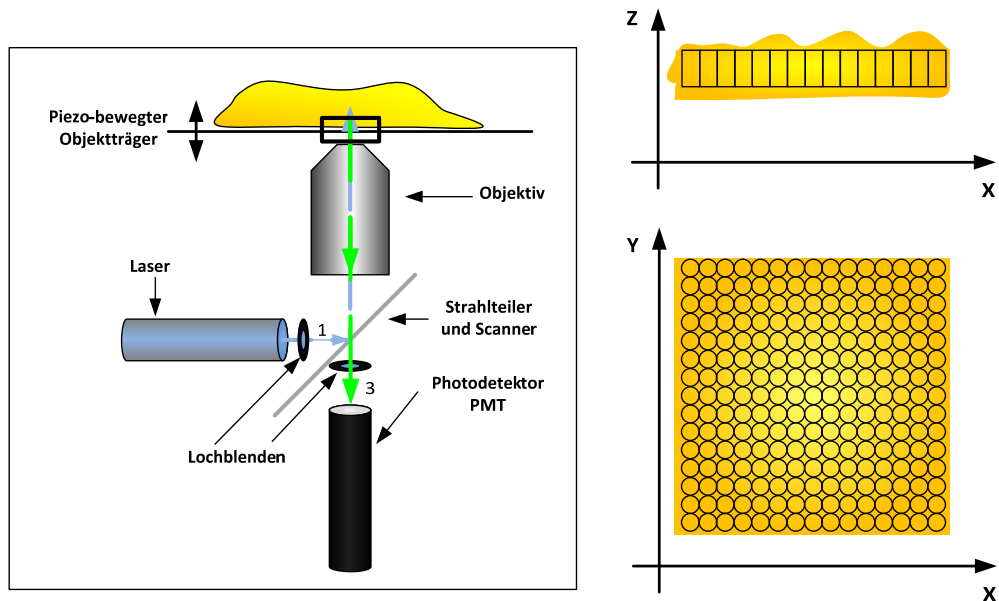


Abbildung 16 Schematische Darstellung der konfokalen Mikroskopie

Der von einem Laser generierte monochromatische Lichtstrahl wird über ein System von Spiegel und Lochblenden in die zu untersuchenden Probe gelenkt. Durch dort befindliche Fluorophore emittiertes Licht geringerer Wellenlänge gelangt anschließend über korrelierende Spiegel und Lochblenden zur Photonendetektierenden Photomultiplier-Röhre (PMT). Bedingt durch den Einsatz der Lochblenden wird das gesamte Bild aus den Helligkeitswerten einzelner Zylinder zusammengesetzt, rechts illustriert. Die Berechnung des finalen Bildes erfolgt Computer-unterstützt.

3.2.5.2. Probenvorbereitung Fluoreszenzmikroskopie

Aufgrund des geringen Abstandes zwischen der Oberseite der Objektivlinse und der eigentlichen Schärfenebene müssen sich die Zellen gerade bei hochvergrößernden Objektiven zur Betrachtung auf dünnen Deckgläschen befinden, um eine sichere Fokussierung in die Zelle zu ermöglichen. Aus praktischen Gründen findet daher die gesamte Kultivierung der Zellen wie auch die eigentliche Probenvorbereitung direkt auf den Deckgläschen statt.

Zuvor mit Wasser und Aceton gereinigte und autoklavierte Deckgläschen werden in 6-Well Platten mit Fibronectinlösung beschichtet. Anschließend werden in Abhängigkeit von der Zelllinie 25.000 (B16.F10) oder 50.000 Zellen (MV3) in den einzelnen Wells ausgesät. Nach 24 h erfolgt ein Mediumwechsel mit Zugabe der entsprechenden LysoPC Konzentrationen.

Die Probenvorbereitung besteht aus der Zellfixierung mittels 3,7 % (V/V) Formaldehydlösung für 15 min bei Raumtemperatur. In jedes Well werden 2 mL appliziert. Der auch fixierende Glutaraldehyd sollte aufgrund seiner Eigenfluoreszenz nach Möglichkeit vermieden werden. Nach drei Waschschritten findet eine Permeabilisierung der Zellmembran durch eine 0,5 % Lösung (V/V) des Detergenz TritonX-100 für 10 min ebenfalls bei Raumtemperatur statt.

40 µL einer 1 % BSA in PBS werden für jedes Deckgläschen auf Parafilm aufgetragen und die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite in den Tropfen gelegt. Dieser Schritt dient der Absättigung aller unspezifischen Bindungsstellen.

In vergleichbarer Form werden die primären und sekundären Antikörper appliziert. Hierzu werden jeweils 20 µL der Antikörperlösung auf Parafilm aufgetragen und das Deckgläschen für 60 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz in der Lösung gehalten. Zwischen den Antikörperzugaben findet jeweils ein Waschschrift mit einer 0,05 % (V/V) Tween 20 in PBS Lösung PBST statt. Zur Anfärbung der Zellkerne kann zusätzlich noch das DNA-interkalierende Fluorophor DAPI verwendet werden. Dafür werden die Deckgläschen analog zu den vorhergehenden Schritten für 5 min mit 30 µL einer DAPI-Lösung behandelt. Gefolgt von zwei weiteren Waschschrritten mit PBST werden die Deckgläschen abschließend mit destilliertem Wasser abgespült.

Die so vorbereiteten Deckgläschen werden anschließend mit zwei Tropfen Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht, lichtgeschützt aufbewahrt und nach ca. 12 h mit farblosem Nagellack umrandet.

3.2.5.3. Quantitative Pixeldichtenauswertung

Neben der qualitativen Darstellung zellulärer Strukturen, lassen sich noch auch quantitative Aussagen treffen, da die Intensität der Fluoreszenz bei ansonsten gleichen Bedingungen unmittelbar mit der Häufigkeit des Vorkommens der jeweils markierten Struktur korreliert.

Bedingt durch die Konfokalität wird im Gegensatz zu durchflusszytometrischen Messungen immer nur eine Ebene der Zelle betrachtet und nicht die gesamte Zelle. Somit lassen sich sogar Verschiebungen innerhalb einer Zelle detektieren.

Pixeldichtenanalysen an lebenden Zellen, die bezüglich ihrer Kinetik betrachtet werden sollten, wurden mit der Nikon NIS-Elements Software durchgeführt. Aufgrund der Integration der Messwerterfassung in die Software für die Bildgebung bietet sich diese Variante besonders für große Messreihen an.

Im Messfeld können beliebige geometrische Formen als Regions of Interest benannt werden, für die zu jedem Messzeitpunkt die mittlere Intensität ausgegeben wird. Die resultierenden Werte können anschließend in Excel® oder Prism® weiter verarbeitet werden.

Konkret wurde dies im Fall der FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) durch Messungen mit Kreisen des Durchmessers 3 µm durchgeführt.

Bedingt durch die zum Teil eingeschränkte zeitliche Verfügbarkeit des Auswertesystems wurde darüber hinaus mit Hilfe der Software Adobe Photoshop® CS Extended Edition eine weitere Methode zur Pixeldichtenauswertung etabliert.

Dort können wiederum beliebige geometrische Formen als Markierungen auf den zu untersuchenden Bildern ausgewählt werden. Von diesen Markierungen kann anschließend die Fläche, die mittlere Helligkeitsintensität sowie die über die gesamte markierte Fläche integrierte Intensität ermittelt werden. Somit ist es möglich einzelne Zellen eines Bildes isoliert zu betrachten.

Werden bei einer Messung mehrere Fluoreszenzkanäle verwendet, z.B. bei der gleichzeitigen Anfärbung mehrerer Strukturen, können diese passgenau überlagert werden und anschließend bezüglich ihrer Intensität in Korrelation gesetzt werden. Angewendet wird dies für die fluoreszenzmikroskopischen Betrachtungen der FAK-Phosphorylierung.

Der Datenaustausch zwischen NIS-Elements® und Photoshop® erfolgt pro Aufnahme und Fluoreszenzkanal als einzelne Datei im verlustfreien TIFF Format mit den vollen 12 bit Farbtiefe pro Kanal, sodass auch in Photoshop pro Kanal 4096 verschiedene Einzelwerte unterschieden werden können.

Die resultierenden Messwerte können wiederum in Excel weiterverarbeitet werden.

3.2.5.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine lichtbasierte Technik zur Quantifizierung von Fluoreszenz-markierten zellulären Strukturen kapillarvereinzelter Zellen, einhergehend mit relativer Charakterisierung der jeweiligen Zellen bezüglich Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Angeregt von einem 488 nm Laser, wird bei gleicher Wellenlänge in Achse mit dem Lichtstrahl die Zellgröße als Vorwärtsstreuung (FSC) und im 90° Winkel die Granularität der Zelloberfläche als Seitwärtsstreuung (SSC) bestimmt. Ebenfalls im 90° Winkel zur Lichtquelle befinden sich die Detektoren für die Emissionswellenlängen der zu untersuchenden Fluorophore. Fluoreszenzmarkierte Antikörper wie auch Calcium-sensitive Fluorophore dienen in den Versuchen dieser Arbeit als Fluoreszenzsonden. Die Datenauswertung findet mit der freien Flowing Software statt [143].

3.2.5.4.1. Probenvorbereitung extrazelluläre Strukturen

Entsprechend dem Versuchsdesign vorbereitete Zellen werden mit Hilfe des Chelat-Bildners EDTA abgelöst, in einem 0,5 % (m/V) BSA-haltigem PBS-Waschpuffer gewaschen und in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro 90 μ L in Reagiergefäßen suspendiert. Ein Volumen von 10 μ L des entsprechenden primären Antikörpers wird zugesetzt und für 30 min mit den Zellen inkubiert. Durch Zentrifugieren werden die Zellen von dem restlichen Puffer getrennt. Nachfolgend an einen weiteren Waschschrift werden die Zellen in 95 μ L BSA-haltigem Waschpuffer resuspendiert und mit 5 μ L der Suspension des sekundären Antikörpers versetzt. Weitere 30 min Inkubationszeit später werden die Reagiergefäße erneut zentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt, die Zellen in 100 μ L Waschpuffer resuspendiert und vermessen. Die Konzentrationen der einzelnen Antikörpersuspensionen wie auch die Einstellungen des FACS sind dabei Antikörper spezifisch und werden in Vorversuchen ermittelt.

3.2.5.4.2. Calcium Bestimmung

Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration wird mittels der beiden Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonden CalciumGreen-1 und FuraRed durchgeführt.

Beide Fluoreszenzsonden liegen als Acetoxymethylester vor. Diese Form sorgt dafür, dass die lipophilen Moleküle sehr leicht in die Zelle vordringen können. Die Ester werden dort durch unspezifische Esterasen gespalten, wodurch geladene Moleküle resultieren, die die Zellmembran nicht mehr frei passieren können.

Während die Fluoreszenz von CalciumGreen-1 direkt proportional zur Calcium-Konzentration ist, nimmt bei FuraRed ausgehend von einem Grundwert die Fluoreszenzintensität im beobachteten Wellenlängenbereich mit zunehmender Calcium-Konzentration ab.

Es werden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen in 50-100 μL Zellmedium suspendiert, 600 μL Calcium-Assay-Puffer A hinzugegeben und die resultierende Suspension anschließend bei 2500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wird in 60 μL des Calcium- und Magnesium-haltigen Calcium-Assay-Puffers B resuspendiert. 50 μg der beiden Fluorophore werden jeweils in 100 μL DMSO gelöst und davon 0,3 μL zu der zuvor hergestellten Zellsuspension gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei einer Temperatur von 37 °C werden die Zellen gewaschen in 200 μL Calcium-Assay-Puffer B resuspendiert und durchflusszytometrisch vermessen.

3.2.6. FRAP

Fluorescence Recovery after Photobleaching ist eine Fluoreszenz-basierte Methode zur Bestimmung lateraler Beweglichkeit innerhalb von Biomembranen.

Durch Einlagerung eines fluoreszenzmarkierten Lipids wird eine fluoreszierende Zellmembran erzeugt. Mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops kann diese Membran sehr präzise punktuell durch einen Laserimpuls hoher Leistungsdichte gebleicht werden. Bei bedeutend geringerer Laserintensität kann unmittelbar im Anschluss die Kinetik der Fluoreszenzwiederherstellung durch Abstrom gebleichter und Zustrom unbeeinträchtigter Fluorophormoleküle betrachtet werden [144].

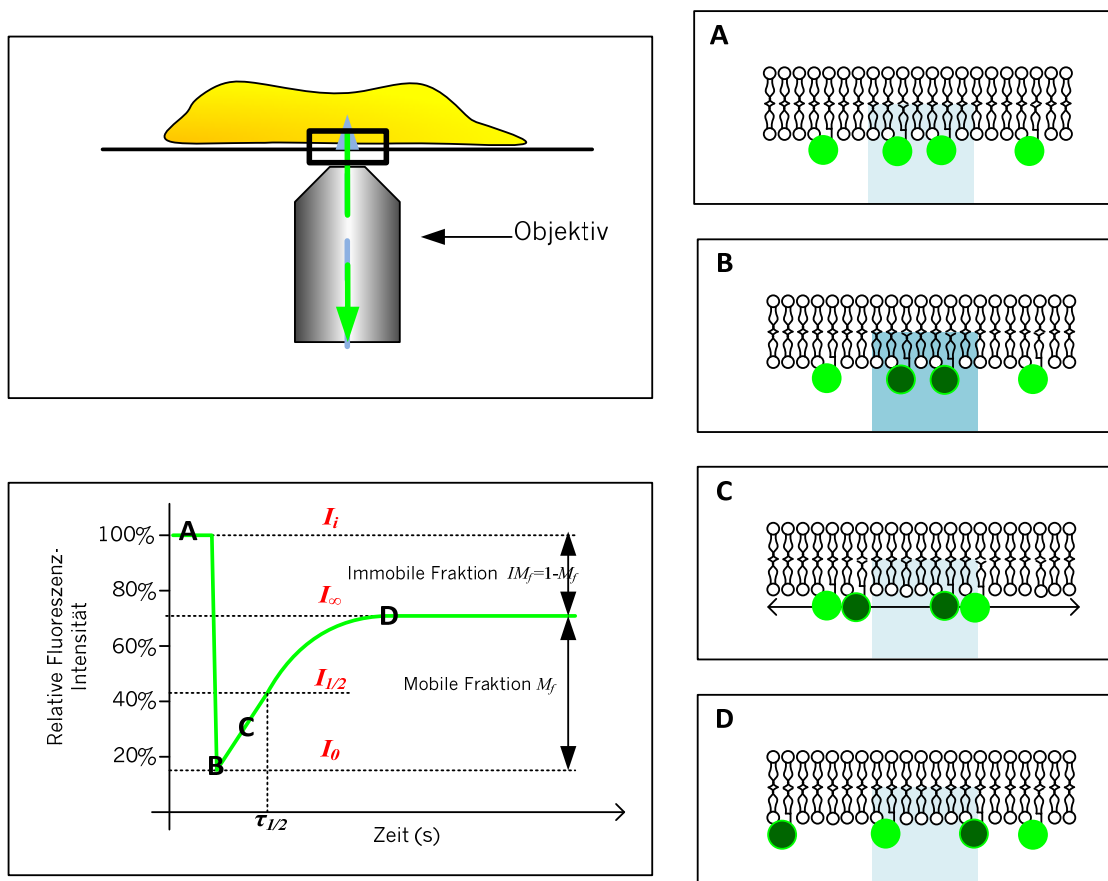


Abbildung 17 Schematische Darstellung der FRAP-Messung

Mittels eines konfokalen Mikroskops findet ein punktuelles Bleichen von Fluorophoren innerhalb der Zellmembran statt. Ausgehend von einer Grundfluoreszenzintensität **A** sinkt die Fluoreszenz in dem gebleichten Bereich schlagartig ab **B**. Durch laterale Diffusion von intakten Fluorophoren findet eine Wiederherstellung der Fluoreszenz statt **C**. Aufgrund der irreversiblen Zerstörung einzelner Fluorophor-Moleküle sowie unausweichlichen Bleaching Vorgängen liegt die Intensität der final wiederhergestellten Fluoreszenz **D** allerdings unterhalb der Intensität der ursprünglichen Fluoreszenz.

Als Fluoreszenzsonde wird das an der Aminogruppe NBD-markierte Phosphoethanolamin C 18:1 NBD PE verwendet. Vorversuche mit dem gesättigten C18:0 Derivat zeigten eine geringere Membraneinlagerung und resultierend eine schlechtere Fluoreszenzausbeute.

$5 \cdot 10^3$ Zellen werden in zuvor mit Fibronektin beschichteten ibidi μ Dishes ausgesät und nach 24 h der entsprechenden LysoPC-Behandlung unterzogen. Das Fluorophor wird in einer Konzentration von 4 μ mol/L 18:1 NBD-PE in PBS mit einem Zusatz von 2 % Ethanol für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen gewaschen und in PBS vermessen.

Der eigentliche Messvorgang besteht aus 5 Messungen der initialen Fluoreszenz I_i , bei einer Laserleistung von 0,6 % und einer Wellenlänge von 488 nm im 2 s Abstand. Hier lassen sich auch schon eventuelle Probleme durch nicht hinreichend immobile Zellen erkennen. Im direkten Anschluss findet für 280 ms der eigentliche Bleichvorgang bei voll Laserleistung statt. Die Fluoreszenzwiederherstellung wird wiederum bei 0,6 % Laserleistung betrachtet, um ein weiteres Photobleaching durch die Beobachtung zu verhindern. Für die ersten 20 s werden im 500 ms Abstand und für eine weitere Minute im 2 s Abstand Aufnahmen erstellt.

Die Berechnung des Zeitpunkts der Halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung erfolgt in Microsoft Excel® mittels nichtlinearer Regression. Entsprechend den nachfolgend mathematischen Gleichungen.

Zuerst wird die mobile Fraktion bestimmt. Dabei handelt es sich um die Fluoreszenzintensität, die auch tatsächlich wiederhergestellt werden kann.

$$M_f = \frac{I_\infty - I_0}{I_i - I_0}$$

Abbildung 18 Formel für die Berechnung der mobilen Fraktion

Der kinetische Parameter τ wird mittels nicht linearer Regression ermittelt. Grundlage ist hierbei die Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate zwischen tatsächlichen Messwerten und den berechneten Werte des zugrunde liegenden Modells.

$$I_t = M_f(1 - e^{-\tau t})$$

Abbildung 19 Mathematische Grundlage des Fluoreszenzwiederherstellungsmodells

Aufgrund des kürzeren Messwertintervalls am Anfang der Messung findet eine höhere Gewichtung der relevanten Anfangsphase statt.

$$\tau_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(0,5)}{-\tau}$$

Abbildung 20 Formel für die Berechnung des Zeitpunkts der Halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung

Der letztlich resultierende Zeitpunkt der Halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung ist ein Maß für die laterale Beweglichkeit innerhalb der Zellmembran.

3.2.7. Membranfluiditätsmessungen mittels Fluoreszenz Anisotropie

Innerhalb von flüssigkristallinen Strukturen wie zum Beispiel Lipidmembranen besitzen Moleküle eine begrenzte örtliche Beweglichkeit. Diese Beweglichkeit kann mit Hilfe der Fluoreszenzanisotropie-Messungen betrachtet werden. Dabei lagert sich mit der Fluoreszenzsonde TMA-DPH (Trimethylammoniumdiphenylhexatrien) ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff in der Zellmembran ein. In der hydrophilen Umgebung erfährt TMA-DPH ein ausgeprägtes Quenching, wodurch spezifisch die Zellmembran Fluoreszenz-markiert wird.

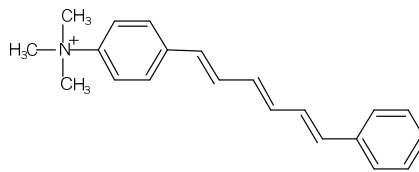


Abbildung 21 Strukturformel TMA-DPH

Wird ein Fluorophor mit linear polarisiertem Licht angeregt, bleibt die Polarisation des Lichtes auch bei der anschließenden Emission eines Photons in Relation zur räumlichen Orientierung des Moleküls erhalten. Wenngleich die Emission des Photons sehr zeitnah auf die Absorption folgt, liegen doch 10 ns Abstand zwischen beiden Ereignissen. Findet innerhalb dieses Zeitfensters eine Rotationsbewegung des Fluorophors statt, an dessen Ende nicht wieder die Ausgangsposition erreicht wird, besitzt das nun ausgesendete Photon eine andere Polarisationsebene, als das zuvor für die Anregung in die Probe entsandte.

Wird die Probe mit linear polarisiertem Licht bestrahlt, ist die Zusammensetzung der Polarisationsebenen des emittierten Lichts abhängig von der örtlichen Beweglichkeit der Fluoreszenzsonden. Ein hoher Anisotropiewert resultiert aus einer vornehmlich eingenommenen räumlichen Orientierung der Lichtemission als Konsequenz einer geringen Beweglichkeit. Ein geringer Anisotropiewert zeigt eine relative freie Beweglichkeit innerhalb der untersuchten flüssigkristallinen Struktur.

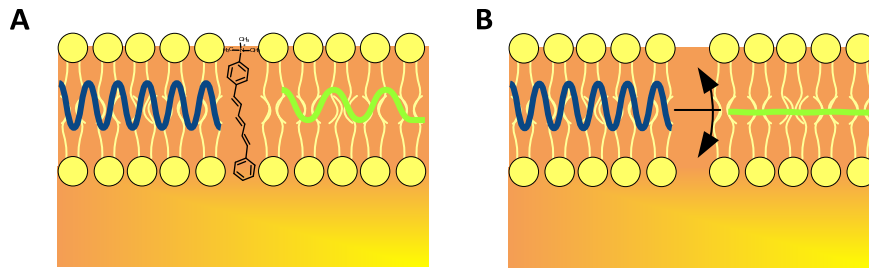


Abbildung 22 Grundlage der Fluoreszenzanisotropie-Messung

Wird ein Fluorophor mit linear polarisiertem Licht angeregt, besitzt auch das emittierte Fluoreszenz-Photon die gleiche Polarisationssebene (A). Findet in einer flüssigkristallinen Umgebung zwischen Photon-Absorption und Emission eine Rotationsbewegung des Fluorophors statt, kann das emittierte Photon eine andere Polarisationssebene besitzen als das ursprünglich Anregende (B).

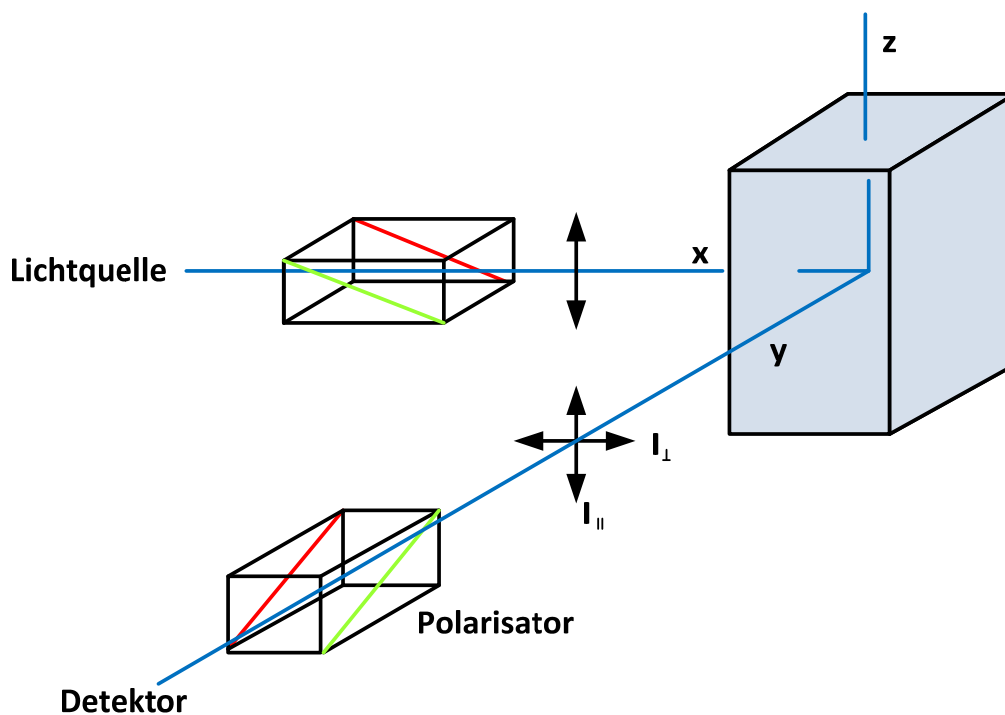


Abbildung 23 Messaufbau der Fluoreszenzanisotropie-Messung

Linear polarisiertes Licht regt Fluorophore innerhalb einer flüssigkristallinen Struktur an. Durch zwei Detektoren, die jeweils nur für eine Polarisationssebene empfänglich sind, kann der Grad der Anisotropie als Maß für die Beweglichkeit der Fluorophore bestimmt werden. Aus [145].

Die Fluoreszenzanisotropie berechnet sich als Quotient der Differenz der Intensitäten von parallel und orthogonal polarisiertem Licht und der Gesamtintensität des Anregungslichtes.

$$I_{tot} = I_{||} + 2 \cdot I_{\perp}$$

Abbildung 24 Berechnung der Fluoreszenzintensität

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{tot}}$$

Abbildung 25 Berechnung der Fluoreszenzanisotropie

Zur Durchführung der Messungen werden die jeweils für mindestens 72 h mit LysoPC vorinkubierten Zellen mittels EDTA aus den Zellkulturflaschen gelöst, mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro mL in PBS suspendiert. 100 μ L dieser Zellsuspension werden in eine schwarze 96 Well Platte gegeben.

Zu dieser Zellsuspension werden 100 μ L einer 10^{-6} M TMA-DPH in PBS Arbeitslösung gegeben, sodass sich basierend auf den Bedingungen von [146] das empirisch optimierte Verhältnis von 10^{-10} mol TMA-DPH auf 10^5 Zellen ergibt.

Die Messung der Fluoreszenzanisotropie erfolgt in einem Polarstar Galaxy Plattenreader der Firma BMG Labtech, bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm, der Emission bei 430 nm und einer Temperatur von 37 °C.

3.2.8. Proteinanalytik

3.2.8.1. Zellysat Herstellung

Zur Herstellung von Zellysaten wird sich eines Protokolls bedient, das auf eine Minimierung der Proteininaktivierung durch zelleigene Proteasen abzielt. [147]

Neben der Zugabe des Protease Inhibitor Cocktails (PIC) 50 μL sowie des zusätzlichen Protease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 3,4 μL pro mL zum eigentlichen Zellextraktionspuffer ist ein zügiges Arbeiten unabdingbar. Die in T175 Flaschen konfluent gewachsenen Zellen werden zweifach mit 10 mL eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL des Lysepuffer in der Flasche versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit auf Eis werden die Zellen mittels eines Zellscharbers vom Boden der Zellkulturflasche gekratzt. Die Zellsuspension wird bei 13.000 RPM für weitere 15 min abzentrifugiert und der Überstand für weitere Versuche unmittelbar bei -80°C eingefroren.

3.2.8.2. Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Sollen quantitative Vergleiche mittels Westernblots durchgeführt werden, ist es von entscheidender Bedeutung gleiche Proteinmengen einzusetzen.

Um dies zu gewährleisten, wird der BCA (Bicinchoninsäure)-Assay zur Gesamtprotein-Bestimmung verwendet. Grundlage dieses Assays ist die Umwandlung von zweiwertigem Cu^{2+} zu einwertigem Cu^{+} im Basischen durch Proteine sowie die anschließenden Detektion des einwertigen Kupfers durch eine Reaktion mit der namensgebenden Bicinchoninsäure. Die Bicinchoninsäure geht mit Cu^{+} einen violetten Komplex ein, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden kann. Die Bildung des Cu^{+} ist dabei jeweils direktproportional abhängig von der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit sowie der während der Inkubation herrschenden Temperatur [143,148,149].

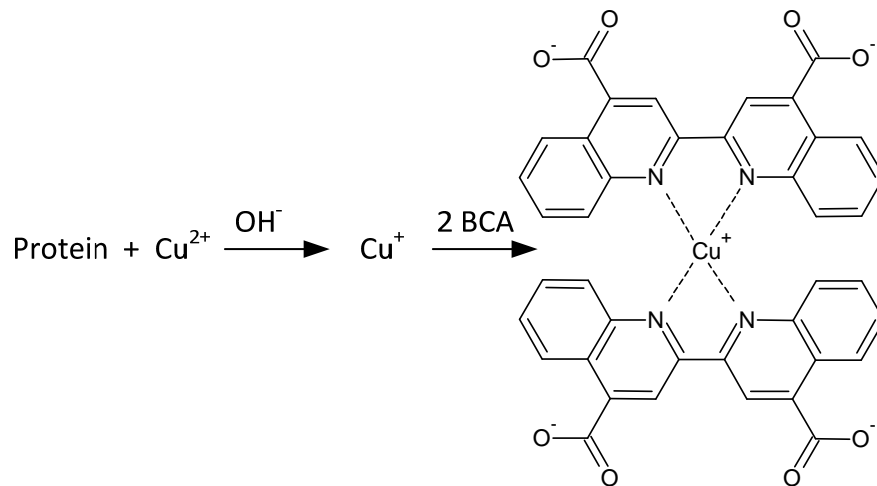


Abbildung 26 Chemische Grundlage des Bicinchoninsäure-Assays

Durch in der zu untersuchenden Probe befindliche Proteine wird zweiwertiges Kupfer zum einwertigen Kupfer reduziert. Das einwertige Kupfer bildet anschließend mit der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex der kolorimetrisch detektiert werden kann. Aus [143].

Als Referenzsubstanz für den Assay wird Albumin bekannter Konzentrationen eingesetzt. Die zu untersuchenden Proben werden mit Millipore Wasser im Verhältnis 1:20 und 1:50 verdünnt.

Die Inkubation findet über einen Zeitraum von 60 min bei einer Temperatur von 60 °C statt. Die Validität der Ergebnisse wird durch zusätzliche mitlaufende Albumin-Qualitätskontrollen sichergestellt. Die anschließende Messung der Absorption erfolgt an einem Plattenreader bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.2.8.3. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der bei der Zellyse gewonnenen und durch die BCA-Methode quantifizierten Proteingemische findet mittels Gelelektrophorese statt.

Vor der eigentlichen elektrophoretischen Trennung werden die Proteine durch eine Vorinkubation mit zweifach konzentriertem, SDS-haltigem Laemmli-Probenpuffer über 30 min denaturiert. Die Lysate werden auf einen Proteingehalt von 25 µg in einem Gesamtvolumen von 10-50µL eingestellt. Die verwendeten Gele besitzen einen Polymerisationsgrad zwischen 7,5 % und 12,5 % und ermöglichen somit ein Auftrennen nach Molekulargröße. Für den Trennvorgang wird eine Spannung von 200 V über eine Laufzeit von 45 min angelegt.

3.2.8.4. Western Blot

Die aufgetrennten Proteine werden anschließend auf eine Roti®-PVDF Membran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen der Membran werden für eine Stunde mit Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit TBS-T werden die Membranen über 60 min mit 10 mL des primären Antikörpers bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff werden die Membranen über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Der sekundäre, HRP-markierte Antikörper wird über 90 min inkubiert. Im Anschluss finden erneut zwei Waschschriffe mit TBS-T statt.

Die Detektion der jeweiligen Proteinbanden findet durch Zugabe einer 1:1 Mischung des Peroxid-Reagenz mit dem Luminol-Reagenz statt. Diese dient dem HRP als Substrat und führt zu einer Chemolumineszenz die als Bild aufgenommen werden kann.

3.2.9. Dynamische Massenumverteilung

Das Epic® System von Corning Incorporated eignet sich zur Betrachtung der Bindung von Liganden an ihren G-Protein gekoppelten Rezeptor.

Grundlage dieser auch als Dynamische-Massenumverteilung (DMR dynamic mass redistribution) bezeichneten Messtechnik ist die Tatsache, dass die Aktivierung eines G-Proteins aufgrund des Signalisierungsmechanismus zu Umverteilungsvorgängen innerhalb der Zelle führt.

Wird ein Zellmonolayer auf einer optisch dichten, aber noch durchlässigen Schicht aufgebracht und die Zellschicht mit polychromatischem Licht eines breiten Spektrums bestrahlt, findet abhängig von der aktuellen Zusammensetzung der Zellschicht eine Totalreflektion einer bestimmten Wellenlänge statt. Diese lässt sich mittels einer CCD Kamera bestimmen.

Nach Kalibrierung auf eine experimentspezifische Grundwellenlänge, lassen sich GPCR-vermittelte Massenumverteilungsprozesse als Reflektionswellenlängenänderung darstellen.

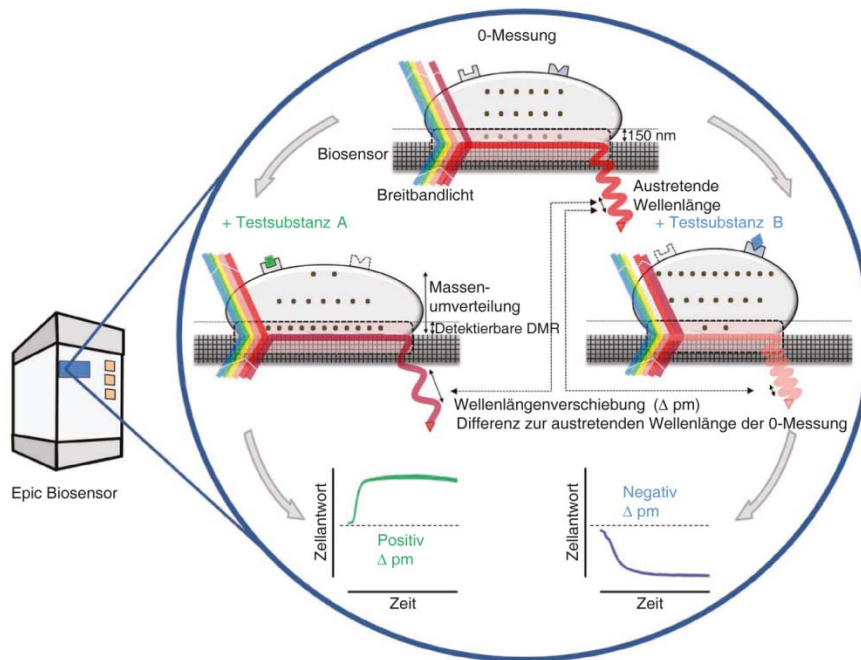


Abbildung 27 Messprinzips der Dynamischen Massenumverteilung

Modifiziert nach [150].

Die Messungen werden in den Laboren des AK Kostenis entsprechend des publizierten Protokolls durchgeführt [150].

Subkonfluente Zellen werden aus ihren Zellkulturflaschen gelöst und in einer Konzentration von 10.000 Zellen pro Well in eine spezielle 384-Well Epic Platte ausgesät.

Die Zellen lässt man über einen Zeitraum von 24 h auf der Platte anwachsen, sodass sich eine konfluente Zellschicht ausbildet. Freie Stellen können zu Messfehlern führen.

Die Zellen werden zweimalig mit jeweils 50 μL DMR Puffer (HBSS mit 20mM HEPES) gewaschen und anschließend in 30 μL Puffer suspendiert sowie auf 37°C temperiert.

Die zu untersuchenden Substanzen, Lyso-PC sowie die Positivkontrolle Forskolin und AlF_4^- werden nach einer Equilibrierungsphase des Biosensors durch einen Autosampler aus einer separaten Compound 384-Well Platte zugegeben.

3.2.10. Statistische Auswertung

Alle Überprüfungen auf statistische Signifikanz wurden in GraphPad Prism 5 mittels one-way ANOVA-Test bei einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt. Im Anschluss an den ANOVA-Test wird der Turkey Multiple Comparison Test durchgeführt. Nicht signifikante Unterschiede sind in allen Diagrammen nicht gesondert ausgewiesen. Vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken gekennzeichnet. Ein Signifikanzniveau von 0,05 entspricht „*“ ein Signifikanzniveau von 0,01 entspricht „**“ und ein Signifikanzniveau von 0,001 entspricht „***“.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Toxizität von LysoPC und Bindung an BSA

Wie in der Theorie der Lipide ausgeführt nimmt LysoPC an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen teil. In der Konsequenz bieten sich natürlich auch zahlreiche potentielle Erklärungen für seine Wirkung. Betrachtet man, losgelöst von klassischen pharmakodynamischen Rezeptor-Ligand-Interaktionen, seine reinen physikalischen Eigenschaften, tritt besonders die des Detergenz in den Vordergrund. LysoPC-Mizellen zeigen sich dabei in der Lage transmembranäre Proteine zu solubilisieren [151].

Nähert sich die Konzentration eines Tensids seiner kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC), findet neben der Einlagerung in Zellmembranen zunehmend eine Solubilisierung von Membranproteinen statt [152]. Eingesetzt bei der Lyse von Zellen sowie der Auftrennung von Proteinen in der Gelelektrophorese, führt dies unweigerlich zum Absterben der Zelle. Bedenkt man, dass die CMC von LysoPC bei 0,4 μM liegt [153] und in den meisten verwendeten Assays mit 450 μM vielfache Konzentrationen davon verwendet werden, stellt sich natürlich verständlicherweise trotz des BSA-Zusatzes die Frage nach möglichen zelltoxischen Effekten.

Grundlage für deren Ausschluss ist die Arbeit von Jantscheff et al [38]. Dort konnte mithilfe eines Bromdesoxyuridin-Assays (BrdU) gezeigt werden, dass potentielle Proliferations-mindernde Effekte von C16:0 und C17:0 LysoPC in B16.F10-Zellen durch einen zweiprozentigen BSA Zusatz vollständig aufgehoben werden konnten. Aus dieser Arbeit resultiert auch der entsprechende in allen Experimenten verwendete BSA-Zusatz.

4.1.1. Murines Zellsystem B16.F10

4.1.1.1. MTT

Für die beiden in dieser Arbeit vorkommenden LysoPC-Derivate LysoPC C18:0 (Stearinsäure) und LysoPC C18:1 (Ölsäure) wurde die Untersuchung auf Toxizität mit Hilfe des MTT-Viabilitäts-Assays durchgeführt. Steigende Konzentrationen von LysoPC wurden in Gegenwart sowie in Abwesenheit eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes auf

B16.F10 Zellkulturen gegeben und im Anschluss an die Inkubationszeit, die MTT-Metabolisierung der Zellen kolorimetrisch bestimmt.

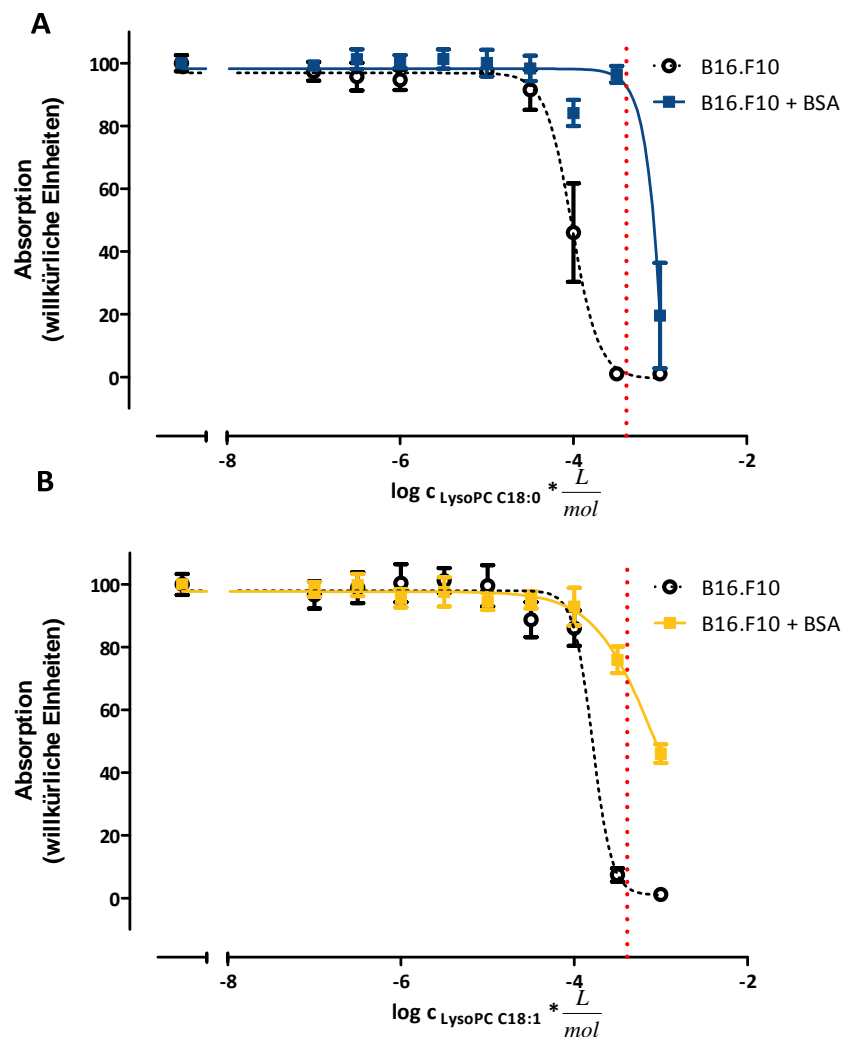


Abbildung 28 MTT-Assay Ergebnisse von B16.F10-Zellen

Gezeigt sind die MTT-Assay Ergebnisse von über 72 h mit LysoPC C18:0 (A) und LysoPC C18:1 (B) behandelten B16.F10 Zellen in logarithmischer Darstellung. Die nichtlineare Regression der Messwerte ohne weiteren BSA-Zusatz (Kreise) ist dabei gestrichelt gezeichnet. Die nichtlineare Regression der Messwerte von Zellen mit zwei prozentigem BSA-Zusatz (ausgefüllte Rechtecke) ist als durchgehende Linie gezeichnet. Die senkrechte, gestrichelte rote Linie bei einem Wert von -3,3 stellt den Logarithmus der Standardkonzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ dar. Fehlerbalken zeigen Standardfehler (SEM).

Im Zuge des MTT-Assays zeigt sich auch eine klare BSA-Bindung des LysoPCs. Eine Konzentration von 450 $\mu\text{mol/l}$ entspricht dabei einem dimensionslosen logarithmischen Wert von -3,3. Die zum Teil fehlenden Werte höherer Konzentrationen sind experimentellen Limitierungen geschuldet. Aufgrund der hohen Viskosität der benötigten Lösungen und dem realen Lösungsverhalten konnten sie

entweder nicht hergestellt oder im Rahmen des Assays nicht quantitativ appliziert werden. In Einklang mit den BrdU-Messungen aus [38] zeigt das C18:0 LysoPC-Derivat durch den BSA-Zusatz keine deutliche Viabilitätseinschränkung der B16.F10-Zellen. Die scheinbare Toxizität des LysoPC C18:1 in Abbildung 28B dürfte dabei zum Teil auch einer Überkonfluenz geschuldet sein.

Die Grundannahme des MTT Assays ist eine konstante MTT-Metabolisierung pro Zeiteinheit, wodurch das gebildete Formazan proportional zur Anzahl der Zellen ist. Wachsen Zellen jedoch so intensiv, dass sie den Zustand eines Zellmonolayers überschreiten oder das Angebot an Nährstoffen nicht ausreicht, können sie unter Umständen ihren Metabolismus soweit einschränken, dass MTT-Messungen auf eine vermeidliche Proliferationsminderung hindeuten [154]. Denn trotz der prinzipiellen Immortalität von Krebszellen können diese natürlich weiterhin aufgrund von Unterversorgung sterben. Betrachtet man die MTT-Assay-Ergebnisse der B16.F10 Zellen unter Einfluss von LysoPC C18:1 in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes nach 24 h Inkubationszeit sowie nach 48 h Inkubationszeit, zeigt sich sogar eine Steigerung der Proliferation. Da eine Toxizität mit 72 stündiger Latenz nach initialer Proliferationsteigerung aber als unwahrscheinlicher anzusehen ist, als eine dauerhaft erhöhte Proliferation mit resultierender Überkonfluenz nach 72 h, darf davon ausgegangen werden, dass das C18:1 LysoPC Derivat auch noch nach 72 h keine Toxizität aufweist.

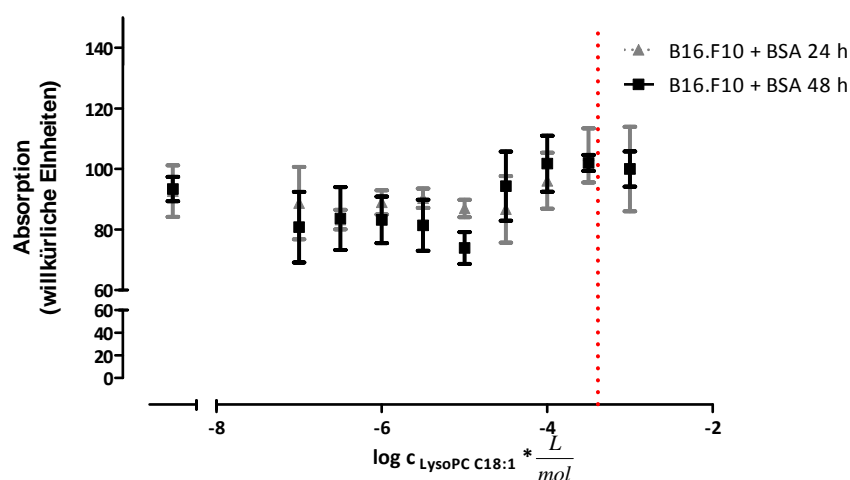


Abbildung 29 MTT Assay von B16.F10 Zellen

Gezeigt sind die MTT-Assay Ergebnisse von über 24 h (graue Dreiecke) und 48 h (schwarze Quadrate) mit LysoPC C18:1 behandelten B16.F10 Zellen in logarithmischer Darstellung. Bei allen Konzentrationen war ein

zwei-prozentiger BSA-Zusatz vorhanden. Die senkrechte, gestrichelte rote Linie bei einem Wert von -3,3 stellt dabei den Logarithmus der Standardkonzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ dar.

Neben dem Angebot an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren kann die Proliferation natürlich auch noch durch weitere Faktoren, wie dem Alter der Zellkultur [155] oder auch der Rigidität der jeweiligen Zellumgebung [156] beeinflusst werden.

Auch sollte man beachten, dass bei adhärennten Zellen die Zellproliferation an das Vorhandensein von Adhäsionen geknüpft ist, auch wenn dieser Kontrollmechanismus in neoplastischen Zellen unter Umständen dereguliert sein kann [157].

LysoPC beeinflusst beim B16.F10 Zellsystem nachweislich das Integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) [38] und mutmaßlich noch weitere Integrine in ihrer Funktionalität. Gerade Integrine spielen aber eine bedeutende Rolle in der Steuerung der Proliferation durch Beeinflussung des Zellzyklus adhärennter Zellen [86]. Im Zuge einer möglichen durch Membranveränderungen induzierten Integrinderegulation ist somit natürlich eine temporäre Proliferationsminderung möglich, ohne jedoch die Zellen als solche nachhaltig zu schädigen.

4.1.1.2. Calcium-Haushalt

Als weiteren Marker für die Viabilität der Zellen wird der Calcium-Haushalt betrachtet. Calcium ist eines der vornehmlich extrazellulär vorkommenden Ionen. Intrazellulär ist es größtenteils im Endoplasmatischen Retikulum gespeichert. Der Konzentrationsunterschied zwischen extrazellulär $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol/L und intrazellulär $1 \cdot 10^{-7}$ mol/L [158] führt dazu, dass einströmende Calcium-Ionen einen wichtigen Second-Messenger bei intrazellulären Signalisierungsprozessen darstellen. Es erscheint daher auch plausibel, dass eine Deregulation der Calcium-Homöostase weitreichende Folgen für die physiologischen Vorgänge innerhalb der Zelle hat. So sind auch einige Zelllinien in ihrer Zellteilung von einem Calcium-Influx abhängig [159].

Gerade da beschrieben wurde, dass LysoPC durch Membranveränderungen generell die Leitfähigkeit von Ionenkanälen beeinflussen kann [160] und konkret die LysoPC-induzierte Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentration antimigrativ wirkt [161], wird nachfolgend der Calcium-Haushalt der Zellen betrachtet. Dabei wird allerdings nicht wie in vorherigen Arbeiten der Fokus auf transiente Änderungen in Folge einer kurzzeitigen Exposition gelegt, sondern auf die langfristigen Änderungen

als Konsequenz einer 72-stündigen LysoPC-Inkubation und einer 30-minütigen CaCl_2 Inkubation.

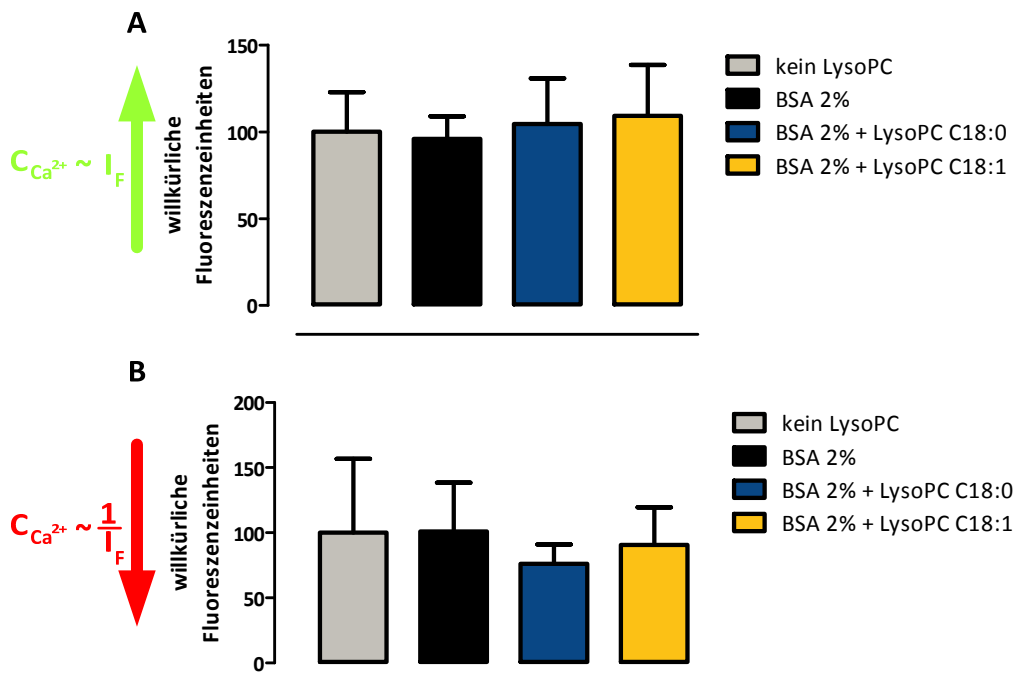


Abbildung 30 Intrazelluläre Calciumkonzentration B16.F10 Zellen

Mit der direktproportionalen Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonde Calcium-Green-1 (A) und der indirektproportionalen Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonde Fura-Red (B) wird mittels durchflusszytometrischer Messung die intrazelluläre Calcium-Konzentration von B16.F10 Zellen bestimmt. Die Inkubation mit dem jeweiligen LysoPC-Derivat in einer Konzentration von $450 \mu\text{mol/L}$ sowie dem zweiprozentigen BSA-Zusatz beträgt 72 h. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

In Abbildung 30 ist zu sehen, dass sich der intrazelluläre Calciumhaushalt in B16.F10-Zellen nur in sehr geringem Ausmaß unter der Langzeit-Einwirkung von verschiedenen LysoPC-Derivaten in Gegenwart von BSA verändert. Dabei deutet die direkt proportionale Fluoreszenzsonde Calcium-Green-1 durch steigende Fluoreszenz und die indirekt proportionale Fluoreszenzsonde Fura-Red durch sinkende Fluoreszenzwerte auf eine marginale Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration hin. Die leichte Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration deckt sich dabei mit den Berichten über den transient erhöhten Calcium-Influx.

4.1.2. Humanes Zellsystem MV3

4.1.2.1. MTT

Bei der humanen Melanomzelllinie MV3 zeigt sich, wie auch bei der murinen B16.F10-Zelllinie, für beide LysoPC-Spezies eine klare Reduktion des LysoPC-Effekts durch den BSA-Zusatz. Während die Effekte von LysoPC C18:1 noch analog zu denen in der B16.F10 Zelllinie zu bewerten sind, zeigt sich beim vollständig gesättigten C18:0 Derivat ein anderes Bild. Selbst mit BSA-Zusatz bewirkt LysoPC C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/l}$ eine deutliche Reduktion der Formazan-Produktion.

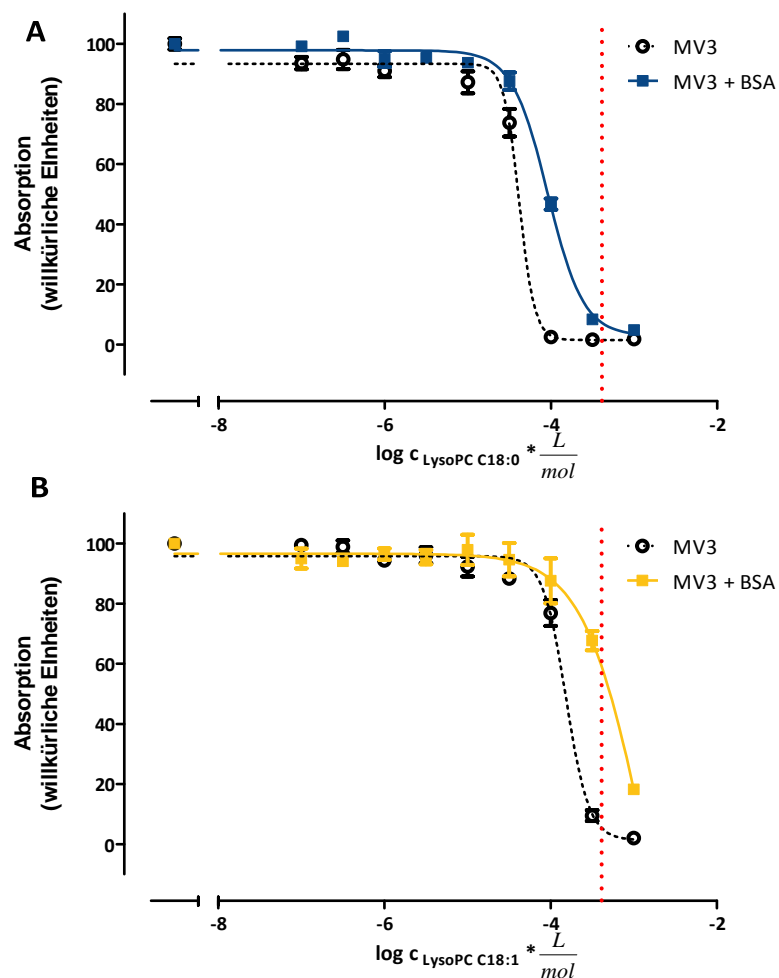


Abbildung 31 Assay Ergebnisse mit MV3-Zellen

Gezeigt sind die MTT-Assay Ergebnisse von über 72 h mit LysoPC C18:0 (A) und LysoPC C18:1 (B) behandelten MV3 Zellen in logarithmischer Darstellung. Die nichtlineare Regression der Messwerte ohne weiteren BSA-Zusatz (Kreise) ist dabei gestrichelt gezeichnet, die nichtlineare Regression der Messwerte von Zellen mit zwei prozentigem BSA-Zusatz (ausgefüllte Rechtecke) ist als durchgehende Linie gezeichnet. Die senkrechte, gestrichelte rote Linie bei einem Wert von -3,3 stellt dabei den Logarithmus der Standardkonzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ dar. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM).

Es gibt zwar Berichte, dass MTT-Assays durch chemische Detergenzien und andere oberflächenaktive Proteine in Richtung scheinbarer höherer Toxizität verfälscht werden können, indem das eigentlich in wässrigen Medien unlösliche Formazan solubilisiert und somit vor der Zugabe von DMSO aus den Platten gelöst wird [162,163]. Genauso lassen sich aber auch Untersuchungen finden, die in umgekehrter Richtung von einer Unterschätzung der Proliferationshemmung durch MTT-Assays berichten [164]. Auch wird dem MTT-Assay bei der Untersuchung wachstumshemmender Effekte von Cytokinen, verglichen mit dem BrdU-Assay, eine zu geringere Sensibilität zugesprochen [165]. Geht man nun davon aus, dass sich diese Fehlerquellen kompensieren, und der MTT-Assay zumindest eine grobe Abschätzung der Viabilität erlaubt, ist daher mit Sicherheit davon auszugehen, dass LysoPC C18:0 im humanen MV3-Zellsystem eine Proliferationsminderung bewirkt.

Es kann hier natürlich eine simple Toxizität des LysoPCs vorliegen. Ein anderer Erklärungsansatz ist die schon bei der B16.F10 Zelllinie angesprochene reduzierte Adhäsion. So zeichnete sich die MV3-Zelllinie doch auch schon in Abwesenheit von LysoPC während der gesamten Forschungsarbeit durch eine bedeutend geringere Adhäsionsfreudigkeit als die B16.F10 Zelllinie aus.

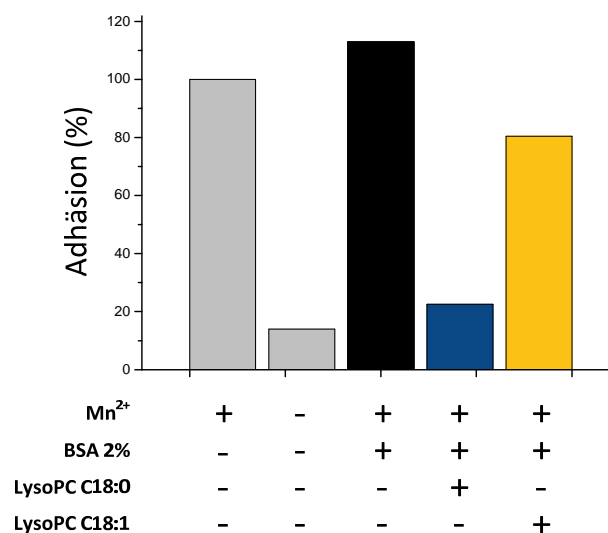


Abbildung 32 Zelluläre Adhäsion von MV3-Zellen und Flussbedingungen

Gezeigt ist die zelluläre Adhäsion von MV3-Zellen gegen rekombinantes humanes VCAM-1 unter physiologischen Flussbedingungen nach zwei Sekunden normalisiert auf die mittlere Adhäsion der unbehandelten Zellen. Zellen wurden als Vorbereitung über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 µmol/L unter einem zweiprozentigen BSA-Zusatz kultiviert. Mn²⁺ als Integrinsuperagonist zeigt die maximale Adhäsion der Zellen.

In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass die in [38] für die B16.F10 Zelllinie beschriebene Minderung der VLA-4 Adhäsion unter LysoPC-Einfluss auch bei MV3 Zellen auftritt. Diese reduzierte Adhäsion könnte, natürlich aufgrund der bekannten Zusammenhänge zwischen Adhäsion und Zellzyklusprogression [166,167], eine reduzierte Proliferation bewirken.

Erste Hinweise auf eine mögliche Verbindung zwischen einer Veränderung der Wahrnehmung der Extrazellulären Matrix und der Zellproliferation beim MV3-Zellsystem sind in [168] beschrieben. So führt doch dort eine verstärkte Hyaluronsäure-Produktion der MV3 Zellen zu einem temporären antiproliferativen Effekt mit Arrest in der G1/G0 Phase des Zellzyklus, der durch enzymatischen Abbau der Hyaluronsäure reversibel ist.

4.1.2.2. Ca^{2+} -Haushalt

Betrachtet man in Abbildung 33 den Calcium-Haushalt der MV3 Zellen nach LysoPC Langzeiteinwirkung über 72 h zeigt sich, dass das MV3-Zellsystem, bezogen auf seinen Calcium-Haushalt, bedeutend sensibler auf Umgebungseinflüsse reagiert als das zuvor untersuchte B16.F10 Zellsystem. Die Kombination der direktproportionalen Fluoreszenzsonde Calcium-Green-1 mit der indirekt proportionalen Fluoreszenzsonde Fura-Red zeigt dabei auch hier in sich konsistente Ergebnisse.

Alleine der zweiprozentige BSA Zusatz führt zu einer tendenziellen Reduktion der Calciumkonzentration. Dies ist besonders im Hinblick darauf interessant, dass BSA in anderen Publikationen mit einem erhöhten Calcium Influx assoziiert wird [169].

Bezogen auf die Behandlung mit zweiprozentigem BSA führt die Behandlung mit dem gesättigten LysoPC-Derivat C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart des gleichen BSA-Zusatzes zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Anstieg liegt sogar über dem Level der vollständig unbehandelten Zellen. Das einfach ungesättigte LysoPC Derivat C18:1 in gleicher Konzentration mit BSA-Zusatz bewirkt hingegen keinen deutlichen Unterschied zur reinen BSA-Behandlung und liegt bezüglich der Calciumkonzentration auch unterhalb der unbehandelten Zellen.

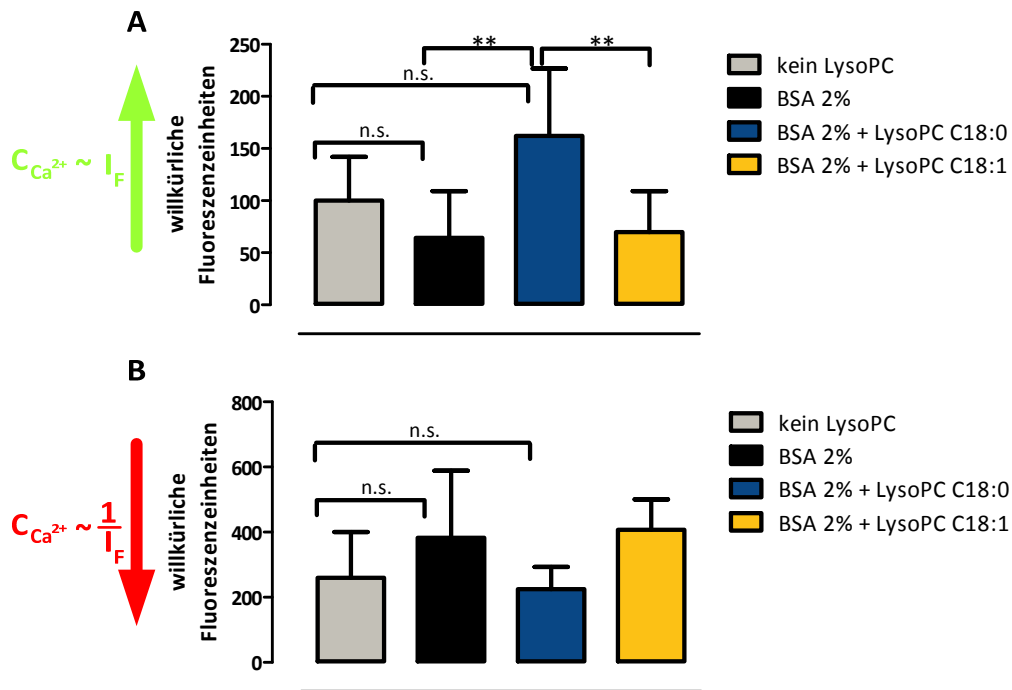


Abbildung 33 Intrazelluläre Calciumkonzentration MV3-Zellen

Mit der direktproportionalen Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonde Calcium-Green-1 (A) und der indirektproportionalen Calcium-sensitiven Fluoreszenzsonde Fura-Red (B) wird mittels durchflusszytometrischer Messung die intrazelluläre Calcium-Konzentration von MV3 Zellen bestimmt. Die Inkubation mit dem jeweiligen LysoPC-Derivat in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ sowie dem zweiprozentigen BSA-Zusatz beträgt 72 h. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichung (SD).

Es zeigt sich also, dass vollständig gesättigtes LysoPC C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ und einer Inkubationsdauer von 72 h in der Lage ist den Calciumhaushalt von MV3 Zellen längerfristig zu verändern. Dies ergänzt die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die bei humanen Zelllinien eine transiente Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration als Konsequenz einer LysoPC Exposition zeigen konnten [170,171].

Gerade im Hinblick auf Toxizität mag jetzt sicherlich schnell das Argument aufkommen, dass die massenhafte intrazelluläre Calcium-Freisetzung mit anhaltend und nicht nur transient erhöhten Calcium-Spiegeln einen Konzertierungsmechanismus der Apoptose darstellt [172,173]. Gegen diesen Einwand spricht allerdings die Betrachtung der beiden Apoptose-vermittelnden Initiatorcaspasen 8 und 9. Die für den extrinsischen Apoptoseweg verantwortliche Caspase-8 zeigt in Abbildung 34 eine leichte Reduktion

der Expression und die für den intrinsischen Apoptoseweg verantwortliche Caspase-9 sogar eine deutliche Reduktion [174].

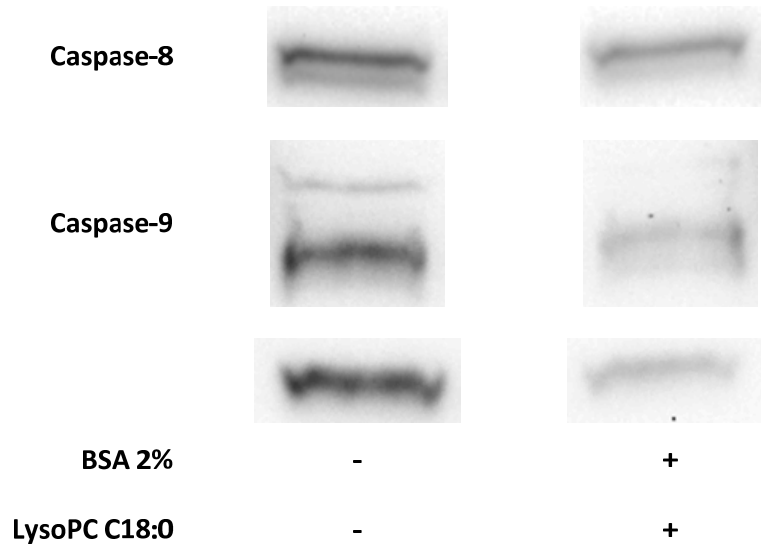


Abbildung 34 Westernblot von Caspasen in MV3 Ganzzelllysaten

Aus für 72 h mit 450 $\mu\text{mol/L}$ LysoPC C18:0 in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelten Zellen oder gänzlich unbehandelten Vergleichszellen werden Lysate gewonnen und auf Proteinkonzentration normalisiert.

Bedenkt man, dass LysoPC in vorherigen Untersuchungen einen antimetastatischen Effekt hat, erstaunt dies besonders im Hinblick darauf, dass eine Reduktion der Caspase-Expression eine schwierigere Targetierung von Zellen im Zuge antineoplastischer Therapien bedeutet [175].

Auch zeigen sich in der lichtmikroskopischen Projektion von MV3-Zellen nach 72 h Inkubation im LysoPC C18:0-haltigem Medium einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ weitestgehend intakte Zellen, die sich zum Teil sogar durch einen mesenchymalen Phänotyp auszeichnen.

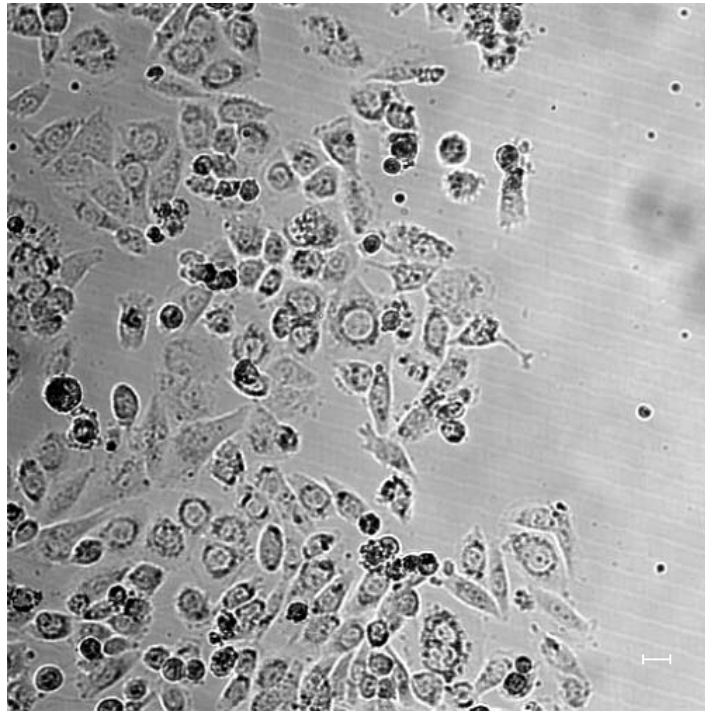


Abbildung 35 Lichtmikroskopische Aufnahme von MV3-Zellen unter LysoPC Behandlung

Die Aufnahme wurde erstellt im Rahmen der zweidimensionalen Wundheilungsassays. Gezeigt sind MV3-Zellen nach 72 h Inkubation mit LysoPC C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$. Der Maßstab unten rechts entspricht 25 μm .

Gerade im Hinblick auf die vorhergehenden Untersuchungen mit der Charakterisierung von LysoPC als antimetastatisch wirkende Substanz erstaunt dies sicherlich. So gilt die Induktion einer EMT doch als prometastatischer Effekt. Konsequenterweise wird in den nachfolgenden Experimenten ein Fokus auf die Migration der Zellen gelegt.

4.1.3. Zusammenfassung Viabilität

Beim B16.F10 Zellsystem konnten die Beobachtungen der zugrundeliegenden Arbeiten weitestgehend bestätigt werden. LysoPC zeigt keine nennenswerte Toxizität in gegebenem Zellsystem. Der marginal erhöhte Calciuminflux deckt sich dabei mit publizierten Beobachtungen. Die marginale Proliferationsminderung in durchgeführten Experimenten ist dabei sicherlich der reduzierten Adhäsion geschuldet, wodurch Zellen in Rahmen der Waschschriffe schneller entfernt wurden. Auch ist anzumerken, dass sich die kritischen Mizellenbildungskonzentrationen der beiden LysoPC Derivate C18:0 und C16:0 um den Faktor 10 unterscheiden ($\sim 4 \mu\text{mol/L}$ beim C16:0 zu $0,4 \mu\text{mol/L}$ beim C18:0) Damit wäre dem LysoPC C18:0 bei gleicher Konzentration eine höhere Toxizität als Detergenz zuzuschreiben [176].

Beim MV3 Zellsystem zeigt sich ein etwas anderes Bild.

Wenngleich gerade aufgrund der Westernblot-Daten wie auch der mikroskopischen Aufnahmen mit mesenchymalem Phänotyp, eine tatsächliche Apoptose als unwahrscheinlich anzusehen ist, deutet doch sehr viel auf ein weitestgehend dereguliertes Zellsystem mit einer Tendenz zur EMT hin. LysoPC scheint in der verwendeten Konzentration einen bedeutend höheren Einfluss auf zelluläre Funktionen zu haben, als dies im B16.F10-Zellsystem der Fall ist. Vergleiche zwischen den Daten der beiden Zellsysteme sind daher nicht nur im Hinblick auf die humane und murine Herkunft der Zellsysteme zu interpretieren, sondern auch im Hinblick auf den Grad der Deregulierung zellulärer Signalisierungswege.

Für weitere Arbeiten kann sich daraus ein interessanter Ansatz ergeben. So konnten in anderen Publikationen doch Parallelen zwischen der Apoptose und der Induktion von EMT gezogen werden, gerade im Hinblick auf TGF- β (Transforming Growth Factor) als eines der involvierten Signalisierungsmoleküle. Welcher dieser beiden Prozesse dann tatsächlich eintritt, scheint im gleichen Zellsystem nur von dem aktuellen Status im Zellzyklus abhängig zu sein. Gerade der Einfluss von LysoPC auf den Zellzyklus und noch viel mehr die Assoziation von LysoPC mit der TGF- β -Akkumulation, stellen somit sicherlich eine interessante Grundlage für zukünftige Arbeiten dar [177–181].

4.2. Zweidimensionale Wundheilung

Die Metastasierung ist ein multifaktorieller Prozess, der aufgrund zahlreicher Interaktionen zwischen neoplastischen Zellen und Zellen des betroffenen Organismus in vitro nur sehr schwer vollständig nachzustellen ist.

Als ein mindestens so robustes wie anschauliches Modell stellt sich die zweidimensionale Migration heraus. Hierbei lässt man Zellen subkonfluent auf einer Oberfläche anwachsen, erzeugt eine Verletzung dieses Zellgewebes und misst anschließend die Geschwindigkeit der Wundheilung.

4.2.1. B16.F10

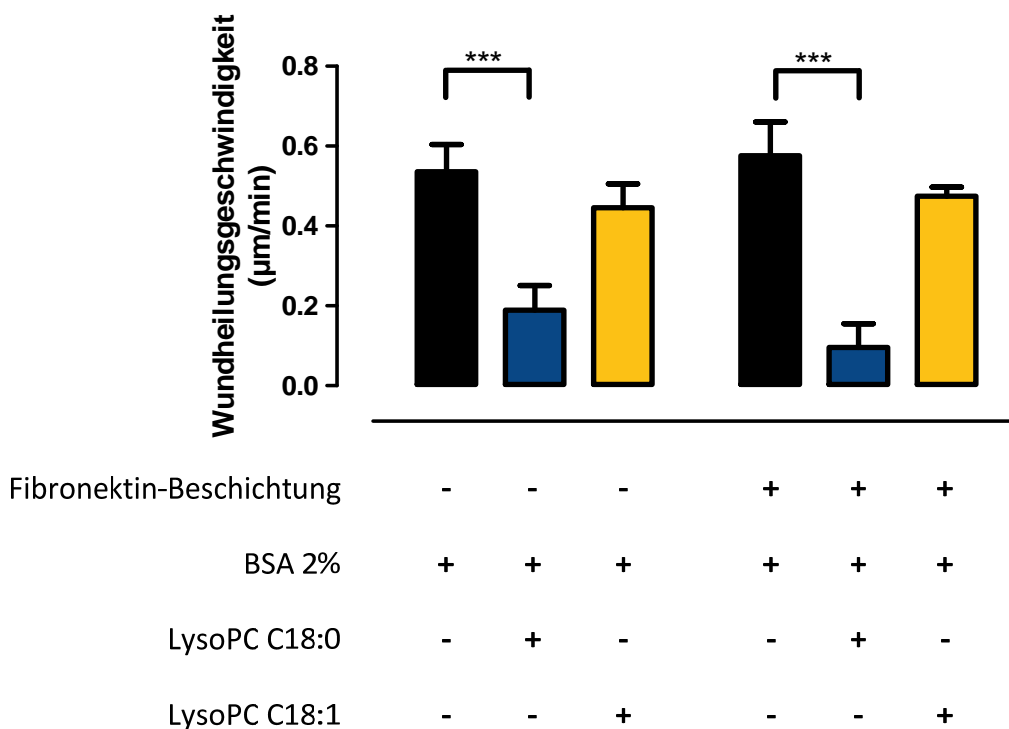


Abbildung 36 Zweidimensionale Migration von B16.F10-Zellen

Gezeigt ist die Wundheilungsgeschwindigkeit von B16.F10-Zellen auf zweidimensionalen Oberflächen mit und ohne Fibronectin-Beschichtung, nach 72 h Inkubation im LysoPC-haltigen Medium einer Konzentration von jeweils 450 µmol/L und einem zweiprozentigem BSA-Zusatz sowie als Referenz nur mit BSA-Zusatz. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* p=0,05; ** p=0,01; *** p=0,001). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Lässt man die Zellen auf unbehandelten 24-Well Zellkultur-Platten anwachsen, findet unter der reinen BSA-Vergleichskontrolle die Reduktion der Zellwunde mit einer Geschwindigkeit von 0,535 µm/min statt. Die Behandlung mit dem vollständig

gesättigtem LysoPC Derivat C18:0 führt zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit auf 0,189 $\mu\text{m}/\text{min}$. Dieser Migrations-verlangsamende Effekt ist unter Einfluss des einfach ungesättigten LysoPC Derivats C18:1 zwar auch noch vorhanden, aber mit einer resultierenden Geschwindigkeit von 0,445 $\mu\text{m}/\text{min}$ in bedeutend geringerem Ausmaß.

Es existiert somit auf funktionaler Ebene ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Sättigung der LysoPC-assoziierten Fettsäure und der resultierenden Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit.

Lässt man B16.F10 Zellen auf einer Fibronectin-beschichteten Oberfläche anwachsen, zeigt sich ein prinzipiell sehr ähnliches Bild mit dem einzigen Unterschied, dass nun die Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit ausgeprägter ist. Zum einen zeigen die BSA-Kontroll-Zellen mit 0,575 $\mu\text{m}/\text{min}$ eine leicht erhöhte Migrationsgeschwindigkeit auf Fibronectin-beschichteter Oberfläche, verglichen mit der Standard-Oberfläche. Zum anderen bewegen sich die LysoPC C18:0 behandelten Zellen mit 0,095 $\mu\text{m}/\text{min}$ nur noch mit halber Geschwindigkeit, verglichen mit unbehandelter Oberfläche unter gleicher LysoPC Behandlung. Die Behandlung mit LysoPC C18:1 führt auf der Fibronectin-beschichteten Oberfläche mit einer Wundheilungsgeschwindigkeit von 0,474 $\mu\text{m}/\text{min}$ zu ähnlichen Ergebnissen wie auf unbehandelter Oberfläche.

Dieser Teil der Ergebnisse wirft ein besonderes Licht auf den Einfluss von Fibronectin. So zeigt das Glykoprotein der Extrazellulären Matrix doch in den meisten Versuchen eine gesteigerte Adhäsion. Experimentell wird dies auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, wenn durch LysoPC Adhäsions-supprimierte Zellen trotz zahlreicher Waschschriffe auf Oberflächen festgehalten werden sollen, ohne jedoch eine Fixierung durch Aldehyde vorzunehmen. Die leichte Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit unbehandelter Zellen lässt sich daher durch eine erhöhte Adhäsion erklären.

Auf den ersten Blick schwieriger zu erklären erscheint sicherlich die größere Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit unter LysoPC C18:0 Einfluss auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen.

Wenngleich vorhergehende Arbeiten zeigen konnten, dass gesättigte LysoPC-Derivate zu einer reduzierten VLA-4 und P-Selectin vermittelten Adhäsion führen [Jantscheff Mol Cancer Ther 2011], bleibt festzuhalten, dass immer noch eine Adhäsion

stattfindet, da sonst offensichtlich keine Zellen mehr auf der Oberfläche zurückbleiben würden.

Die reduzierte Migration kann das Ergebnis einer weiter reduzierten Adhäsion sein, sodass die Zelle nicht mehr in der Lage ist in hinreichendem Maß Zellmatrix Kontakte zu knüpfen, um genügend kraftschlüssige Verbindungen für eine gerichtete Bewegung auszubilden. Ein weiterer Erklärungsversuch besteht darin, dass auf die Zellen eine Art Selektionsdruck ausgeübt wird, mit der Konsequenz, dass eine adhäsive Überkompensation stattfindet. Die Störung einzelner Adhäsionsmoleküle wird durch Überaktivierung anderer ausgeglichen. Die Zelle kann nun unter Umständen gebildete Adhäsionen nicht mehr aktiv lösen, sondern nur noch durch Abschälen der Zellbereiche. In der Konsequenz findet natürlich eine deutliche Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit statt.

4.2.2. MV3

Trotz der merklichen Unterschiede bei der Betrachtung des Calciumhaushaltes lassen sich die im murinen Zellsystem B16.F10 gefundenen Zusammenhänge bezüglich der Migration, wie nachfolgend gezeigt, auch auf das humane MV3-System übertragen. Auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen führt der Zusatz von LysoPC C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatz zu einer signifikanten Reduktion der Wundheilungsgeschwindigkeit von 0,416 $\mu\text{m/min}$ hinzu 0,098 $\mu\text{m/min}$. Der Zusatz des einfach ungesättigten LysoPC-Derivats C18:1, bei ansonsten gleichen Konditionen, führt hingegen nur zu einer leichten Reduktion der Wundheilungsgeschwindigkeit auf 0,327 $\mu\text{m/min}$. Somit besteht auch beim MV3 Zellsystem ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Sättigung der LysoPC-assoziierten Fettsäure und der resultierenden Wundheilungsgeschwindigkeit.

Der Einfluss der Fibronectinbeschichtung lässt sich im Gegensatz zum B16.F10-Zellsystem nicht quantitativ beschrieben, ist aber dennoch existent, da in Abwesenheit von Fibronectin aufgrund der generell reduzierten Adhäsionsfähigkeit von MV3 Zellen Messungen gar nicht erst möglich waren.

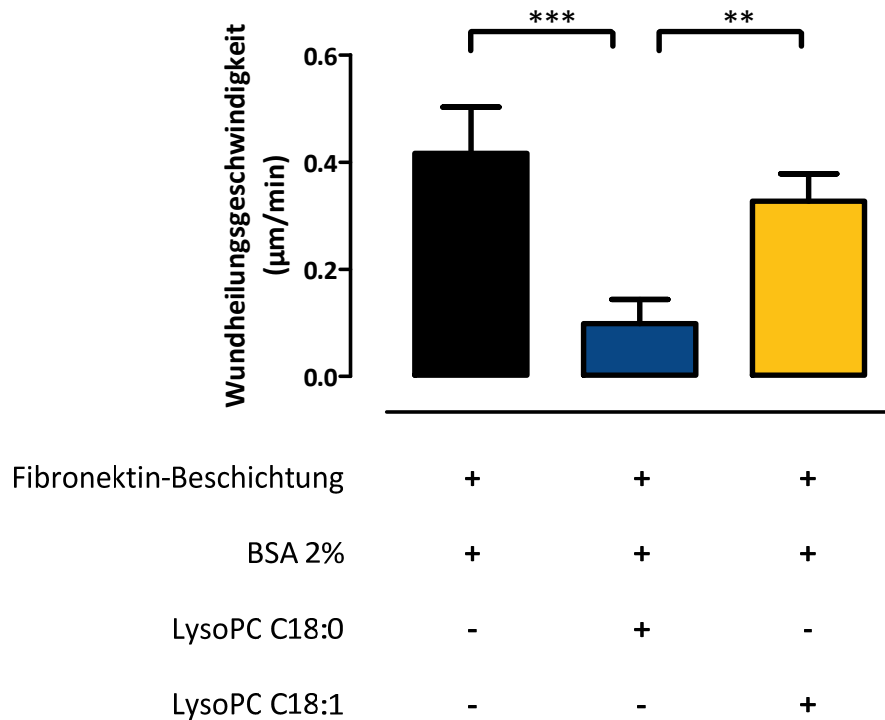


Abbildung 37 Zweidimensionale Migration von MV3-Zellen

Gezeigt ist die Wundheilungsgeschwindigkeit von humanen MV3-Zellen auf zweidimensionalen Oberflächen mit Fibronektin-Beschichtung, nach 72 h Inkubation im LysoPC-haltigen Medium einer Konzentration von jeweils 450 µmol/L und einem zwei Prozentigem BSA-Zusatz sowie als Referenz nur mit BSA-Zusatz. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* p=0,05; ** p=0,01; *** p=0,001). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Die Analogie der Ergebnisse der Wundheilungsmessungen beider Zellsysteme bestärkt uns in dem bestehenden Verdacht, dass auch im MV3-Zellsystem keine toxischen Effekte für die Wirkung von LysoPC verantwortlich sind.

4.2.3. Zusammenfassung Migration

Die Ergebnisse der Migrationsuntersuchungen führen zu zwei Arbeitshypothesen, die im Zuge der weiteren Versuche betrachtet werden sollen.

Die gezeigte Korrelation zwischen dem Grad der Sättigung der LysoPC assoziierten Fettsäure und der resultierenden Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit hat einen kausalen Zusammenhang, der in einer Veränderung der Membranfluidität zu suchen ist. Die vermutete Veränderung der Membranfluidität führt zu einer Veränderung der Funktionalität von Membran-assoziierten Adhäsionsmolekülen sowie den an ihrer Aktivierung beteiligten Signalisierungsmolekülen, insbesondere den Syndecanen und Intergrinen.

4.3. Membranfluidität

In der Arbeit von Raynor et al. [182]¹ konnte gezeigt werden, dass MV3 Zellen wie auch B16.F10 Zellen die LysoPC-assoziierte Fettsäure aufnehmen und in die Zellmembran in Form von Phospholipiden einbauen können. Generell ist bekannt, dass das Cholesterol-Phospholipid-Verhältnis maßgeblich die Fluidität einer Biomembran beeinflusst und sich dabei die resultierende Rigidität proportional mit steigendem Phospholipid-Anteil erhöht [183]. Im B16.F10 Zellsystem wurde beschrieben, dass eine Reduzierung der Membranfluidität durch einen Ethanol-Zusatz, gemessen mittels Fluoreszenzpolarisation, zu einer gesteigerten Migration führt [184].

Für Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass LysoPC C16:0 zu einer Reduktion der Migration führt. Dieser Effekt wird durch einen gleichkonzentrierten α -Tocopherolzusatz nahezu kompensiert. Antioxidative Effekte konnten ausgeschlossen werden und ein Zusammenhang zwischen Membranmikroviskositätsveränderung und reduzierter Migration aufgezeigt werden. Allerdings beschrieben Ghosh et al. eine reduzierte Mikroviskosität durch LysoPC und eine Wiederherstellung der Ursprünglichen durch Zusatz von α -Tocopherol. Im Unterschied zu den Untersuchungen dieser Arbeit wurden jedoch ein anderes Zellsystem und das Palmitinsäure-LysoPC-Derivat auch nur in einer Konzentration von 20 $\mu\text{mol/L}$ und über einen Zeitraum von 22 h eingesetzt. In der Arbeit von Ghosh et al. [185] wurde darüber hinaus erwähnt, dass es ein Membranviskositätsoptimum gibt und höhere wie auch geringere Viskositäten zur Reduktion der Migration führen. Auch konnten intrazelluläre Relokalisierungen der an der Migration beteiligten GTPase Rac verdeutlicht werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass sich in dem funktionellen Migrationsassay für beide Melanom-Zelllinien Zusammenhänge zwischen der Sättigung der Fettsäure und dem resultierenden antimetastatischen Effekt zeigen, stellt sich natürlich die Frage, ob die in [182] präsentierte Modifikation der Lipidzusammensetzung der Zellmembran auch in den beiden Melanomzelllinien zu einer Veränderung der Membranfluidität führt.

¹ An der zitierten Veröffentlichung ist auch der Autor dieser Dissertation als Mitautor beteiligt gewesen. Als eigener Anteil wurden unter anderem die in Kapitel 4.3.3 näher betrachteten FRAP-Messungen vorveröffentlicht.

4.3.1. Fluoreszenzanisotropie

Die Fluoreszenzanisotropie ist ein reziprokes Maß für die örtliche Beweglichkeit innerhalb einer flüssigkristallinen Struktur. Eine Steigerung des dimensionslosen Anisotropiewerts entspricht somit einer erhöhten Mikroviskosität.

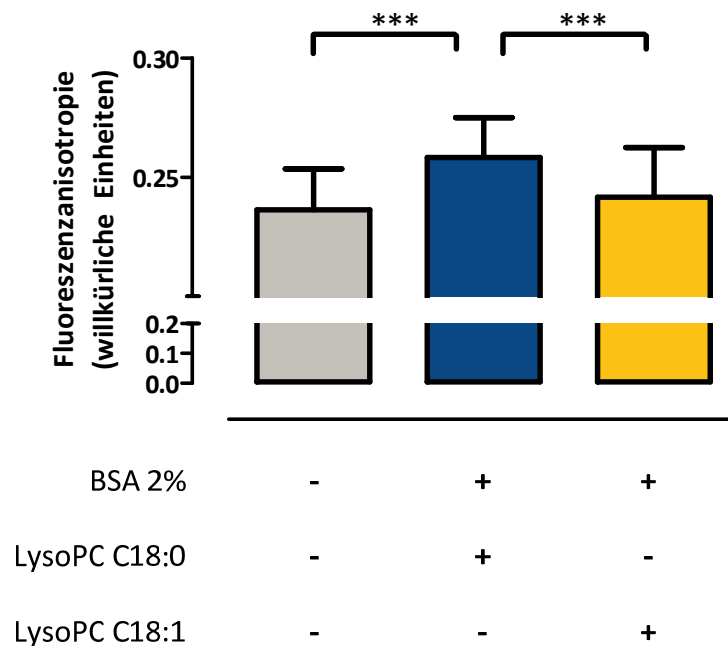


Abbildung 38 Fluoreszenzanisotropie Messungen MV3

Fluoreszenzanisotropiemessungen von MV3-Zellen, die zuvor mit LysoPC C18:0 und LysoPC C18:1 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{m/L}$ in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes über einen Zeitraum von 72 h behandelt wurden sowie die Kontrollmessung mit vollständig unbehandelten Zellen. Ein Anstieg der Fluoreszenzanisotropie entspricht dabei einer Erhöhung der Mikroviskosität. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Angewendet an MV3-Zellen zeigt sich unter Einfluss von LysoPC C18:0, ausgehend von einem dimensionslosen Anisotropiewert von 0,236, eine deutliche Rigidisierung der Zellmembran hinzu 0,258. Der Effekt des fluideren LysoPCs C18:1 ist dabei mit einem Anstieg auf 0,241 bedeutend geringer ausgeprägt.²

Für das MV3-Zellsystem kann somit gezeigt werden, dass die LysoPC-induzierte Reduktion der Migration auch mit einer Veränderung der Mikroviskosität der Zellmembran einhergeht. Aufgrund von anhaltenden technischen Problemen war eine Messung der B16.F10 Zellen nicht möglich.

² Die gezeigten Daten entstammen der eigenen 2012 veröffentlichten Masterarbeit [186].

4.3.2. AFM

Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der Membranfluidität ist die Rasterkraftmikroskopie. Bekannt ist diese Methode im biologischen und technischen Bereich zur nahezu räumlichen Bildgebung kleinster Strukturen.

Der Cantilever wird dabei in möglichst konstantem Abstand zur Probe gehalten. Höhenunterschiede der zu untersuchenden Probe bewirken im Bereich von wenigen Mikrometern Abstand über elektrostatische Kräfte, sowie Van-der-Waals Kräften in unmittelbarer Nähe zur Probe, eine Auslenkung des Cantilevers. Diese Auslenkung wird mittels eines Photodetektors registriert. Aus der resultierenden vertikalen Repositionierung des Cantilevers mittels Piezokristallen kann anschließend das Relief-artige Bild der betrachteten Oberflächenstruktur gewonnen werden.

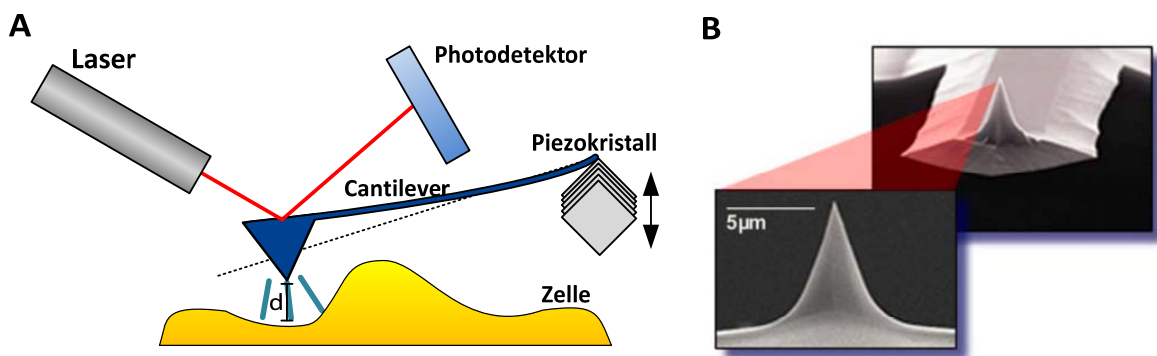


Abbildung 39 Prinzip AFM-Messung und Detailaufnahme Cantilever

A Skizzierter Messaufbau bei der Verwendung der Rasterkraftmikroskopie als bildgebendes Verfahren. Der Cantilever wird dabei in konstantem Abstand d entlang der Probe geführt. Etwaige Veränderungen dieses Abstandes durch Höhenunterschiede der Probe können mittels eines Photodetektors registriert werden und führen zu einer vertikalen Repositionierung des Cantilevers in einen neuen Ruhezustand. Basierend auf [187]
B Abbildung eines Cantilevers, entnommen aus [188]

Wird jedoch die Blattfeder nicht bei konstantem Abstand über die gesamte Probe geführt, sondern taucht in die zu vermessende Probe ein, können von diesen Punkten Weg-Kraft-Messungen durchgeführt werden.

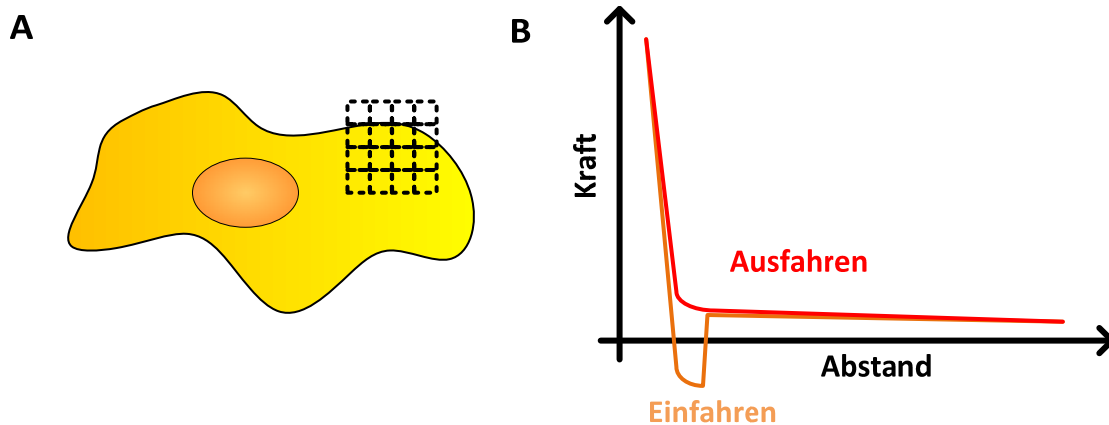


Abbildung 40 Schematische Darstellung der Bestimmung des Elastizitätsmoduls

Für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls werden von einzelnen Punkten eines in **A** skizzierten Ausschnitts der Zelle Kraft-Weg-Diagramme aufgenommen. Diese sind schematisch in **B** gezeigt. Basierend auf [187].

Aus dem Kraft-Weg-Diagramm für das Eindringen der Blattfeder in die Probe und dem anschließenden Wiederausfahren lässt sich für Bereiche der Zelle der Elastizitätsmodul als Maß für die Verformbarkeit berechnen. Aus der Heatmap der bestimmten Elastizitätsmodule lässt sich anschließend per Pixeldichtenanalytik der mittlere Elastizitätsmodul der Zelle berechnen.

$$E = \frac{\text{Spannung}}{\text{Dehnung}} = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{A_0}}{\frac{\Delta L}{L_0}} = \frac{FL_0}{A_0\Delta L}$$

Abbildung 41 Berechnungsgrundlage des Elastizitätsmodul

F : wirkende Kraft; A_0 : Querschnitt des Körpers; ΔL : Längenänderung; L_0 : Anfangslänge

Geringe Elastizitätsmodul-Werte entsprechen dabei einer hohen Elastizität, hohe Werte, wie die in der Heatmap in Abbildung 42 weiß dargestellten Glasobjektträger, entsprechen einer hohen Rigidität [187].

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Christian Gorzelanny von der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg wurden die folgenden Messungen durchgeführt.

Zellen wurden zuvor auf ibidi μ -Dish Petrischalen kultiviert und einer entsprechenden LysoPC-Behandlung unterzogen. Nach Abschluss der Behandlung fand eine Fixierung mit 1 mL einer 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung in PBS für 30 min bei einer Temperatur von 4°C statt. Die eigentliche Messung der fixierten Zellen erfolgte an einem JPK Nanowizard entsprechend den etablierten Protokollen [189–191].

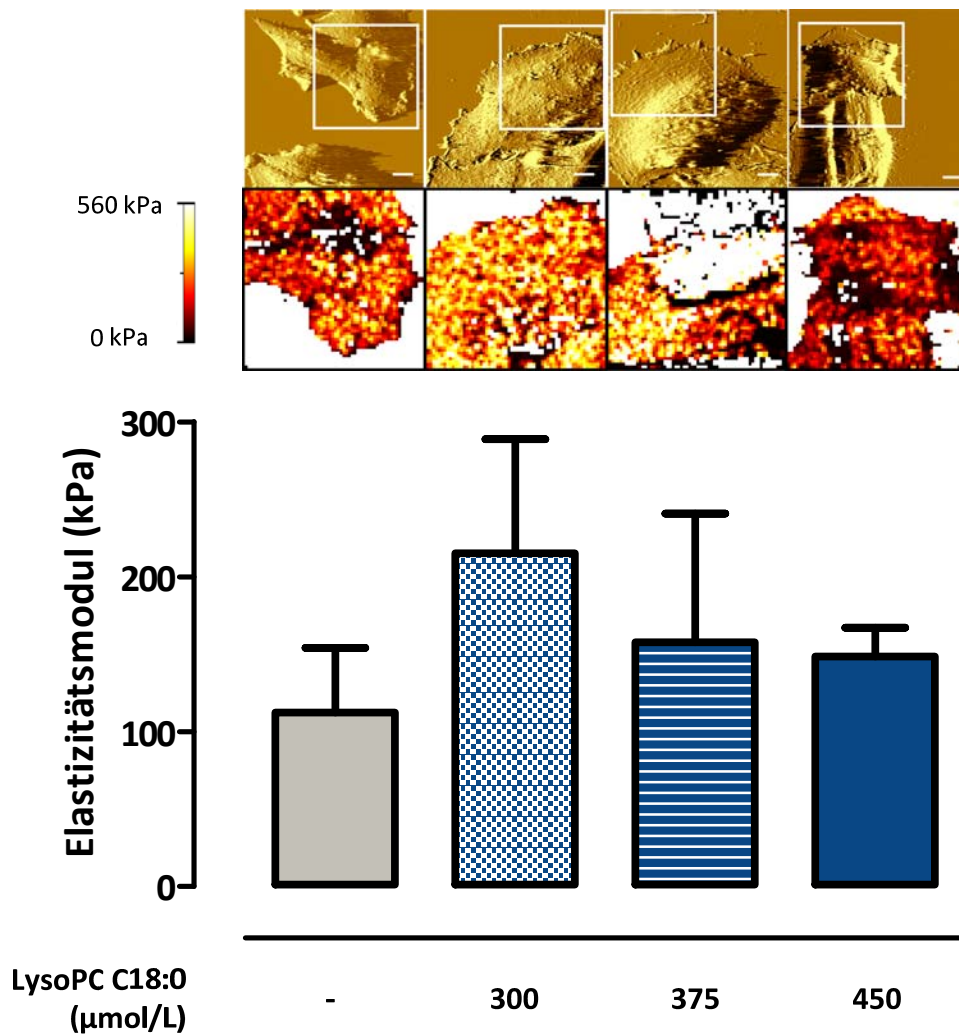


Abbildung 42 AFM-Messungen von MV3-Zellen

In der obersten Reihe sind repräsentative Rasterkraftmikroskopie-Aufnahmen der MV3-Zellen gezeigt, in denen der jeweils für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls gewählte Ausschnitt mittels eines weißen Rechtecks markiert wurde. In der darunter liegenden Reihe wird der Elastizitätsmodul der entsprechenden Bereiche als Heatmap dargestellt.

Aus allen durchgeführten Messungen wird mittels Pixeldichtenanalyse der mittlere Elastizitätsmodul bestimmt. Die Zellen sind unbehandelt oder zuvor mit dem gesättigten LysoPC-Derivat C18:0 über 72 h unter einem zweiprozentigem BSA-Zusatz inkubiert worden. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD).

Bei Betrachtung von MV3-Zellen zeigt sich grundsätzlich eine Rigidisierung der Zellen in Form der Erhöhung des Elastizitätsmoduls durch eine LysoPC C18:0 Präinkubation. Dabei führt die Konzentration von 300 μmol/L über einen Zeitraum von 72 h mit 215,14 kPa zu der deutlichsten Erhöhung, verglichen mit einem Wert von 112,32 kPa bei unbehandelten Zellen. Zunächst überraschend erscheint, dass die höhere LysoPC-Konzentration von 375 μmol/L mit 157,58 kPa und im Besonderen die höchste Konzentration von 450 μmol/L mit 148,44 kPa zu geringeren Elastizitätsmoduls-Werten

führt als die 300 $\mu\text{mol/L}$ Behandlung. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss man sich vor Augen führen, dass im Gegensatz zur Fluoreszenzanisotropie, bei der nur die örtliche Beweglichkeit innerhalb der Zellmembran betrachtet wird, bei der AFM-Messung eine Krafteinwirkung von außen stattfindet. Deren Abnehmer ist nicht mehr nur die Zellmembran alleine, sondern die gesamte Zelle, inklusive aller Strukturproteine.

Der resultierende LysoPC Effekt der 450 $\mu\text{mol/L}$ Behandlung kann somit zum Teil eine Konsequenz der zellulären Gegenregulation auf die veränderte Membranfluidität sein.

Auch ist anzumerken, dass die Zellen gerade unter der hohen LysoPC-Einwirkung verstärkt Filopodien ausbilden. Diese scheinen allerdings unter anderem durch Adhäsion mit dem Cantilever zu interagieren, wodurch die Messungen der höheren Konzentrationen generell mit Skepsis zu betrachten sind.

Ein weiterer möglicher limitierender Einflussfaktor dieser Methode ist die Fixierung mit Glutaraldehyd. Wenngleich die Fixierung für AFM-Messungen etabliert und aufgrund der Messdauer von ca. zwei Stunden auch zwingend notwendig ist, findet zwangsweise eine Veränderung der Membraneigenschaften statt. Bei der Betrachtung von Bakterien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Glutaraldehyd zu einer deutlichen Veränderung der Zelloberfläche führt, einhergehend mit einer Vergrößerung der Zellen [192]. Auch wenn Aldehyde im Gegensatz zu anderen chemischen Fixierungsreagenzien wie kaltem Methanol oder Aceton scheinbar nicht unmittelbar mit Lipiden interagieren, sorgt aber die starke Quervernetzung von Lipid-assoziierten Proteinen zu einer Fixierung [193,194]. Beeinflusst eine zu untersuchende Substanz, wie z.B. LysoPC, die strukturelle Ordnung der Zellmembran-assoziierten Proteine, ist es natürlich nicht auszuschließen, dass eine anschließende Glutaraldehyd-Fixierung diesen Einfluss für die AFM-Messung in nicht linearer Weise amplifiziert.

Abschließend lässt sich sagen, dass sich die Kraftmessung mittels Rasterkraftmikroskopie als nicht zielführend erwiesen hat, um die zugrunde liegende Fragestellung zu beantworten. Dennoch sind die Ergebnisse sicherlich ein weiterer Hinweis darauf, dass die Fluiditätsveränderung der Membran nicht alleinige Ursache der reduzierten Metastasierung von LysoPC behandelten Zellen ist, sondern vielmehr die Konsequenz für Membran-assoziierte Proteine und die zelluläre Reaktion auf diese.

Da der Zugang zu einem geeigneten Rasterkraftmikroskop an eine zeitlich befristete Kooperation gebunden war, konnten weder eine weitere Optimierung der Methode noch Messungen der B16.F10 Zelllinie durchgeführt werden.

4.3.3. Fluoreszenzwiederherstellung nach Photobleichen (FRAP)

Die vorhergehenden Untersuchungen zur Membranfluidität unterstützen stark die Hypothese, dass in biophysikalischer Betrachtung nicht zwingend die plastische Verformbarkeit der Zellmembran dem LysoPC Effekt zugrunde liegt, sondern die Beweglichkeit von Proteinen innerhalb der Zellmembran. Konnte mittels der Fluoreszenzanisotropie der Einfluss auf die örtliche Beweglichkeit für das MV3-Zellsystem gezeigt werden, soll nun mit der bedeutend differenzierteren Fluoreszenzwiederherstellung nach Photobleichen Technologie (FRAP) die laterale Beweglichkeit innerhalb der Zellmembran betrachtet werden.

Hierbei lagert sich ein Fluoreszenz-markiertes Lipid in der Plasmamembran ein und wird durch einen Laser punktuell bis zum Ausbleichen der Fluoreszenz angeregt. Die exponentielle Kinetik der Fluoreszenzwiederherstellung durch Diffusion intakter Fluorophore wird anschließend aufgenommen und durch den Parameter des Zeitpunkts der halbmaximalen Wiederherstellung beschrieben.

Diese Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederherstellung ist proportional zur Rigidität der Membran. Ist eine Diffusion sehr leicht möglich findet die Wiederherstellung bedeutend schneller statt als bei einer durch Rigidisierung erschwerten Diffusion.

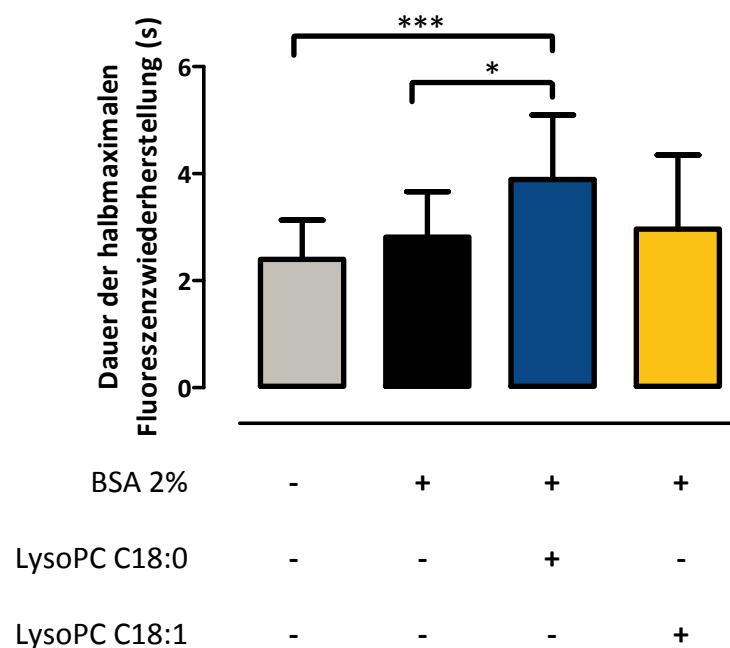


Abbildung 43 FRAP Messung von B16.F10 Zellen

Gezeigt sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen von über einen 72 stündigen Zeitraum mit dem jeweiligen LysoPC-Derivat in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelten B16.F10 Zellen sowie den entsprechenden Vergleichskontrollen. Unmittelbar vor der Messung wurden die Zellen mit dem NBD-PE C18:1 Derivat für 30 min bei 37°C inkubiert. Höhere Werte entsprechen einer erschwerten lateralen Diffusion innerhalb der Membran. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Bei B16.F10 Zellen bewirkt die Behandlung mit den gesättigten LysoPC-Derivat C18:0 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ verglichen mit unbehandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Dauer bis zum Zeitpunkt der halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung von 2,4 s auf 3,9 s. Auch signifikant ist der Anstieg der LysoPC-Behandlung bezogen auf die ausschließliche Behandlung mit dem zweiprozentigen BSA-Zusatz mit einer Dauer von 2,8 s. Die Behandlung mit dem einfach ungesättigten LysoPC-Derivat C18:1 zeigt hingegen mit einer Dauer der halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung von 3,0 s nur eine nicht signifikante Tendenz zu einer Verlangsamung.

Konkret bedeuten diese Ergebnisse, dass die Fluoreszenz-markierten Lipide sich unter LysoPC-Einfluss langsamer innerhalb der Membran bewegen können, was in letzter Konsequenz auf einen Anstieg der Rigidität innerhalb der B16.F10 Zellmembran schließen lässt.

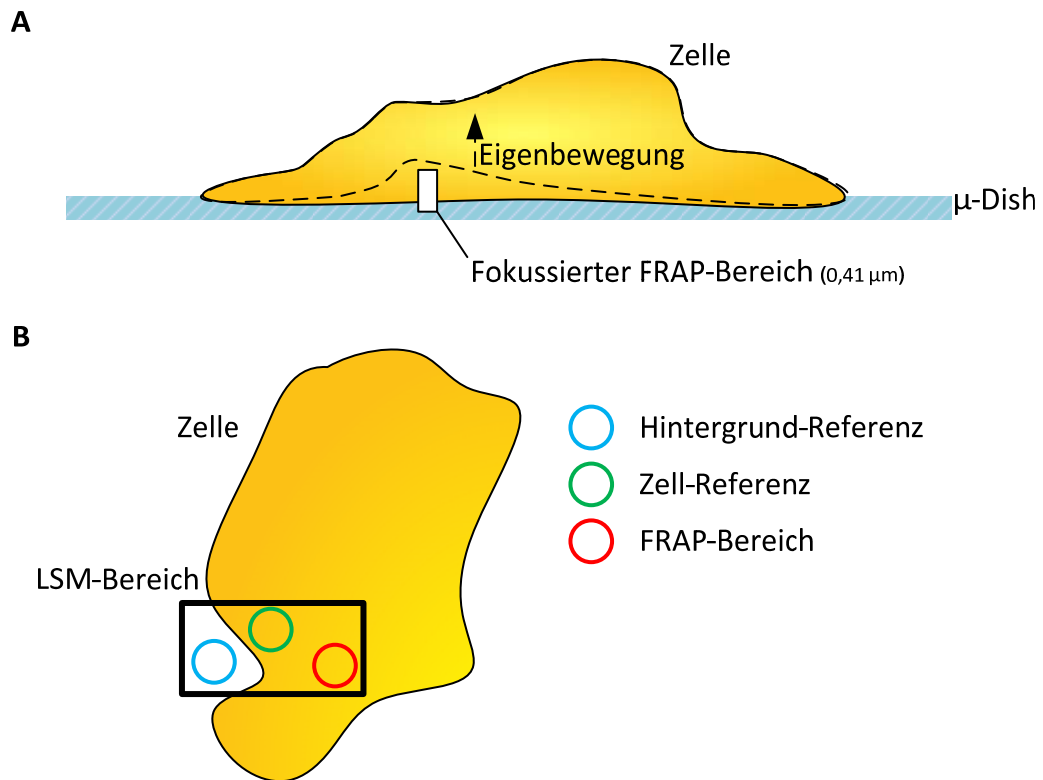


Abbildung 44 Schematische Darstellung von Problemen bei der FRAP-Messung

A Zu sehen ist eine im Querschnitt dargestellte Zelle. Für die eigentliche FRAP-Messung wird in einen Bereich in der apikalen Zellmembran fokussiert. Bewegt sich die Zelle innerhalb der 67 s dauernden Messung, reduziert sich die gemessene Fluoreszenzintensität in diesem Bereich nicht durch Auslösung, sondern dadurch, dass sich die gesamte Zellmembran aus dem betrachteten Bereich bewegt.

B Zu sehen ist die gleiche Zelle in Aufsicht, aus der Perspektive des Objektivs. Um die Eigenbewegung zu detektieren, werden neben dem eigentlichen FRAP-Bereich (rot) noch zwei weitere Bereiche betrachtet. Dabei handelt es sich um die auch innerhalb der Zelle liegende Zell-Referenz sowie die außerhalb der Zelle liegende Hintergrundreferenz.

In Abbildung 44 ist eine generelle Herausforderung bei FRAP-Messungen gezeigt. Die sichere Unterscheidung zwischen den erwarteten Fluoreszenzintensitätsveränderungen durch Bleaching und Diffusion des Fluorophors und den Artefakten durch die Eigenbewegung der Zelle findet durch zusätzliche Messpunkte statt.

Bei den gegebenen Bedingungen gibt es eine optische Eindringtiefe in die Zelle von $0,41 \mu\text{m}$ und einen betrachteten Bereich von $91,6 \mu\text{m}^2$. Bewegt sich die Zelle während der 67 s dauernden Messung, wird diese als fehlerhaft betrachtet.

Aufgrund der generell reduzierten Adhäsion der MV3-Zellen konnten diese allerdings trotz Fibronectin-Beschichtung nicht hinreichend lange immobilisiert werden, sodass keine Messungen erfolgreich durchgeführt werden kann.

Aufgrund der schon zuvor skizzierten Einflüsse einer Fixierung auf die Membranfluidität stellte dies keinen adäquaten Lösungsweg dar. Methanol und Aceton basierte Fixierungsstrategien haben selber einen Einfluss auf Lipide und dienen der Lipidextraktion [193]. Aldehyde führen zu einer Vernetzung von Proteinen und reduzieren damit die laterale Beweglichkeit [194]. Darüber hinaus zeichnet sich Glutaraldehyd durch eine die Messung störende Eigenfluoreszenz aus [195].

4.3.4. Zusammenfassung Membranfluidität

Auch wenn sich bei den einzelnen Betrachtungen bezüglich der Membranfluidität eine Vielzahl von experimentellen Limitierungen zeigte, ergibt sich dennoch eine klare Tendenz. LysoPC wird nicht nur in die Zellmembran eingebaut, sondern verändert diese auch in ihren Eigenschaften.

Die örtliche Beweglichkeit eines Fluorophors innerhalb der Zellmembran einer MV3-Zelle wird in Abhängigkeit von der Sättigung der LysoPC-assoziierten Fettsäure reduziert.

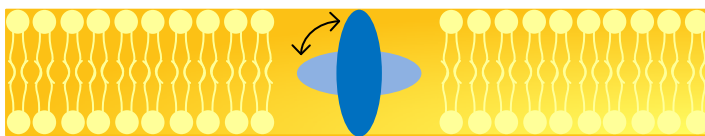


Abbildung 45 Schematische Darstellung der Fluoreszenzanisotropie

Die plastische Verformbarkeit einer MV3-Zelle wird durch die Behandlung mit dem gesättigten LysoPC-Derivat C18:0 ab einer Konzentration von 300 $\mu\text{mol/L}$ reduziert. Dieser Effekt nimmt allerdings mit steigender LysoPC-Konzentration wieder ab.

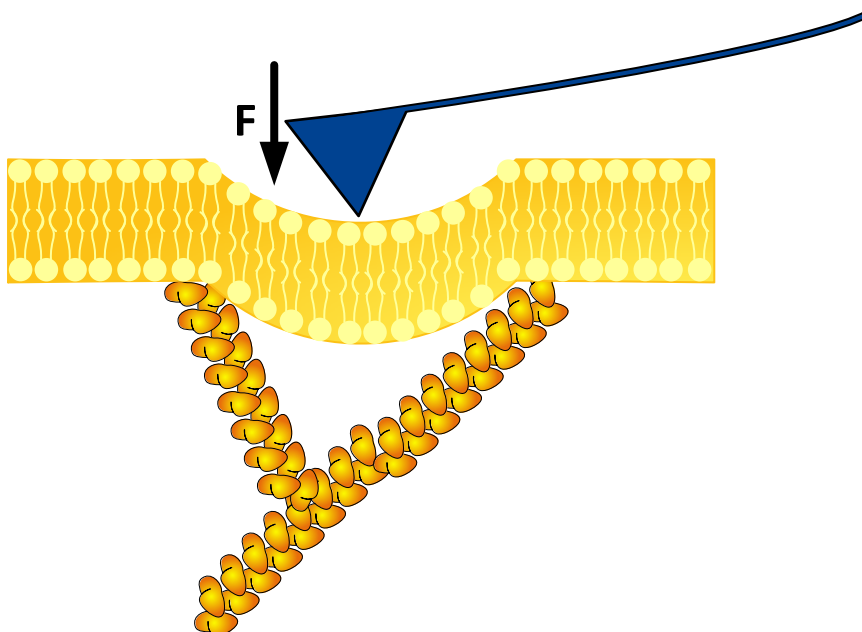


Abbildung 46 Schematische Darstellung der AFM-Messung

Die laterale Beweglichkeit eines fluoreszenzmarkierten Lipids innerhalb der Zellmembran von B16.F10 Zellen wird in Abhängigkeit von der Sättigung der LysoPC-assoziierten Fettsäure reduziert.

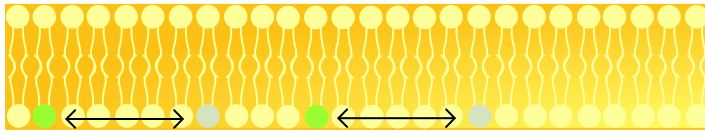


Abbildung 47 Schematische Darstellung der FRAP-Messung

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine LysoPC Inkubation zu einer Reduktion der Membranfluidität mit weitreichenden Folgen für Membran-assoziierte Signalisierungsmoleküle führt. Auch wenn nicht für jedes Zellsystem jeder Assay durchgeführt werden konnte, sind die gewonnenen Ergebnisse in sich konsistent.

Trotz des bei der AFM-Messung von MV3-Zellen beobachteten Phänomens, der wiederum sinkenden Viskosität mit steigender LysoPC-Konzentration, weisen auch in diesem Versuch die mit der höchsten LysoPC-Konzentration behandelten MV3-Zellen eine Rigidisierung im Vergleich mit den unbehandelten Zellen auf.

Dennoch deuten gerade die AFM-Ergebnisse darauf hin, dass der Einfluss von LysoPC auf die mechanische Verformbarkeit der Zellen sicherlich eher untergeordneter Natur ist. Deshalb wird der Fokus weiterer Experimente auf Membran-assoziierte Signalisierungsprozesse gelegt.

4.4. GPCR-Effekte

Neben seiner schon zuvor betrachteten Eigenschaft als Detergenz ist LysoPC sicherlich auch im Zusammenhang mit einer GPCR Stimulation sehr häufig in der Diskussion. Wenngleich die Eigenschaft des Abbauproduktes LysoPA als GPCR-Ligand weitestgehend unstrittig ist, ist die des LysoPC weiterhin ungeklärt.

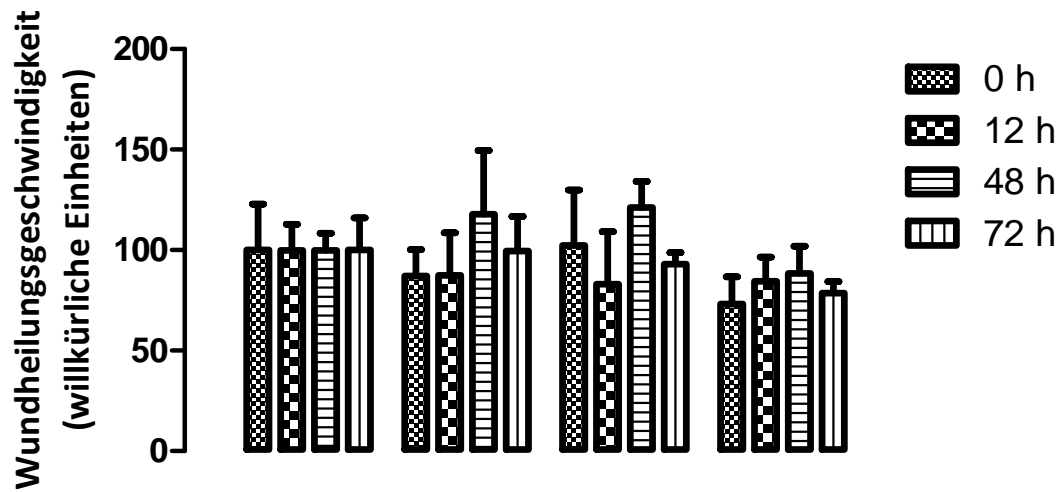
In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Manuel Grundmann von Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn wurde mittels dynamischer Massenumverteilung untersucht, ob LysoPC eine Eigenschaft als GPCR Ligand besitzt.

Dabei zeigte sich, dass aufgrund einer Interaktion von BSA mit dem Biosensor die bislang verwendeten Standardbedingungen von 450 μM LysoPC, 2 % BSA Zusatz und 72 h Inkubationszeit nicht vermessbar waren.

Als sehr gut durchführbar hingegen erwiesen sich Messungen der unmittelbaren Auswirkung von LysoPC auf die unbehandelte Zelle ohne weitere BSA-Zusätze. Aufgrund der obligaten Kultivierung in Zellkulturmedien mit Fötalen Kälberserum (FKS)-Zusatz existierte weiterhin eine minimale BSA-Konzentration von 35 $\mu\text{mol/L}$.

Basierend auf den in Kapitel 4.1.1.1 für das B16.F10-Zellsystem und in Kapitel 4.1.2.1 für das MV3-Zellsystem gezeigten MTT-Daten ergab sich ohne weiteren BSA-Zusatz eine maximale LysoPC-Konzentration von 30 $\mu\text{mol/L}$. Wenngleich diese obere Konzentration durchaus im Einklang mit anderen, sich mit LysoPC beschäftigenden Publikationen ist [33,35,170,171], ergibt sich dennoch das Problem, dass in diesem Konzentrationsbereich für die beiden innerhalb dieser Arbeit untersuchten Zellsysteme keine korrelierenden funktionellen Daten existieren.

Daher wird zunächst wie schon in Kapitel 4.2 beschrieben auch an dieser Stelle auf einen zweidimensionalen Wundheilungsassay zurückgegriffen. In logarithmischer Skalierung wird der Konzentrationsbereich von 0,3 $\mu\text{mol/L}$ bis 30 $\mu\text{mol/L}$ betrachtet. Aufgrund der zuvor stärker ausgeprägten Effekte auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen werden alle Versuche auf eben diesen durchgeführt.



Fibronectin-Beschichtung	+	+	+	+
BSA 35 µmol/L	+	+	+	+
LysoPC C18:0 (µmol/L)	-	0,3	3	30

Abbildung 48 Zweidimensionaler Wundheilungsassay von B16.F10-Zellen

Gezeigt ist die Wundheilungsgeschwindigkeit von B16.F10-Zellen auf zweidimensionalen Oberflächen mit Fibronectin-Beschichtung nach 0 h, 12 h, 48 h sowie 72 h Inkubation im LysoPC-haltigen Medium einer Konzentration von 0,3 µmol/L, 3 µmol/L und 30 µmol/L und einem BSA-Gehalt des Mediums von 35 µmol/L sowie als Referenz nur mit BSA-Zusatz normalisiert auf die Geschwindigkeit der jeweils unbehandelten Zellen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* p=0,05; ** p=0,01; *** p=0,001). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Betrachtet man die Ergebnisse in Abbildung 48, fällt zum einen auf, dass, verglichen mit den Effekten bei Konzentrationen von 450 µmol/L in Kapitel 4.2.1 keine der untersuchten Konzentrationen zu einer derart deutlichen Minderung der Wundheilungsgeschwindigkeit führt. Dennoch gibt es bei der höchsten Konzentration von 30 µmol/L eine Tendenz zur reduzierten Geschwindigkeit. Interessanterweise scheint die Inkubationszeit dabei keinen bedeutenden Einfluss zu haben, denn selbst die nicht vorbehandelten Zellen zeigen bei Kontakt mit LysoPC eine Reduktion der Wundheilungsgeschwindigkeit.

Dieser unmittelbare Zusammenhang zwischen Exposition und Wirkung nährt sicherlich nicht unbedingt Zweifel an den Gedanken einer klassischen Rezeptor-Ligand-Interaktion. Allerdings bewirkt auch innerhalb von Modellmembranen die reine Modifikation der Lipidzusammensetzung innerhalb von 12 h eine mengenmäßige Veränderung der Bildung von Integrindimeren [196].

4.4.1. Dynamische Massenumverteilung

Die Technologie der Dynamischen Massenumverteilung basiert auf der optischen Detektion intrazellulärer Proteindelokalisationen als Konsequenz einer GPCR-Stimulation.

Als Vergleichssubstanzen werden der GPCR-Superagonist AlF_4^- [197] sowie der Stimulator der Adenylylcyclase Forskolin [198] verwendet, deren optimale Konzentrationen in Vorversuchen ermittelt wurden.

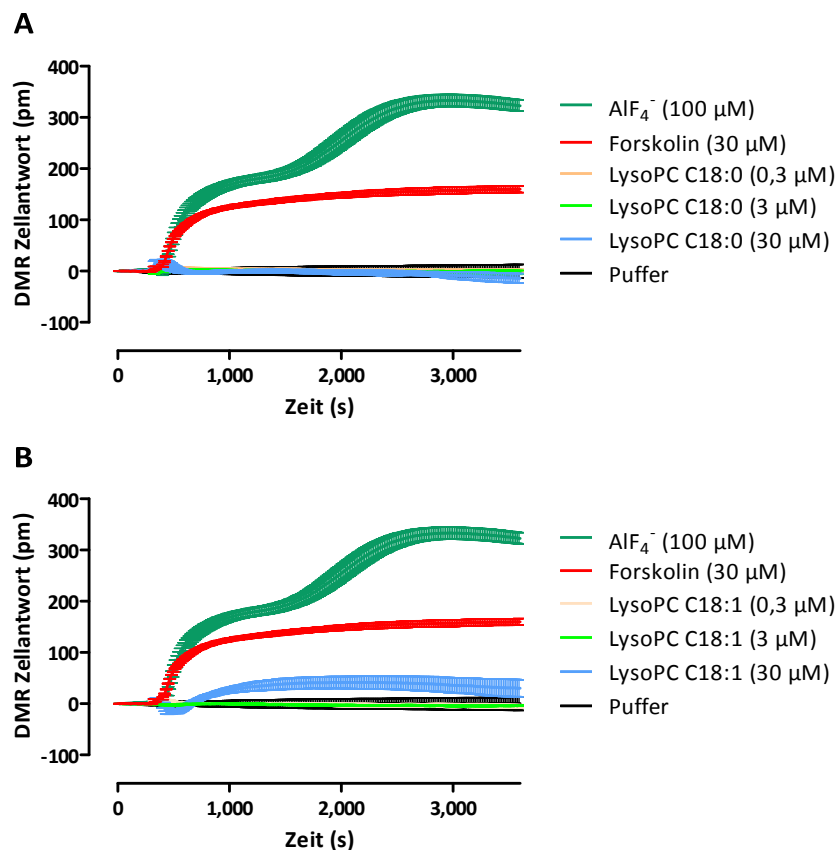


Abbildung 49 DMR-Messungen von B16.F10-Zellen

Dynamische Massenumverteilungs-Messungen von B16F10 Zellen auf Fibronectin-beschichteten Biosensoroberflächen. Zellen wurden zuvor in Abwesenheit von LysoPC kultiviert. Die Testsubstanz-Zugabe erfolgt zum Beginn der Messung. AlF_4^- sowie Forskolin dienen als Positiv-Kontrollen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Zu sehen ist das vollständig gesättigte LysoPC Derivat C18:0 in Konzentrationen von $0,3 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ und $30 \mu\text{M}$ sowie die beiden Positiv-Vergleichskontrollen Aluminiumfluorid und Forskolin, jeweils normalisiert auf den auch vermessenen HBBS-Puffer. Wie zu erwarten zeigt der Adenylylcyclase Stimulator Forskolin eine deutliche

Zellantwort, die nur noch durch den generellen GPCR Superagonist AlF_4^- übertroffen wird. Hingegen zeigt LysoPC C18:0 in allen Konzentrationen keinerlei Zellantwort.

Das einfach ungesättigte LysoPC Derivat C18:1 zeigt in den Konzentrationen bis zu 3 μM auch keinerlei Zellantwort. Die Effekte unter Einwirkung von 30 μM LysoPC sind aufgrund ihrer Form, verglichen mit der Positiv-Kontrolle Forskolin, nicht als GPCR-artige Zellantwort anzusehen.

Eine mögliche Erklärung ist die Involvierung von Autotaxin. So zeichnet sich LysoPC C18:1 doch um eine mehr als dreifach so hohe Affinität zum Autotaxin-Molekül aus als das gesättigte C18:0 Derivat [199]. Somit könnte sich hier eine Anlagerung von an Autotaxin gebundenem LysoPC C18:1 zeigen. Bedenkt man allerdings, dass LysoPC C18:1 in den vorherigen funktionalen Assays keine bedeutende Migrationshemmung zeigte, ist diese mögliche Autotaxin-Involvierung für den antimetastatischen Effekt des LysoPCs als bedeutungslos anzusehen.

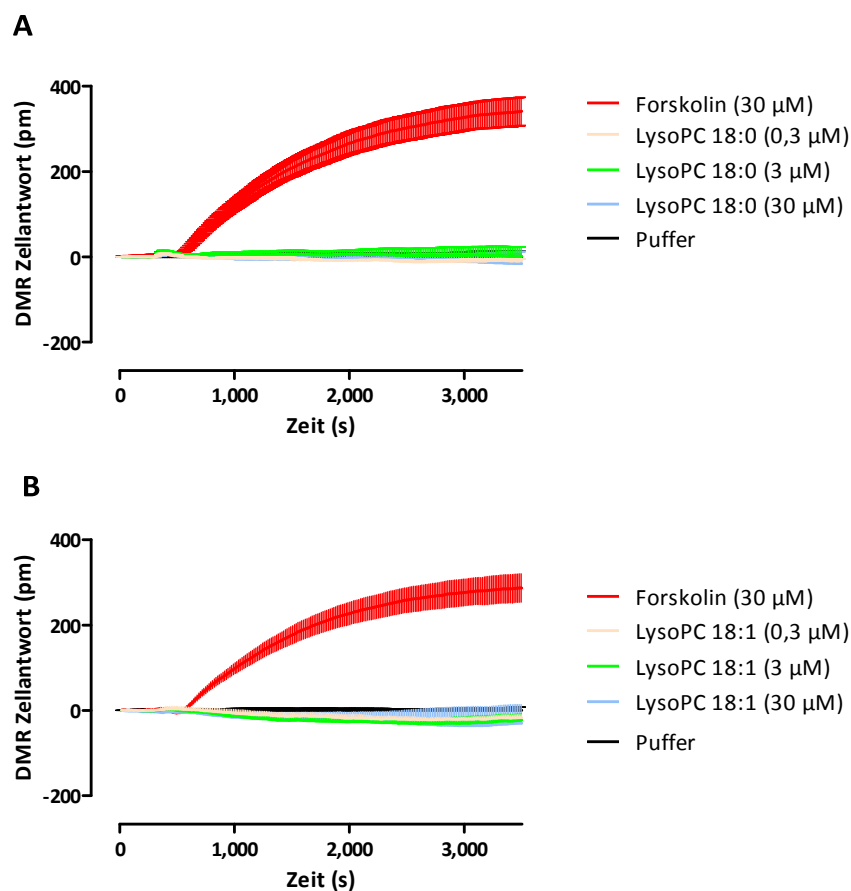


Abbildung 50 DMR Messungen von MV3-Zellen

Dynamische Massenumverteilungs-Messungen von MV3-Zellen auf Fibronectin-beschichteten Biosensoroberflächen. Zellen wurden zuvor in Abwesenheit von LysoPC kultiviert. Die Testsubstanz-Zugabe erfolgt zum Beginn der Messung. Forskolin dient als Positiv-Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Auch bei der humanen Zelllinie MV3 zeigen sich durchaus vergleichbare Ergebnisse.

Im Gegensatz zur B16.F10 Zelllinie kann hier allerdings nicht der GPCR Superagonist ALF_4^- als Vergleich verwendet werden, da sich die Zellen als Konsequenz der Stimulation von der Biosensoroberfläche ablösen. Weder LysoPC C18:0 noch LysoPC C18:1 führt zu einer sichtbaren Zellantwort. Die bei dem B16.F10 Zellsystem aufgetretene Zellantwort unter Einfluss des LysoPCs C18:1 in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/L}$ bleibt hier vollständig aus.

Für beide Zellsysteme lässt sich also festhalten, dass eine unmittelbare LysoPC Zugabe in einer nicht toxischen, funktionell jedoch tendenziell effektiven Konzentration ohne weitere BSA-Zusätze nicht zu einer GPCR-artigen Zellantwort im dynamischen Massenumverteilungs-Assay führt.

4.4.2. Expression vermuteter GPCR-Rezeptoren im B16.F10 Zellsystem

Aufgrund des Ausbleibens einer GPCR-artigen Zellantwort nach unmittelbarer Exposition mit LysoPC drängt sich natürlich die Frage auf, ob die potentiellen Rezeptoren überhaupt im Zellsystem exprimiert werden. Darüber hinaus konnte der vorherige Versuch keine Aussage über die längerfristigen Effekte wie auch die Übertragbarkeit auf die in anderen Versuchen gewählten Standardbedingungen von 450 $\mu\text{mol/L}$ und zweiprozentigem BSA-Zusatz liefern.

Zur Beantwortung dieser Fragen werden drei vermutete LysoPC Rezeptoren betrachtet. Mittels Westernblot aus den Ganzzell-Lysaten von über 72 h mit LysoPC behandelten Zellen wird hierzu die Expression von GPR 68, GPR 4 sowie G2A ermittelt.

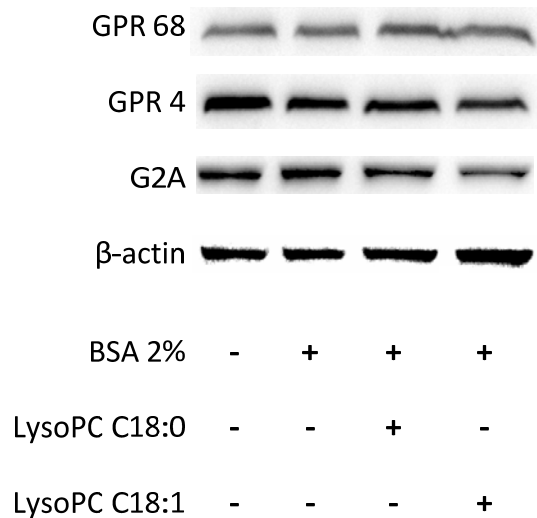


Abbildung 51 Western Blot von B16.F10-Zellen

Dargestellt sind Ausschnitte von Western Blots von Ganzzelllysaten aus B16.F10 Zellen, die zuvor für 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes inkubiert wurden oder eine entsprechend gekennzeichnete Vergleichsbehandlung erfuhren. Die drei oberen Reihen zeigen die vermeintlichen LysoPC-assoziierten G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR68, GPR4 und G2A. Das in der letzten Reihe exemplarisch gezeigt β -Aktin dient als Kontrolle der Proteinnormalisierung.

Zunächst kann festgestellt werden, dass alle drei Rezeptoren GPR 68, GPR 4 sowie G2A von B16.F10 Zellen exprimiert werden. Des Weiteren ist keinerlei Einfluss zwischen Expression und LysoPC-Inkubation zu erkennen. Einhergehend mit den Ergebnissen der DMR-Messungen kann man sich somit der mittlerweile vorherrschenden Meinung anschließen, dass LysoPC nicht über diese Rezeptoren seine Wirkung entfaltet.

4.4.3. Internalisierung GPR 4 im B16.F10-Zellsystem

Trotz ausbleibender Expressionsunterschiede ist natürlich noch denkbar, dass eine LysoPC Inkubation zu einer Rezeptorinternalisierung führt. Am Beispiel des GPR4-Rezeptors wird dies mittels durchflusszytometrischer Betrachtung Oberflächen-Immunfluoreszenz-markierter Zellen untersucht.

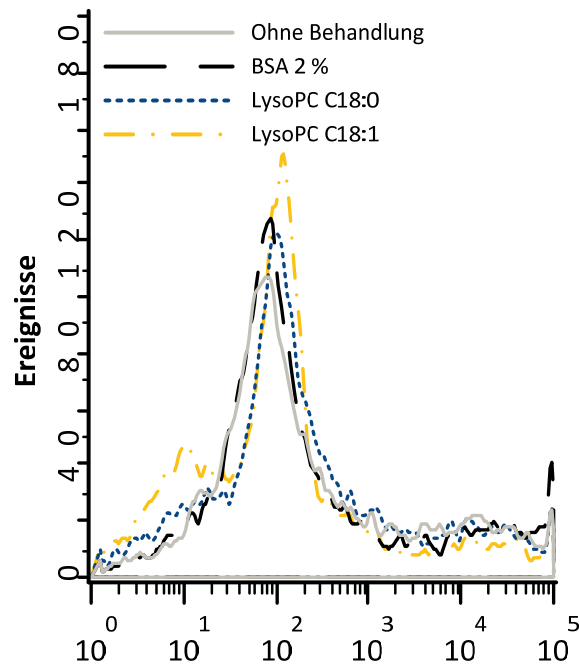


Abbildung 52 FACS-Messung von GPR4 markierten B16.F10-Zellen

Dargestellt ist die FACS-Messung von über 72 h mit LysoPC C18:0 oder C18:1 in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelten B16.F10-Zellen. Zusätzlich sind die Ergebnisse der reinen BSA-Behandlung sowie gänzlich unbehandelter Zellen gezeigt. Der verwendete Antikörper ist für ein extrazelluläres Epitop spezifisch.

In Abbildung 52 kann gezeigt werden, dass die 72-stündige Inkubation von B16.F10-Zellen mit LysoPC nicht zu einer Veränderung der an der Oberfläche befindlichen GPR4-Rezeptoren führt. Dabei existiert auch keinerlei Unterschied zwischen den beiden LysoPC-Derivaten C18:0 und C18:1.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich mit ziemlicher Sicherheit schlussfolgern, dass die LysoPC-generierten Effekte wie eine reduzierte Adhäsion und Migration in beiden untersuchten Zellsystemen nicht in Zusammenhang mit einer GPCR-Interaktion stehen. Weder führte eine direkte LysoPC-Exposition zu einer GPCR-artigen Zellantwort noch veränderte sich die Rezeptorexposition wie auch Lokalisierung nach 72 h Inkubation.

Ein potentieller Erklärungsansatz dafür, dass andere Arbeitsgruppen eine Verbindung zwischen LysoPC und einer GPCR-Stimulation vermuteten, lässt sich in [200] finden. Konnten Wang et. al. doch zeigen, dass LysoPC eine Internalisierung des G2A-Rezeptors zu unterbinden mag. In Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen wäre es somit durchaus denkbar, dass LysoPC zwar nicht selbst zu einer Rezeptor-Aktivierung

führt, allerdings durch eine Stabilisierung der Rezeptoren auf der Oberfläche eine Stimulation durch tatsächliche, aber in den Versuchen dieser Arbeit nicht vorhandene, Liganden verstärkt.

4.5. Adhäsions-Signalisierung

Konnten im vorherigen Abschnitt GPCR-Interaktionen als dominante Akteure im antimetastatischen Zusammenspiel ausgeschlossen werden, stellt sich folgend die Frage nach einer Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen.

Im Zusammenhang mit Fibronectin ist hier das Syndecan-4 von Interesse. Syndecan-4 kann dabei, wie in Kapitel 2.6 gezeigt, nach extrazellulärer Interaktion mit Fibronectin durch intrazelluläre Signalkaskaden zu einer Integrinaktivierung führen.

4.5.1. Syndecan-4

Technisch wurden von Gesamtzelllysaten Western Blots erstellt und aus der Pixeldichte der einzelnen Blots von phosphoryliertem und gesamtem Syndecan-4 die Phosphorylierung berechnet. Hierbei zeigt sich eine deutliche Tendenz für eine erhöhte Phosphorylierung des Syndecan-4 unter LysoPC-Einfluss. Diese Phosphorylierung des intrazellulären Ser179 geht einher mit einer Inaktivierung des Syndecans. Eine Outside-In Signalisierung des Syndecans erfolgt durch Oligomerisierung. Die Einbringung einer negativen Ladung durch die Phosphorylierung unterbindet das Annähern der SDC-4 Dimere und unterbindet somit die Signalisierung.

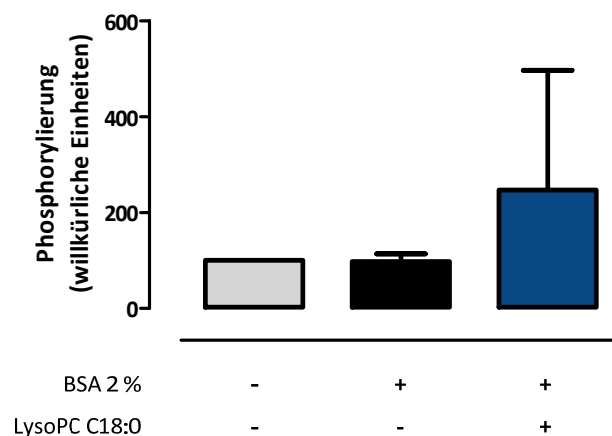


Abbildung 53 SDC-4 Phosphorylierung von B16.F10-Zellen

Gezeigt ist die Phosphorylierung des SDC-4 in Ganzzelllysaten von B16.F10-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für SDC-4 sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

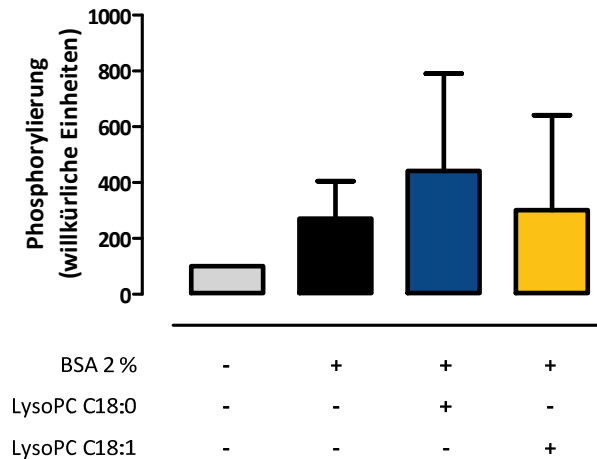


Abbildung 54 SDC-4 Phosphorylierung von MV3-Zellen

Gezeigt ist die Phosphorylierung des SDC-4 in Ganzzelllysaten von MV3-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für SDC-4 sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD) an.

Analog den Ergebnissen der B16.F10-Zelllinie zeigt auch das MV3-Zellsystem in Abbildung 54 eine deutliche Tendenz zu erhöhter SDC-4 Phosphorylierung unter dem Einfluss des LysoPC-Derivats C18:0. Das hier zusätzlich vermessene einfach ungesättigte C18:1 Derivat liegt auf dem Niveau des funktionell nicht in Erscheinung tretenden BSA-Zusatzes.

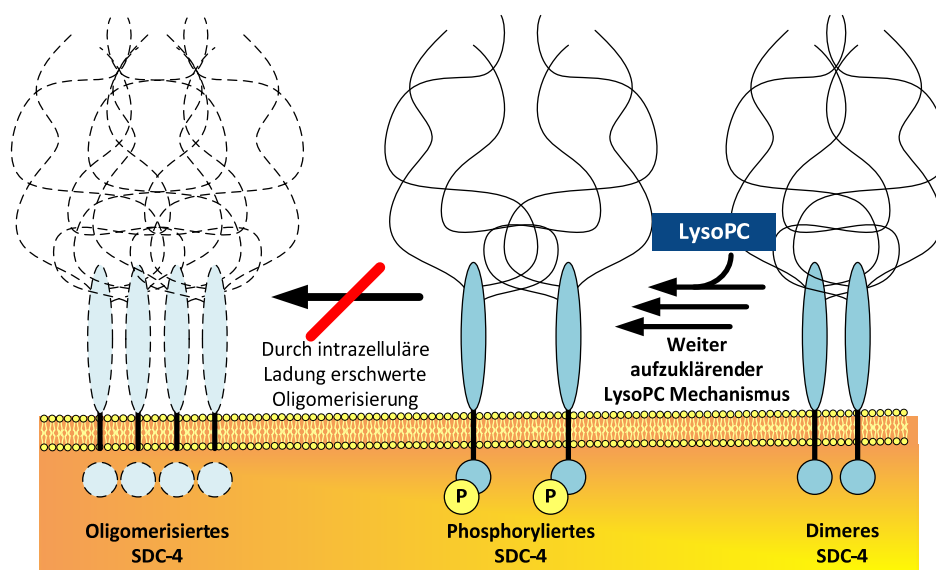


Abbildung 55 Schematische Darstellung des LysoPC Einfluss auf SDC-4

Die Inkubation der beiden untersuchten Zellsysteme mit LysoPC führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung des Syndecans-4. Aufgrund der eingebrachten negativen Ladung wird die für die weitere Signalisierung erforderliche Oligomerisierung der SDC-4 Monomere erschwert.

In Abbildung 55 ist der gerade angesprochene LysoPC-assoziierte Mechanismus der Syndecan-4 Phosphorylierung skizziert. Im Zuge der weiteren Aufklärung wird auf Membran-assoziierte Kinasen geschaut, die entweder die Phosphorylierung des Syndecans-4 bewirken oder aber in Konsequenz der ausbleibenden Oligomerisierung in ihrer Aktivität beeinflusst werden, gerade in Hinblick auf eine Integrin-Aktivierung.

4.5.2. Proteinkinase C

4.5.2.1. Direkte Aktivitätsbestimmung

Das Zusammenspiel zwischen Syndecan-4 und den Integrinen kann intrazellulär unter anderem über die Isoenzyme der Proteinkinase-C Familie vermittelt werden. Dabei wird der PKC α eine Integrin Aktivierung zugesprochen. Für die PKC δ hingegen ist eine Integrin-Inaktivierung beschrieben, die über eine Syndecan-4 Phosphorylierung erfolgen kann [76]. Dies ist gerade aufgrund des im vorherigen Kapitel aufgezeigten Zusammenhangs zwischen LysoPC-Exposition und Syndecan-4 Phosphorylierung von besonderem Interesse.

Kinasen als Phosphatgruppen-übertragende Enzyme sind natürlich klassischer Gegenstand von Radiolabel-Assays. Als Phosphatgruppendonor wird z.B. [γ -³²P]ATP verwendet und die Phosphorylierung von spezifischen Substraten anschließend durch Messung der Tscherenkow-Strahlung bestimmt [201].

In Ermangelung eines zugänglichen Isotopenlabors wurde versucht einen kommerziell erhältlichen kolorimetrischen PKC-Aktivitätsassay zu etablieren und zu untersuchen, ob der oben skizzierte Mechanismus auch in den vorliegenden Zellsystemen wiederzufinden ist.

Wie in Abbildung 56 näher gezeigt, basiert dieser Assay auf der immunologischen Erkennung von phosphoryliertem PKC Substrat. Das unphosphorylierte Substrat ist dabei in 96-Well Platten immobilisiert. Hierzu werden die Proteinfraction von Ganzzelllysaten und ein ATP-Zusatz gegeben, welcher die Reaktion startet. Die Detektion des phosphorylierten Substrates findet über ein Sandwich-Antikörperverfahren mit HRP-Konjugat statt, welches im letzten Schritt eine TMB-Farbreaktion auslöst, deren Intensität proportional zur PKC-Aktivität ist.

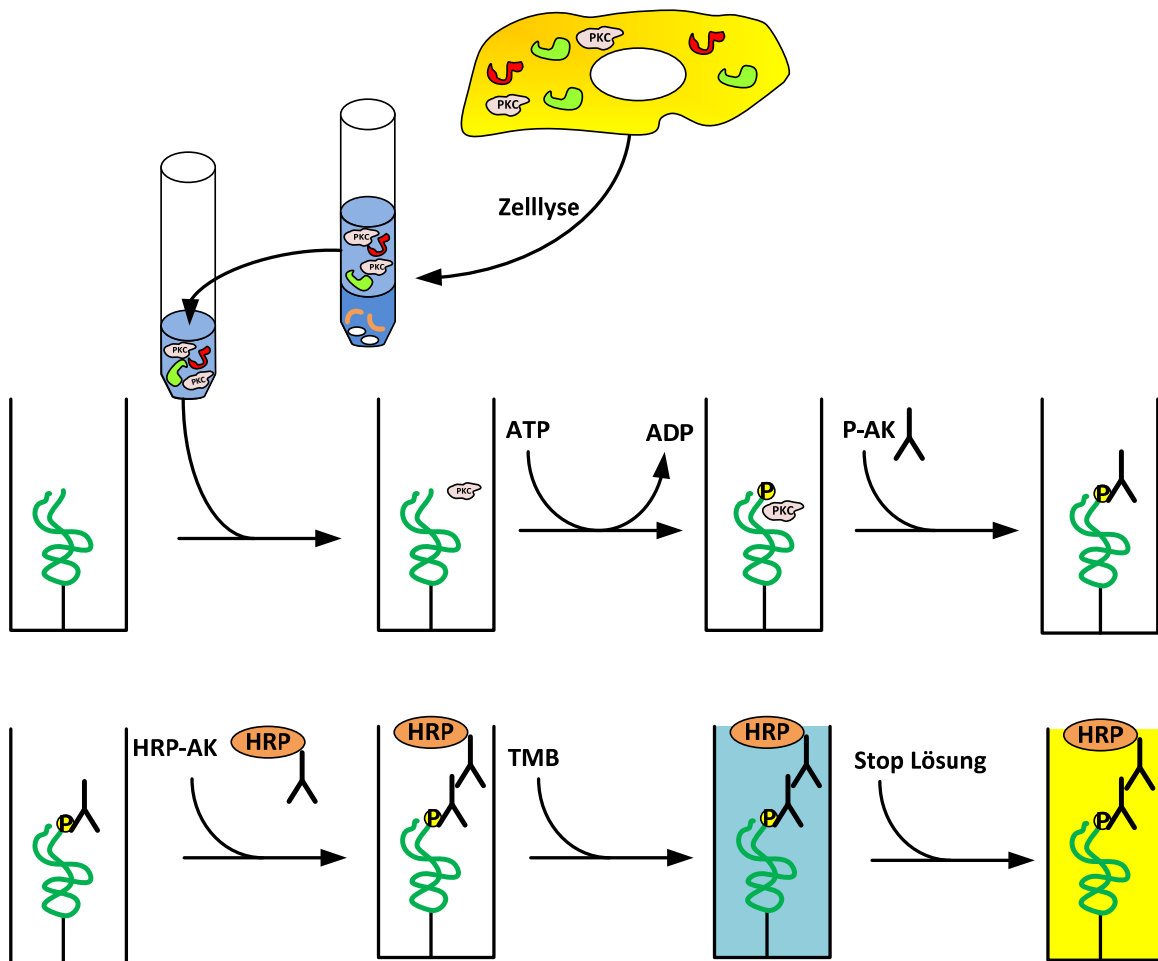


Abbildung 56 Prinzip des PKC Kinase Aktivitätsassays

Auf immobilisiertes PKC Substrat wird die Proteinfraction von Ganzzelllysaten gegeben. Durch ATP-Zugabe wird die Phosphorylierungsreaktion gestartet. Die Detektion von phosphoryliertem Substrat findet über eine Sandwichantikörper Technik statt, die über das konjugierte HRP eine TMB Lösung oxidiert. Nach Zusatz der Stop-Lösung (Schwefelsäure) kann die PKC Aktivität kolorimetrisch vermessen werden. Basierend auf [147].

Für eine isolierte PKC α wie auch eine isolierte PKC δ konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Phosphorylierung gezeigt werden.

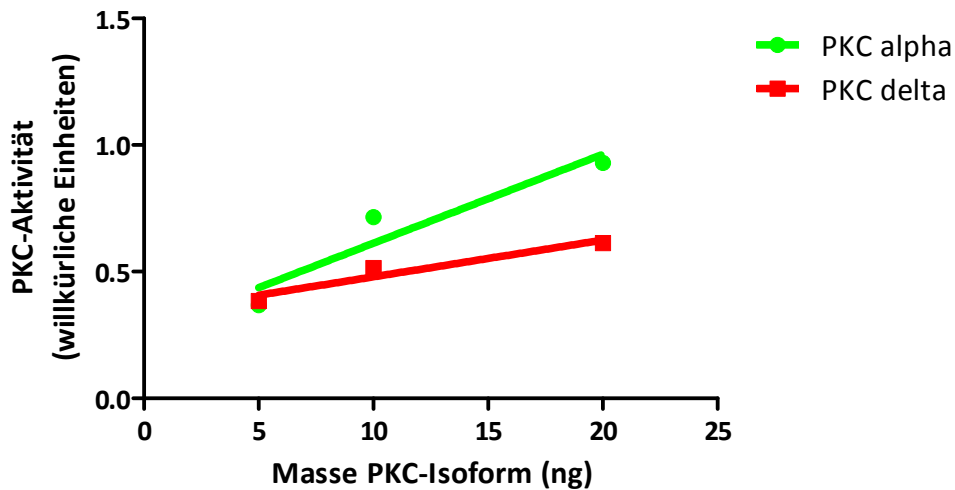


Abbildung 57 PKC Aktivität von reinen PKC-Isoformen

Zu sehen ist die PKC Aktivität der reinen Isoformen von PKC α (grün, oben) und PKC δ (rot, unten). Beide zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Masse bei gleichen Volumen und der resultierenden Phosphorylierung.

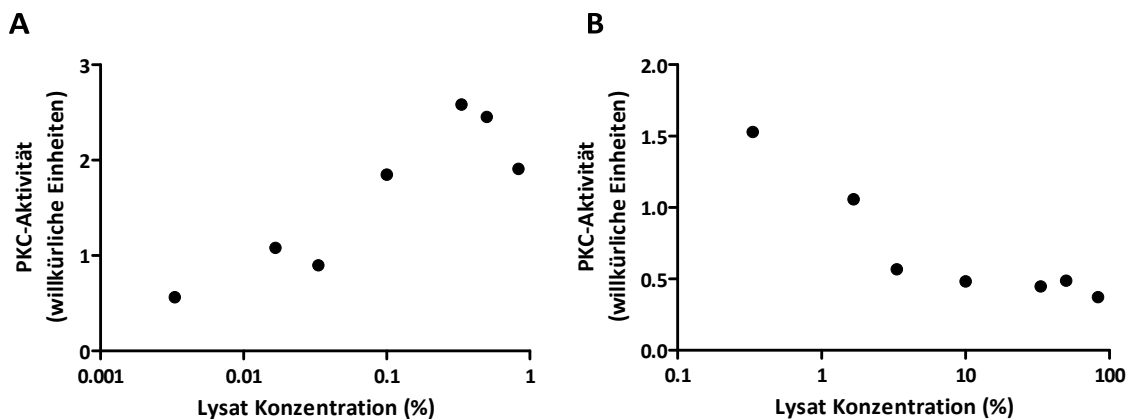


Abbildung 58 PKC Aktivität von MV3 Ganzzelllysaten

Gezeigt ist die PKC-Aktivität in willkürlichen Einheiten von MV3-Ganzzelllysaten verschiedener Konzentrationen. Zu beachten ist die logarithmische Skalierung der X-Achse. Nur in einem sehr kleinen Konzentrationsfenster zeigt sich überhaupt eine direktproportionale Korrelation zwischen der Lysatkonzentration und der messbaren Substratphosphorylierung.

Betrachtet man Ganzzelllysate von MV3-Zellen, zeigt sich nur in einem sehr geringen Konzentrationsfenster und bei hohen Verdünnungen überhaupt eine direktproportionale Korrelation zwischen der eingesetzten Lysatkonzentration und der meßbaren Substratphosphorylierung. Vermutlich existieren bei höheren

Konzentrationen vermehrt ATP-verbrauchende Konkurrenzreaktionen durch andere im Lysat befindliche Proteine.

Der Bezug auf die Lysatkonzentration, und nicht wie sonst üblich auf die Proteinkonzentration des Lysats, ist dem zwingenden raschen zeitlichen Ablauf des Assays geschuldet. Da hier nicht nur das Vorhandensein eines bestimmten Epitops überprüft werden soll, sondern die Aktivität eines dafür notwendigerweise intakten Enzyms quantitativ zu bestimmen ist, wird der PKC-Assay im unmittelbaren Anschluss an die Lysatherstellung durchgeführt. Das Warten auf die Ergebnisse der Proteinbestimmung von ca. zwei Stunden könnte diese wiederum verfälschen.

Besinnt man sich auf die zugrundeliegende Fragestellung zurück, wird klar, dass die Bestimmung der Gesamt PKC-Aktivität alleine natürlich nicht zur Bestätigung der aufgestellten Hypothese führen kann. So soll doch eine mögliche Verlagerung der Aktivität von einer Isoform (PKC α) zur anderen Isoform (PKC δ) untersucht werden, auf welche aus einer aggregierten Summe nicht zurückgeschlossen werden kann.

Die somit notwendige Diskriminierung der Iso-Untereinheiten sollte mit Inhibitoren realisiert werden. Die Aktivität der Calcium-abhängigen Isoformen α und $\beta 1$ lässt sich durch den Zusatz von Gö6976 inhibieren, welcher erst bei bedeutend höheren Konzentrationen auch weitere Isoformen inhibiert. Eine reine Inhibition der δ -Isoform ist hingegen nicht möglich, da sich der dafür vielfach propagierte Inhibitor Rottlerin neueren Untersuchungen zu Folge als völlig ungeeignet herausgestellt hat [202].

In der Theorie hätte nun die gesamte PKC-Aktivität sowie in Anwesenheit von Gö6976 die nicht α und nicht $\beta 1$ Aktivität bestimmt werden können. Die PKC α Aktivität wäre in grober Näherung dann die Differenz der beiden Werte.

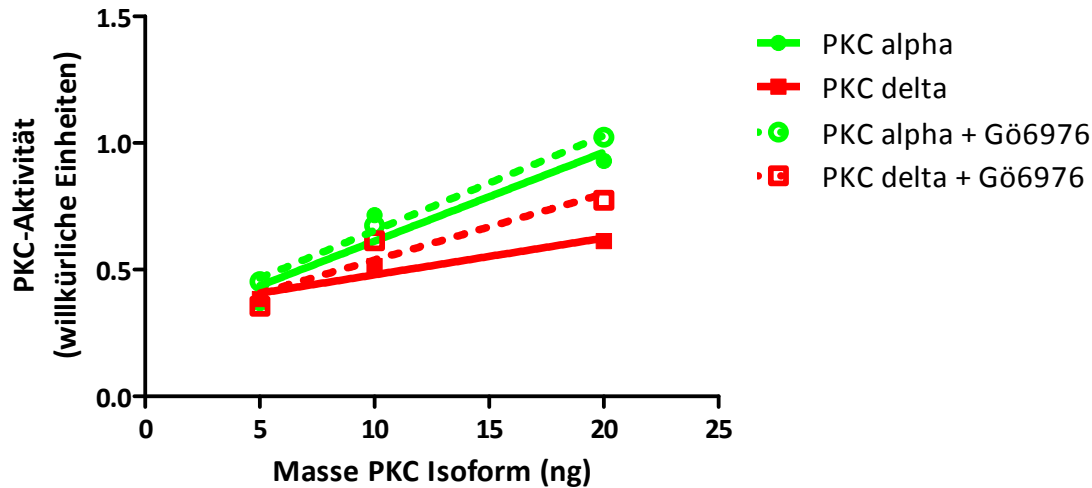


Abbildung 59 PKC-Aktivität von reinen Isoenzymen unter Inhibition

Zu sehen ist die PKC Aktivität der reinen Isoformen von PKC α (grün, oben) und PKC δ (rot, unten) sowie von beiden jeweils mit Inhibitor Gö6976 in einer vermeintlichen nicht PKC δ inhibierenden Konzentration (gestrichelte Linie). Es ist zu erkennen, dass der Inhibitor weder eine Spezifität, noch eine Hemmwirkung in der verwendeten Konzentration zeigt.

Erste Experimente mit dem Inhibitor zeigten allerdings, dass dieser in einer Konzentration, die zwischen den Affinitäten der beiden Isoformen liegt, keinerlei Effekt liefert.

Zusammen mit der schon wackeligen Ausgangslage der Konzentrationsfindung und der mangelnden Isoenzymdifferenzierung wird dieser Assays für unsere Fragestellung als nicht praxistauglich gewertet.

4.5.2.2. Indirekte Aktivitätsbestimmung

Da somit die Möglichkeit der direkten PKC-Aktivitätsbestimmung fehlt, wird auf einen indirekten Weg zurückgegriffen. Als Surrogatmarker zur Ermittlung der Aktivität der PKC-Isoformen α und δ dient die intrazelluläre Phosphorylierung. Diese ist direkt proportional zur Aktivität und wird in Analogie zum Syndecan-4 mittels Westernblot-basierter Pixeldichtenmessung bestimmt.

In Abbildung 60 ist zu sehen, dass B16.F10 Zellen nach Inkubation mit LysoPC C18:0 über einen Zeitraum von 72 h in einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Erhöhung der PKC δ -Phosphorylierung aufweisen. Dieser Effekt fügt sich ausgesprochen plausibel zu der zuvor beobachteten SDC4-Phosphorylierung. So gilt die PKC δ doch als

Effektor-Kinase. Eine erhöhte Aktivität der PKC δ kann somit in Konsequenz zu einer erhöhten Phosphorylierung des Syndecans-4 führen.

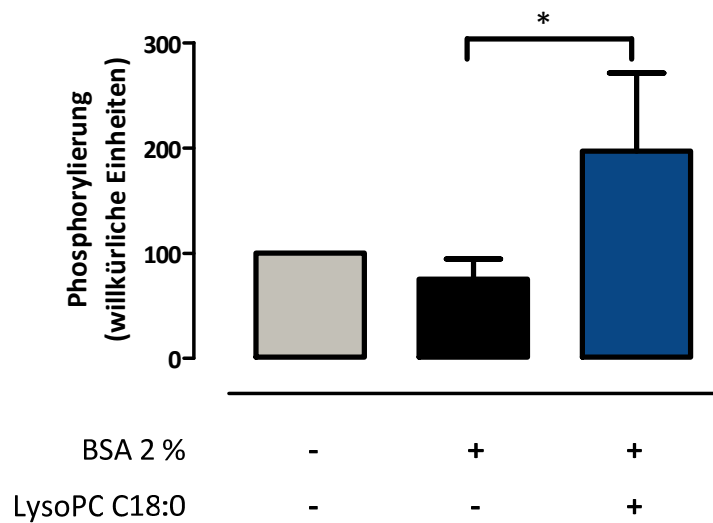


Abbildung 60 PKC δ -Phosphorylierung im B16.F10-Zellsystem

Gezeigt ist die Phosphorylierung der δ -Isoform der Proteinkinase C als direktproportionaler Surrogatmarker für die Kinaseaktivität aus Ganzzelllysaten von B16.F10-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für PKC δ sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 μ mol/L Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Betrachtet man die α -Isoform der Proteinkinase C unter denselben Bedingungen wie die δ -Isoform, zeigt sich in Abbildung 61 noch eine leichte Tendenz zur reduzierten Phosphorylierung. Diese reduzierte Aktivität der PKC α ließe sich als Konsequenz der SDC-4 Phosphorylierung erklären. Denn erst der ternäre Komplex aus oligomerisiertem SDC-4, PIP $_2$ und der PKC α führt zur Aktivierung Letzterer. Wird die Bildung des ternären Komplexes allerdings durch die SDC-4 Phosphorylierung inhibiert, resultiert folglich auch eine geringere PKC α -Aktivierung.

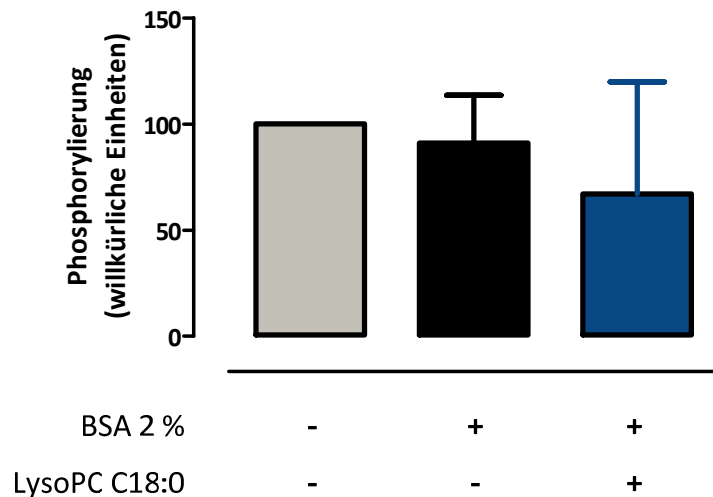


Abbildung 61 PKC α -Phosphorylierung im B16.F10-Zellsystem

Gezeigt ist die Phosphorylierung der α -Isoform der Proteinkinase C als direktproportionaler Surrogatmarker für die Kinaseaktivität aus Ganzzelllysaten von B16.F10-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für PKC α sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt. (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$)

Im MV3-Zellsystem zeigt sich bei δ -Isoform der PKC in Abbildung 62 ein etwas anderes Bild. Bezogen auf den BSA-Zusatz führt die Behandlung mit LysoPC nicht zu einer Reduktion der PKC δ Aktivität. Auch das zudem untersuchte Ölsäure-Derivat des LysoPC C18:1 zeigt keine bedeutende Veränderung. Allerdings ist auch bei der MV3-Zelllinie das SDC-4 in erhöhtem Maße phosphoryliert. Es ist nun möglich, dass dies auf einem anderen Weg geschieht. Immerhin handelt es sich um Zellen, die von zwei verschiedenen Spezies stammen. Andererseits ist es aber auch denkbar, dass in MV3 Zellen ein anderer zeitlicher Ablauf stattfindet. So zeigten sich schon in der metabolischen Reaktion auf eine LysoPC-Exposition wie auch im Calcium-Influx deutliche Unterschiede. Die hier gezeigte Darstellung der PKC δ -Phosphorylierung ist die Momentaufnahme nach 72 h Inkubation. Durchaus vorstellbar ist es also, dass zu diesem Zeitpunkt die Phosphorylierung des SDC-4 schon stattgefunden hat und die PKC δ in ihrer Aktivität wiederum reduziert wurde.

Bei der Aktivität der α -Isoform zeigt sich hingegen in Abbildung 63 in Analogie zum B16.F10-Zellsystem eine leichte Tendenz zur reduzierten Aktivität durch den Einfluss

von LysoPC C18:0. Das ungesättigte LysoPC-Derivat C18:1 zeigt auch hier keinen deutlichen Effekt.

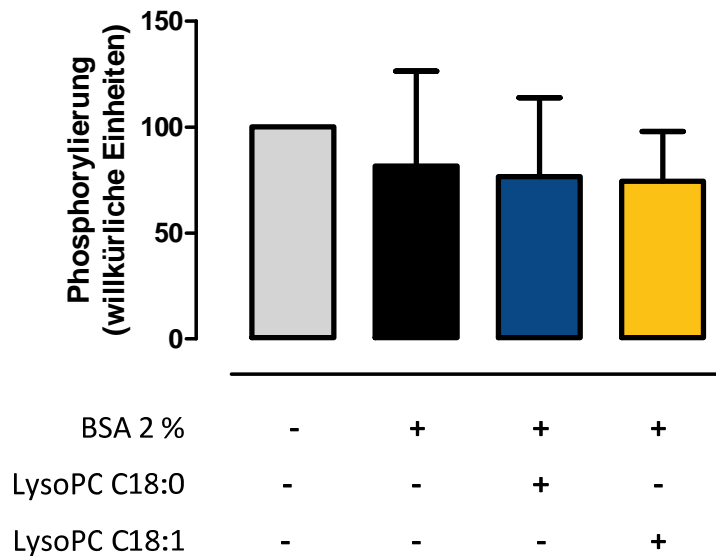


Abbildung 62 PKC δ -Phosphorylierung im MV3-Zellsystem

Gezeigt ist die Phosphorylierung der δ -Isoform der Proteinkinase C als direktproportionaler Surrogatmarker für die Kinaseaktivität aus Ganzzelllysaten von MV3-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für PKC δ sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 μ mol/L Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

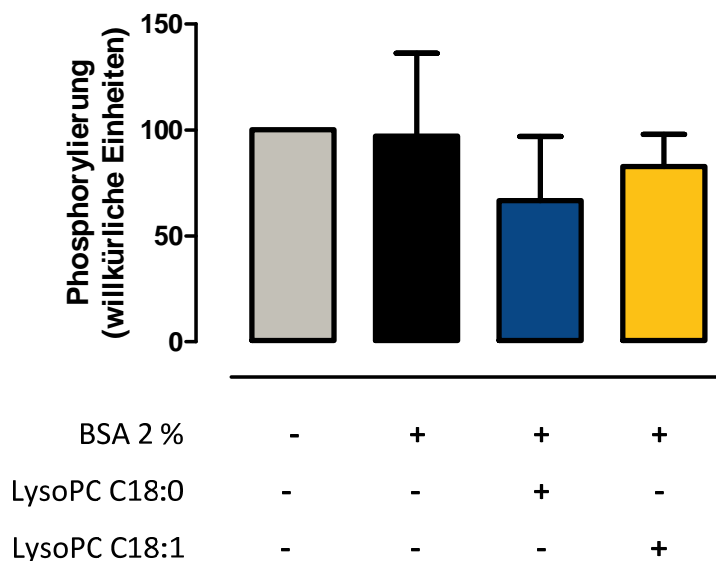


Abbildung 63 PKC α -Phosphorylierung im MV3-Zellsystem

Gezeigt ist die Phosphorylierung der α -Isoform der Proteinkinase C als direktproportionaler Surrogatmarker für die Kinaseaktivität aus Ganzzelllysaten von MV3-Zellen bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden jeweils Westernblots mit Antikörpern für PKC α sowie Westernblots mit nur für die phosphorylierte Form spezifischen Antikörpern. Die zur Erstellung der auf Proteinkonzentration normalisierten Lysate verwendeten Zellen wurden zuvor über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.5.3. Fokale Adhäsionskinase

Im Zuge der Ausbildung von zellulären Adhäsionen ist die Fokale Adhäsionskinase als Gerüst für weitere Proteine sowie als aktiver Teilnehmer zu sehen. Ihre Aktivierung ist somit ein Schlüssel zur Ausbildung kraftschlüssiger Verbindungen zwischen der Extrazellulären Matrix, den transmembranären Integrinen und dem Zytoskelett.

Zuerst werden Ganzzelllysate mittels Westernblot untersucht.

Die Phosphorylierung entspricht dabei einer Aktivierung. Es zeigt sich bei gleichbleibender FAK-Expression eine Reduktion der phosphorylierten somit aktivierten FAK unter dem Einfluss von LysoPC C18:0 in einer Konzentration von 450 μM über einen Zeitraum von 72 h.

Bei allen anderen Behandlungen ist kein Unterschied zu erkennen.

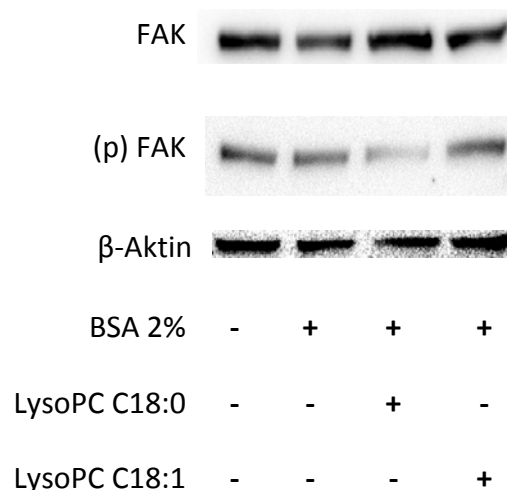


Abbildung 64 Westernblot der Fokalen Adhäsionskinase in B16.F10 Zellen

Dargestellt sind Ausschnitte von Western Blots von Ganzzelllysaten aus B16.F10 Zellen, die zuvor für 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ in Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes inkubiert wurden oder eine entsprechend gekennzeichnete Vergleichsbehandlung erfuhren. Die mit FAK gekennzeichnete Reihe von Banden zeigt die gesamte Expression der Fokalen Adhäsionskinase. Die darunter liegende mit (p)FAK gekennzeichnete

Bandenreihe zeigt die phosphorylierte FAK. Die Phosphorylierung entspricht dabei einer Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase. Das in der letzten Reihe exemplarisch gezeigt β -Aktin dient als Kontrolle der Proteinnormalisierung.

Neben dieser Information bezüglich der Gesamtprotein Expression soll im nächsten Schritt betrachtet werden, ob es hinsichtlich der Lokalisation Unterschiede gibt.

Mittels Immunfluoreszenz werden die Zellen markiert und im konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Deutlich zeigt sich in Abbildung 65 der morphologische Unterschied von LysoPC-C18:0 behandelten Zellen. Diese überragen in ihrer Fläche nicht nur die unbehandelten Zellen, sondern auch deutlich die BSA-Vergleichszellen und die mit dem einfach ungesättigtem LysoPC C18:1 behandelten Zellen.

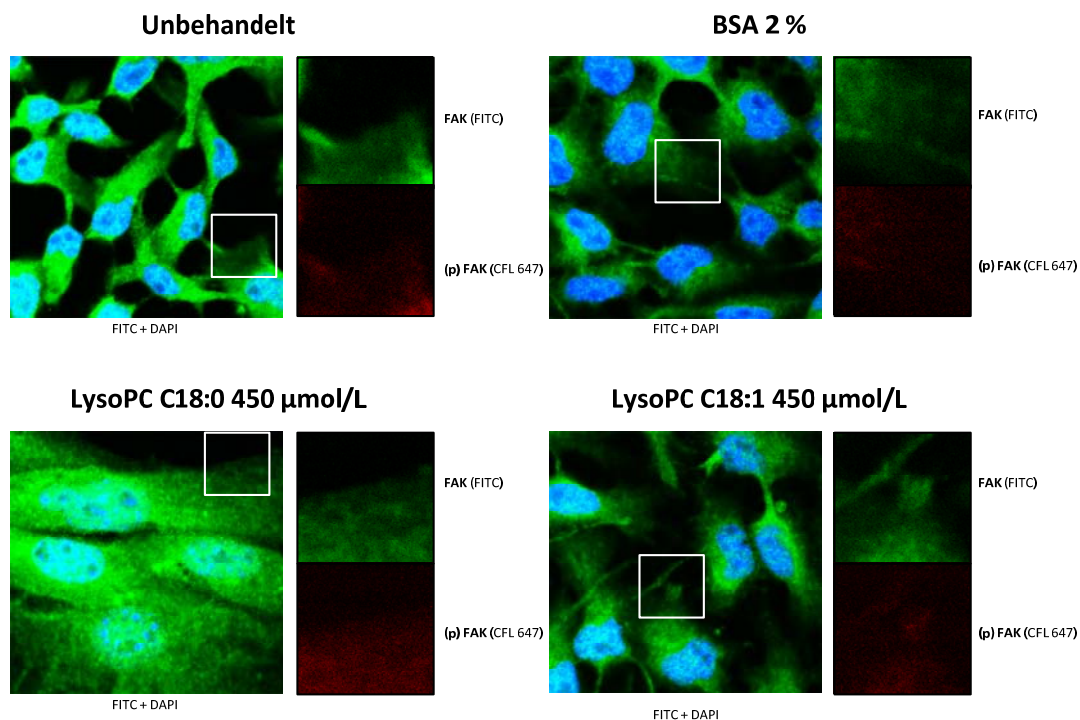


Abbildung 65 Fluoreszenzmikroskopische Bilder von B16.F10-Zellen

Gezeigt sind Fluoreszenzmikroskopische Bilder von B16.F10-Zellen zur Visualisierung fokaler Adäsionskontakte unter LysoPC Behandlung. In der jeweiligen Übersicht ist die gesamte FAK in grün sowie der Zellkern in blau zu sehen. Die beiden nebenstehenden vergrößerten Ausschnitte des weißen Bereichs zeigen oben die FAK (grün) sowie die phosphorylierte FAK (rot) unterhalb. Die Zellen wurden zuvor auf mit Fibronektin beschichteten Deckgläschen über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen.

Wird die FAK-Phosphorylierung der Randbereiche mittels Pixeldichtenanalyse bestimmt, zeigt sich ein annähernd den Westernblot Daten aus Abbildung 64 analoges

Bild. Die Behandlung mit LysoPC C18:0 führt verglichen mit der reinen BSA-Behandlung zu einer leichten Reduktion der FAK-Phosphorylierung. Das einfach ungesättigte LysoPC-Derivat C18:1 liegt hingegen auf dem Niveau der BSA-Behandlung. Generell scheint allerdings der BSA-Zusatz schon zu einer Steigerung der FAK-Phosphorylierung in den Randbereichen der Zelle zu führen.

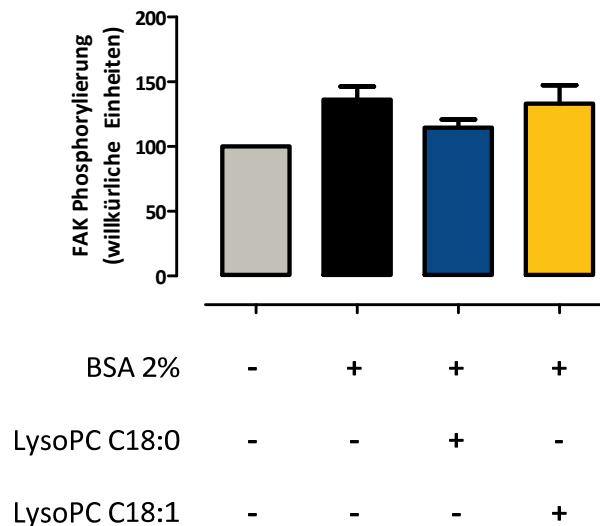


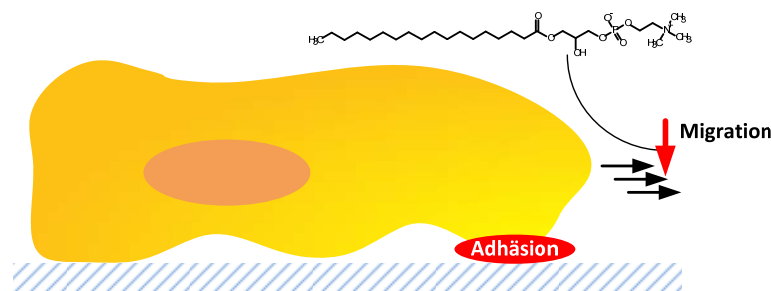
Abbildung 66 FAK-Phosphorylierung im B16.F10 Zellsystem

Gezeigt ist die FAK-Phosphorylierung bestimmt mittels Pixeldichten-Analyse. Grundlage hierfür bilden in Abbildung 65 exemplarisch gezeigte Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von B16.F10-Zellen mit Antikörpern für FAK sowie für die phosphorylierte Form. Die Zellen wurden zuvor auf mit Fibronectin beschichteten Deckgläschen über 72 h mit LysoPC einer Konzentration von 450 $\mu\text{mol/L}$ Gegenwart eines zweiprozentigen BSA-Zusatzes behandelt oder einer entsprechenden Vergleichsbehandlung unterzogen. Gegebenenfalls vorhandene Signifikanz wird mit Asterisken angezeigt (* $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$). Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

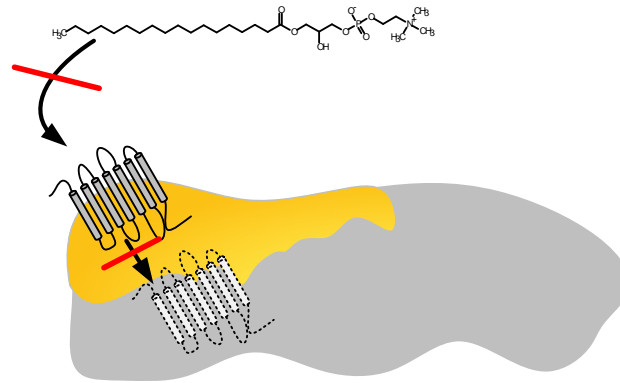
Wird hingegen die gesamte Zelle betrachtet, weisen LysoPC behandelte Zellen eine bedeutend größere Phosphorylierung auf. Dies kann durch eine größere Aufspaltung der Zelle bedingt sein. Dadurch liegt mehr Zelle im Bereich der konfokalen Fokussierung. Eventuell kann es sich auch um eine Gegenregulation handeln, da sich im Gegensatz zur Westernblot Messung die Zellen auf Fibronectin beschichteten Deckgläschen befinden.

5. Fazit

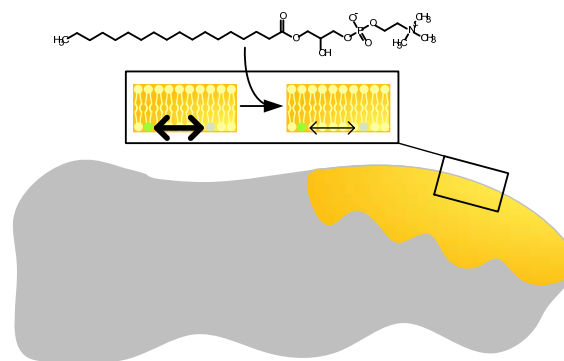
Der antimetastatische Effekt des LysoPCs aus in vivo Experimenten [38] lässt sich auch im funktionell korrelierenden in vitro Experiment der zweidimensionalen Wundheilung nachstellen. LysoPC zeigt dort in Abhängigkeit von der Sättigung der assoziierten Fettsäurekette eine Beeinflussung der Migration. Das vollständig gesättigte LysoPC C18:0 besitzt einen bedeutend stärkeren Migrations-hemmenden Einfluss als das einfach ungesättigte LysoPC C18:1. Resultierend wurden in weiteren Experimenten Einflüsse auf die Membranfluidität evaluiert. Darüber hinaus scheint der EZM-Bestandteil Fibronektin den Effekt der LysoPC-bedingten Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit zu amplifizieren. In Einklang mit den in [38] gezeigten Ergebnissen der LysoPC-induzierten Reduzierung der VLA-4 Adhäsionsfähigkeit im B16.F10 Zellsystem und der in dieser Arbeit gezeigten Beeinflussung im MV3-Zellsystem ergeben sich somit weitere Hinweise auf eine Beeinflussung der Adhäsionsmoleküle als möglichen LysoPC-Mechanismus.



Sucht man nach weiteren zugrundeliegenden Mechanismen, zeigt LysoPC im dynamischen Massenumverteilungs-Assay in einem nicht toxischen Konzentrationsbereich im murinen B16.F10-Melanomzellmodell keine Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Darüber hinaus ist auch nach einer Inkubationszeit von 72 h weder eine Reduktion der Rezeptorexpression noch eine Internalisierung feststellbar. Trotz der bedeutend stärkeren Deregulierung, die das humane MV3-Zellsystem durch eine LysoPC-Behandlung erfährt, sind auch hier die Ergebnisse bezüglich der GPCR-Stimulation übertragbar. Ein über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelter Wirkmechanismus ist daher in beiden Zellsystemen als unwahrscheinlich anzusehen.



Als Konsequenz einer LysoPC Exposition zeigt sich im B16.F10-Zellsystem eine Rigidisierung der Zellmembran. Die LysoPC-assoziierte Fettsäure wird somit nicht nur wie in [182] beschrieben in die Membran eingelagert, sondern ist in der Lage diese auch in bedeutendem Maße in ihrer Fluidität zu verändern. Dies wurde mittels des FRAP-Assays gezeigt.



Auch im humanen MV3-Zellsystem ist dieser Effekt präsent und konnte durch die Fluoreszenzanisotropie-Technik gezeigt werden. Die zusätzlich evaluierte AFM-basierte Methodik zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften der LysoPC-behandelten Zellmembran erweist sich letztlich zwar als nicht zielführend, konnte aber dennoch die Beobachtungen der beiden Fluoreszenz-basierten Messmethoden unterstützen.

In der Konsequenz erscheint die Membranfluiditätsveränderung somit nicht vornehmlich bezüglich der plastischen Verformbarkeit von Bedeutung zu sein, sondern viel mehr bezüglich der Beeinflussung Membran assoziierter Signalkaskaden.

Als Resultat findet eine Störung der Regulation der zellulären Adhäsion statt.

Eine Aktivierung der PKC-delta führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung des Syndecans-4 mit der Folge einer gestörten Oligomerisierung. Das somit nicht mehr oligomerisierte Syndecan-4 kann in der Konsequenz keinen PIP_2 -vermittelten ternären

Initiator Komplex mit der PKC-alpha bilden, durch welchen Letzte aktiviert wird. Die somit unterbleibende PKC-alpha-Aktivierung führt zu einer ausbleibenden Integrin-Aktivierung wie auch FAK-Rekrutierung an die Stelle der zu bildenden Adhäsion und somit in letzter Konsequenz zu einer reduzierten Adhäsion.

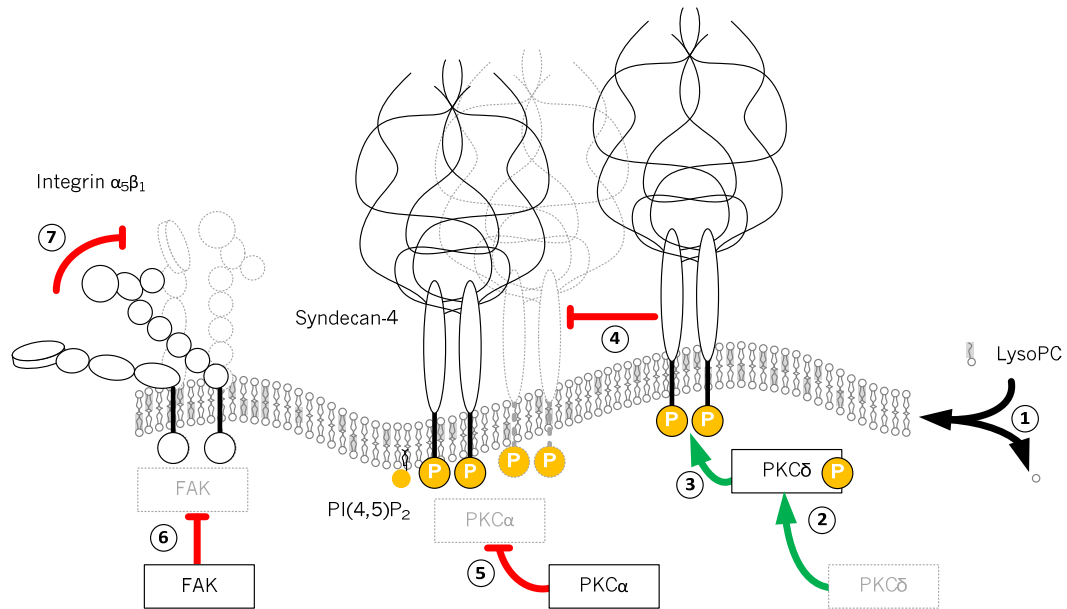


Abbildung 67 Skizzierung der LysoPC-induzierten Adhäsionshemmung

Eine LysoPC-induzierte Veränderung der Zellmembran (1) führt zu einer Aktivierung der PKC-delta (2). Durch die aktive PKC-delta wird das Syndeca-4 intrazelluläre phosphoryliert (3), wodurch eine Oligomerisierung der SDC-4 Dimere erschwert wird (4). Die ausbleibende Oligomerisierung des SDC-4 führt dazu, dass auch der ternäre Initiatorkomplex zur Aktivierung der PKC-alpha nicht ausgebildet wird (5). In der Konsequenz wird die Fokale Adhäsionskinase auch nicht verstärkt zu Orten neuer Adhäsionen rekrutiert (6) und die sonst daraus resultierende Integrinaktivierung bleibt aus (7).

6. Quellenverzeichnis

1. Publikation - Gesundheit - Todesursachen in Deutschland - Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert 3. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* Januar 2017;67(1):7–30.
3. Krebs - Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland [Internet]. [zitiert 3. August 2017]. Verfügbar unter: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_node.html
4. White MC, Holman DM, Boehm JE, Peipins LA, Grossman M, Henley SJ. Age and Cancer Risk. *Am J Prev Med.* März 2014;46(3 0 1):S7-15.
5. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The Link between the Metabolic Syndrome and Cancer. *Int J Biol Sci.* 16. August 2011;7(7):1003–15.
6. Esposito K, Chiodini P, Colao A, Lenzi A, Giugliano D. Metabolic Syndrome and Risk of Cancer. *Diabetes Care.* November 2012;35(11):2402–11.
7. Calle EE, Thun MJ. Obesity and cancer. *Oncogene.* 23. August 2004;23(38):6365–78.
8. Hursting SD, Nunez NP, Varticovski L, Vinson C. The Obesity-Cancer Link: Lessons Learned from a Fatless Mouse. *Cancer Res.* 15. März 2007;67(6):2391–3.
9. RKI - Themenschwerpunkt Übergewicht und Adipositas [Internet]. [zitiert 3. August 2017]. Verfügbar unter: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Uebergewicht_Adipositas/Uebergewicht_Adipositas_node.html
10. Spiegel D, Giese-Davis J. Depression and cancer: mechanisms and disease progression. *Biol Psychiatry.* 1. August 2003;54(3):269–82.
11. SMITH HR. Depression in cancer patients: Pathogenesis, implications and treatment (Review). *Oncol Lett.* April 2015;9(4):1509–14.
12. Satin JR, Linden W, Phillips MJ. Depression as a predictor of disease progression and mortality in cancer patients. *Cancer.* 15. November 2009;115(22):5349–61.
13. Graeser R, Bornmann C, Esser N, Ziroli V, Jantscheff P, Unger C, u. a. Antimetastatic effects of liposomal gemcitabine and empty liposomes in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Pancreas.* April 2009;38(3):330–7.
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Häcker B. *Biochemie. Korr. Nachdr. der 6. Aufl.* Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2011. 1224 S.
15. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Februar 2008;9(2):112–24.
16. van Meer G, de Kroon AIPM. Lipid map of the mammalian cell. *J Cell Sci.* 1. Januar 2011;124(1):5–8.
17. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985;26(9):1015–1035.
18. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med.* 30. August 2010;207(9):1807–17.

19. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oktober 2000;1(1):31–9.
20. Tkachenko E, Simons M. Clustering induces redistribution of syndecan-4 core protein into raft membrane domains. *J Biol Chem.* 31. Mai 2002;277(22):19946–51.
21. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* 2010;414–28.
22. Löffler G. *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie.* 7., komplett überarbeitete Auflage. Heidelberg: Springer; 2008. 507 S. (Springer-Lehrbuch).
23. Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J Lipid Res.* 19. Dezember 2008;50(Supplement):S46–51.
24. Thiam AR, Farese RV, Walther TC. The Biophysics and Cell Biology of Lipid Droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dezember 2013;14(12):775–86.
25. Fernandis AZ, Wenk MR. Membrane lipids as signaling molecules. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(2):121–128.
26. Overduin M, Cheever ML, Kutateladze TG. Signaling with phosphoinositides: better than binary. *Mol Interv.* 2001;1(3):150.
27. Berridge MJ, Taylor CW. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1988;53 Pt 2:927–33.
28. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.* Dezember 2012;11(12):937–57.
29. Kishimoto T, Soda Y, Matsuyama Y, Mizuno K. An enzymatic assay for lysophosphatidylcholine concentration in human serum and plasma. *Clin Biochem.* 2002;35(5):411–416.
30. Taylor LA, Arends J, Hodina AK, Unger C, Massing U. Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids Health Dis.* 2007;6(1):17.
31. Takatera A, Takeuchi A, Saiki K, Morisawa T, Yokoyama N, Matsuo M. Quantification of lysophosphatidylcholines and phosphatidylcholines using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in neonatal serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 21. Juni 2006;838(1):31–6.
32. Kühn T, Floegel A, Sookthai D, Johnson T, Rolle-Kampczyk U, Otto W, u. a. Higher plasma levels of lysophosphatidylcholine 18:0 are related to a lower risk of common cancers in a prospective metabolomics study. *BMC Med [Internet].* Dezember 2016 [zitiert 16. August 2016];14(1). Verfügbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/14/13>
33. Kim Y-L, Im Y-J, Ha N-C, Im D-S. Albumin inhibits cytotoxic activity of lysophosphatidylcholine by direct binding. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* Februar 2007;83(1–2):130–8.
34. Besterman JM, Domanico PL. Association and metabolism of exogenously-derived lysophosphatidylcholine by cultured mammalian cells: kinetics and mechanisms. *Biochemistry (Mosc).* 25. Februar 1992;31(7):2046–56.
35. Bühligen J, Himmel M, Gebhardt C, Simon JC, Ziegler W, Averbeck M. Lysophosphatidylcholine-mediated functional inactivation of syndecan-4 results in decreased adhesion and motility of dendritic cells. *J Cell Physiol.* November 2010;225(3):905–14.
36. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* Oktober 2007;7(10):803–15.

37. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 18. März 2011;63(3):131–5.
38. Jantscheff P, Schlesinger M, Fritzsche J, Taylor LA, Graeser R, Kirfel G, u. a. Lysophosphatidylcholine Pretreatment Reduces VLA-4 and P-Selectin-Mediated B16.F10 Melanoma Cell Adhesion In vitro and Inhibits Metastasis-Like Lung Invasion In vivo. *Mol Cancer Ther.* 10. Januar 2011;10(1):186–97.
39. van Jaarsveld MTM, Houthuijzen JM, Voest EE. Molecular mechanisms of target recognition by lipid GPCRs: relevance for cancer. *Oncogene.* 4. August 2016;35(31):4021–35.
40. Mueller RB, Sheriff A, Gaipf US, Wesselborg S, Lauber K. Attraction of phagocytes by apoptotic cells is mediated by lysophosphatidylcholine. *Autoimmunity.* Januar 2007;40(4):342–4.
41. Seuwen K, Ludwig M-G, Wolf RM. Receptors for Protons or Lipid Messengers or Both? *J Recept Signal Transduct.* Januar 2006;26(5–6):599–610.
42. Brindley DN, Benesch MGK, Murph MM. Autotaxin – An Enzymatic Augmenter of Malignant Progression Linked to Inflammation. In: Murph M, Herausgeber. *Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics* [Internet]. Intech; 2015 [zitiert 16. August 2016]. Verfügbar unter: <http://www.intechopen.com/books/melanoma-current-clinical-management-and-future-therapeutics/autotaxin-an-enzymatic-augmenter-of-malignant-progression-linked-to-inflammation>
43. Gotoh M, Fujiwara Y, Yue J, Liu J, Lee S, Fells J, u. a. Controlling cancer through the autotaxin–lysophosphatidic acid receptor axis. *Biochem Soc Trans.* 1. Februar 2012;40(1):31–6.
44. Saunders LP, Cao W, Chang WC, Albright RA, Braddock DT, De La Cruz EM. Kinetic Analysis of Autotaxin Reveals Substrate-specific Catalytic Pathways and a Mechanism for Lysophosphatidic Acid Distribution. *J Biol Chem.* 26. August 2011;286(34):30130–41.
45. Houben AJS, Moolenaar WH. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* Dezember 2011;30(3–4):557–65.
46. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer.* August 2003;3(8):582–91.
47. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor Biol.* September 2014;35(9):8483–523.
48. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 1. Juni 2009;119(6):1420–8.
49. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* Februar 2004;4(2):118–32.
50. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Juli 2009;10(7):445–57.
51. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev.* Juni 2009;28(1–2):129–35.
52. Swaminathan V, Mythreye K, O’Brien ET, Berchuck A, Blobel GC, Superfine R. Mechanical stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res.* 1. August 2011;71(15):5075–80.
53. Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer.* 24. Juni 2011;11(7):512–22.
54. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 14. Oktober 2011;147(2):275–92.

55. Martin OA, Anderson RL, Narayan K, MacManus MP. Does the mobilization of circulating tumour cells during cancer therapy cause metastasis? *Nat Rev Clin Oncol*. Januar 2017;14(1):32–44.
56. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. April 2009;9(4):285–93.
57. Mina LA, Sledge GW. Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 19. April 2011 [zitiert 22. August 2016]; Verfügbar unter: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2011.59>
58. Kitamura T, Qian B-Z, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*. Februar 2015;15(2):73–86.
59. Géraud C, Koch PS, Damm F, Schledzewski K, Goerdt S. Der metastatische Zyklus: metastatische Nischen und Tumorzell-Dissemination. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 1. November 2014;12(11):1012–20.
60. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, u. a. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704–9.
61. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. Mai 2003;3(5):362–74.
62. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci*. 1. November 2005;118(Pt 21):4917–9.
63. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. Oktober 2015;36:103–12.
64. Murrell M, Oakes PW, Lenz M, Gardel ML. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1. Juli 2015;16(8):486–98.
65. Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MAO, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19. Juni 2013;14(7):405–17.
66. Bugyi B, Carlier M-F. Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility. *Annu Rev Biophys*. April 2010;39(1):449–70.
67. Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Oktober 2006;7(10):713–26.
68. Amann KJ, Pollard TD. Cellular regulation of actin network assembly. *Curr Biol*. 14. Oktober 2000;10(20):R728–30.
69. Ait-Haddou R, Herzog W. Brownian ratchet models of molecular motors. *Cell Biochem Biophys*. 2003;38(2):191–214.
70. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Februar 2016;17(2):97–109.
71. Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*. 23. Dezember 2013;14(1):13–25.
72. Li Z, Zhang H, Lundin L, Thullberg M, Liu Y, Wang Y, u. a. p21-activated kinase 4 phosphorylation of integrin beta5 Ser-759 and Ser-762 regulates cell migration. *J Biol Chem*. 30. Juli 2010;285(31):23699–710.
73. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. Januar 2004;265(1):23–32.
74. Te Boekhorst V, Preziosi L, Friedl P. Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 6. Oktober 2016;32:491–526.

75. Murphy DA, Courtneidge SA. The „ins“ and „outs“ of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 23. Juni 2011;12(7):413–26.
76. Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dezember 2007;8(12):957–69.
77. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 19):3901–3.
78. Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* Juni 2009;1790(6):431–44.
79. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007;8(5):215.
80. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 15. Januar 2009;122(Pt 2):159–63.
81. Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol.* August 2007;9(8):858–67.
82. Legler DF, Wiedle G, Ross FP, Imhof BA. Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations. *J Cell Sci.* April 2001;114(Pt 8):1545–53.
83. Smith JW, Piotrowicz RS, Mathis D. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem.* 14. Januar 1994;269(2):960–7.
84. Luo B-H, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:619–47.
85. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(9):a005074.
86. Moreno-Layseca P, Streuli CH. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol.* Februar 2014;34:144–53.
87. Couchman JR. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dezember 2003;4(12):926–37.
88. Elfenbein A, Simons M. Syndecan-4 signaling at a glance. *J Cell Sci.* 1. September 2013;126(Pt 17):3799–804.
89. Oh ES, Woods A, Couchman JR. Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C. *J Biol Chem.* 2. Mai 1997;272(18):11805–11.
90. Multhaupt HAB, Yoneda A, Whiteford JR, Oh E-S, Lee W, Couchman JR. Syndecan signaling: when, where and why? *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* 2009;60 Suppl 4:31–8.
91. Chaudhuri P. Protein Kinase C -Dependent Phosphorylation of Syndecan-4 Regulates Cell Migration. *Circ Res.* 30. September 2005;97(7):674–81.
92. SDC4 - Syndecan-4 precursor - Homo sapiens (Human) - SDC4 gene & protein [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <http://www.uniprot.org/uniprot/P31431>
93. Sdc4 - Syndecan-4 precursor - Mus musculus (Mouse) - Sdc4 gene & protein [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <http://www.uniprot.org/uniprot/O35988>
94. Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal.* Mai 2011;23(5):753–62.
95. Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci.* 15. Januar 2004;117(Pt 2):131–2.
96. Kazi JU. The mechanism of protein kinase C regulation. *Front Biol.* 1. August 2011;6(4):328.

97. Parker PJ. Inhibition of protein kinase C—do we, can we, and should we? *Pharmacol Ther.* 1999;82(2):263–267.
98. Bornancin F, Parker PJ. Phosphorylation of protein kinase C-alpha on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J Biol Chem.* 7. Februar 1997;272(6):3544–9.
99. Liu Y, Belkina NV, Graham C, Shaw S. Independence of Protein Kinase C-Delta Activity from Activation Loop Phosphorylation: STRUCTURAL BASIS AND ALTERED FUNCTIONS IN CELLS. *J Biol Chem.* 28. April 2006;281(17):12102–11.
100. Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer.* September 2014;14(9):598–610.
101. Lawson C. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol.* 2012;196:223–32.
102. Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, Garcia AJ. Focal Adhesion Kinase Modulates Cell Adhesion Strengthening via Integrin Activation. *Mol Biol Cell.* 1. Mai 2009;20(9):2508–19.
103. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:802–14.
104. Deramaudt TB, Dujardin D, Hamadi A, Noulet F, Kolli K, De Mey J, u. a. FAK phosphorylation at Tyr-925 regulates cross-talk between focal adhesion turnover and cell protrusion. *Mol Biol Cell.* 2011;22(7):964–975.
105. Entschladen F, Thyssen D, Drell D. Re-Use of Established Drugs for Anti-Metastatic Indications. *Cells.* 12. Januar 2016;5(1):2.
106. Ratajczak MZ, Jadczyk T, Schneider G, Kakar SS, Kucia M. Induction of a tumor-metastasis-receptive microenvironment as an unwanted and underestimated side effect of treatment by chemotherapy or radiotherapy. *J Ovarian Res.* 2013;6(1):95.
107. Snyder GL, Greenberg S. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth.* 1. August 2010;105(2):106–15.
108. Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 24. März 2016;16(4):201–18.
109. Aguirre-Ghiso JA, Bragado P, Sosa MS. Metastasis Awakening: Targeting dormant cancer. *Nat Med.* 6. März 2013;19(3):276–7.
110. Dingermann T, Winckler T, Zündorf I. *Gentechnik, Biotechnik: Grundlagen und Wirkstoffe ; mit 111 Tabellen. 2., völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2011. 963 S.
111. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):385–403.
112. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH. Fachinformation Zaltrap [Internet]. Fachinformation Zaltrap. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/014538>
113. Roche Pharma AG. Fachinformation Avastin [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/008726>
114. Bayer Vital GmbH. Fachinformation Nexavar [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/009821>
115. PFIZER PHARMA GmbH. Fachinformation Sutent [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/009871>
116. Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* Dezember 2015;34(4):635–41.

117. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell*. März 2009;15(3):232–9.
118. Whiteside TL. Targeting adenosine in cancer immunotherapy: a review of recent progress. *Expert Rev Anticancer Ther*. 3. Juni 2017;17(6):527–35.
119. Mitchell B, Dhingra JK, Mahalingam M. BRAF and Epithelial-Mesenchymal Transition: Lessons From Papillary Thyroid Carcinoma and Primary Cutaneous Melanoma. *Adv Anat Pathol*. 2016;23(4):244–271.
120. Sanchez-Laorden B, Viros A, Girotti MR, Pedersen M, Saturno G, Zambon A, u. a. BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling. *Sci Signal*. 2014;7(318):ra30.
121. Roche Pharma AG. Fachinformation Zelboraf [Internet]. [zitiert 23. August 2017]. Verfügbar unter: <https://www.fachinfo.de/pdf/013644>
122. Pearlman RL, de Oca MKM, Pal HC, Afaq F. Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett*. 2017;391:125–140.
123. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, u. a. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 12. Oktober 2012;11(11):873–86.
124. Peddi P, Lopez-Olivo MA, Pratt GF, Suarez-Almazor ME. Denosumab in patients with cancer and skeletal metastases: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. Februar 2013;39(1):97–104.
125. Gvozdenovic A, Boro A, Meier D, Bode-Lesniewska B, Born W, Muff R, u. a. Targeting $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrins inhibits pulmonary metastasis in an intratibial xenograft osteosarcoma mouse model. *Oncotarget*. 23. August 2016;7(34):55141–54.
126. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol*. 2012;2012:676731.
127. Läubli H, Varki A, Borsig L. Antimetastatic Properties of Low Molecular Weight Heparin. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20. Juli 2016;34(21):2560–1.
128. Mei L, Liu Y, Zhang H, Zhang Z, Gao H, He Q. Antitumor and Antimetastasis Activities of Heparin-based Micelle Served As Both Carrier and Drug. *ACS Appl Mater Interfaces*. 20. April 2016;8(15):9577–89.
129. Lou X-L, Sun J, Gong S-Q, Yu X-F, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res*. 2015;27(5):450.
130. Menter DG, Tucker SC, Kopetz S, Sood AK, Crissman JD, Honn KV. Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. *Cancer Metastasis Rev*. März 2014;33(1):231–69.
131. Igarashi K, Kawaguchi K, Kiyuna T, Murakami T, Yamamoto N, Hayashi K, u. a. Antimetastatic Efficacy of the Combination of Caffeine and Valproic Acid on an Orthotopic Human Osteosarcoma Cell Line Model in Nude Mice. *Anticancer Res*. 2017;37(3):1005–11.
132. Saengboonmee C, Seubwai W, Cha-On U, Sawanyawisuth K, Wongkham S, Wongkham C. Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF- κ B. *Anticancer Res*. 1. Januar 2017;37(1):115–24.
133. Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 26. August 1977;197(4306):893–5.
134. Overwijk WW, Restifo NP. B16 as a mouse model for human melanoma. *Curr Protoc Immunol*. Mai 2001;Chapter 20:Unit 20.1.

135. Danciu C, Falamas A, Dehelean C, Soica C, Radeke H, Barbu-Tudoran L, u. a. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. *Cancer Cell Int.* 26. Juli 2013;13:75.
136. van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer.* 22. April 1991;48(1):85–91.
137. ThermoFischer Scientific. Guidelines for Maintaining Cultured Cells [Internet]. [zitiert 27. Oktober 2017]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/maintaining-cultured-cells.html>
138. Nosrati M, Li S, Bagheri S, Ginzinger D, Blackburn EH, Debs RJ, u. a. Antitumor activity of systemically delivered ribozymes targeting murine telomerase RNA. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1. August 2004;10(15):4983–90.
139. Glauner B. Stromausschlussverfahren Standardisierung der Vitalitätsbestimmung. *BIOspektrum.* (04.06):394–5.
140. Freimoser FM, Jakob CA, Aebi M, Tuor U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Appl Environ Microbiol.* August 1999;65(8):3727–9.
141. Fritzsche J, Simonis D, Bendas G. Melanoma cell adhesion can be blocked by heparin in vitro: Suggestion of VLA-4 as a novel target for antimetastatic approaches. *Thromb Haemost.* 13. November 2008;(100):1166–75.
142. Fritzsche J, Alban S, Ludwig RJ, Rubant S, Boehncke W-H, Schumacher G, u. a. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(4):474–85.
143. Lottspeich F, Engels JW, Herausgeber. *Bioanalytik. 2., [aktualisierte und erw.] Aufl., [Nachdr.]*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2009. 1119 S.
144. Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GPC. Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Mol Basel Switz.* 2012;17(4):4047–132.
145. Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy.* New York: Springer; 2006.
146. Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maechling C, Laustriat G. TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells. *Cell Biophys.* Juni 1983;5(2):129–40.
147. Enzo Life Sciences. ADI-EKS-420A_insert.pdf [Internet]. Product Manual PK C Kinase Activity Kit. [zitiert 22. August 2017]. Verfügbar unter: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-EKS-420A_insert.pdf
148. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
149. Walker JM. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. In: *The Protein Protocols Handbook* [Internet]. Humana Press; 2002 [zitiert 24. Oktober 2017]. S. 11–4. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-169-8:11>
150. Schröder R, Schmidt J, Blättermann S, Peters L, Janssen N, Grundmann M, u. a. Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protoc.* 20. Oktober 2011;6(11):1748–60.
151. Stangl M, Veerappan A, Kroeger A, Vogel P, Schneider D. Detergent Properties Influence the Stability of the Glycophorin A Transmembrane Helix Dimer in Lysophosphatidylcholine Micelles. *Biophys J.* 19. Dezember 2012;103(12):2455–64.

152. le Maire M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta*. 23. November 2000;1508(1–2):86–111.
153. Critical Micelle Concentrations (CMCs) | Avanti Polar Lipids [Internet]. [zitiert 28. Juni 2017]. Verfügbar unter: <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/cmcs/>
154. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, u. a. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, Grossman A, Arkin M, Auld D, u. a., Herausgeber. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [zitiert 19. Juni 2017]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
155. Sawada R, Ito T, Tsuchiya T. Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. *J Artif Organs Off J Jpn Soc Artif Organs*. 2006;9(3):179–84.
156. Mih JD, Marinkovic A, Liu F, Sharif AS, Tschumperlin DJ. Matrix stiffness reverses the effect of actomyosin tension on cell proliferation. *J Cell Sci*. 15. Dezember 2012;125(24):5974–83.
157. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. Januar 2010;10(1):9–22.
158. Bronner F. Extracellular and intracellular regulation of calcium homeostasis. *ScientificWorldJournal*. 22. Dezember 2001;1:919–25.
159. Capiod T. Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie*. Dezember 2011;93(12):2075–9.
160. Lundbaek JA, Andersen OS. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J Gen Physiol*. Oktober 1994;104(4):645–73.
161. Chaudhuri P, Colles SM, Damron DS, Graham LM. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing intracellular calcium and activating calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1. Februar 2003;23(2):218–23.
162. Grela E, Ząbek A, Grabowiecka A. Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Avicenna J Med Biotechnol*. Dezember 2015;7(4):159–67.
163. Abe K, Saito H. Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res*. August 1998;31(4):295–305.
164. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*. 16. April 2010;5(4):e10202.
165. Bergler W, Petroianu G, Schadel A. Feasibility of proliferation studies using the BrdU and MTT assays with a head and neck carcinoma cell line. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec*. August 1993;55(4):230–5.
166. Giancotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol*. 1. Oktober 1997;9(5):691–700.
167. Zhu X, Ohtsubo M, Böhmer RM, Roberts JM, Assoian RK. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol*. 15. April 1996;133(2):391–403.
168. Takabe P, Bart G, Ropponen A, Rilla K, Tammi M, Tammi R, u. a. Hyaluronan synthase 3 (HAS3) overexpression downregulates MV3 melanoma cell proliferation, migration and adhesion. *Exp Cell Res*. 10. September 2015;337(1):1–15.

169. Xia J, Ren D. The BSA-induced Ca(2+) influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 27. Oktober 2009;7:119.
170. Tanaka T, Ikeda K, Yamamoto Y, Iida H, Kikuchi H, Morita T, u. a. Effects of serum amyloid a and lysophosphatidylcholine on intracellular calcium concentration in human coronary artery smooth muscle cells. *Int Heart J*. 2011;52(3):185–93.
171. Li X-H, Wu Y-J. Characteristics of lysophosphatidylcholine-induced Ca²⁺ response in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci*. 6. Februar 2007;80(9):886–92.
172. Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*. Dezember 2003;5(12):1041–3.
173. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*. 27. Oktober 2008;27(50):6407–18.
174. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1. April 2013;5(4):a008656.
175. JAKUBOWSKA K, GUZIŃSKA-USTYMOWICZ K, FAMULSKI W, CEPOWICZ D, JAGODZIŃSKA D, PRYCZYNICZ A. Reduced expression of caspase-8 and cleaved caspase-3 in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncol Lett*. März 2016;11(3):1879–84.
176. Inácio ÂS, Mesquita KA, Baptista M, Ramalho-Santos J, Vaz WLC, Vieira OV. In Vitro Surfactant Structure-Toxicity Relationships: Implications for Surfactant Use in Sexually Transmitted Infection Prophylaxis and Contraception. *PLoS ONE* [Internet]. 16. Mai 2011 [zitiert 12. Juli 2017];6(5). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3095630/>
177. Shimabukuro M. A New Plausible Link between Lysophosphatidylcholine, TGF-β, and Fibromuscular Dysplasia. *J Atheroscler Thromb*. 1. Juni 2016;23(6):665–7.
178. Tanaka H, Zaima N, Sasaki T, Yamamoto N, Inuzuka K, Sano M, u. a. Characteristic Distribution Pattern of Lysophosphatidylcholine in Fibromuscular Dysplasia-Associated Visceral Artery Aneurysms Compared with Atherosclerotic Visceral Artery Aneurysms. *J Atheroscler Thromb*. 1. Juni 2016;23(6):673–80.
179. Song J. EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta. *Cell Res*. April 2007;17(4):289–90.
180. Yang Y, Pan X, Lei W, Wang J, Song J. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via a cell cycle-dependent mechanism. *Oncogene*. 23. November 2006;25(55):7235–44.
181. David CJ, Huang Y-H, Chen M, Su J, Zou Y, Bardeesy N, u. a. TGF-β Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell*. 25. Februar 2016;164(5):1015–30.
182. Raynor A, Jantschkeff P, Ross T, Schlesinger M, Wilde M, Haasis S, u. a. Saturated and mono-unsaturated lysophosphatidylcholine metabolism in tumour cells: a potential therapeutic target for preventing metastases. *Lipids Health Dis*. 2015;14(1):69.
183. Cheng S, Levy D. The effects of cell proliferation on the lipid composition and fluidity of hepatocyte plasma membranes. *Arch Biochem Biophys*. September 1979;196(2):424–9.
184. Silberman S, McGarvey TW, Comrie E, Persky B. The influence of ethanol on cell membrane fluidity, migration, and invasion of murine melanoma cells. *Exp Cell Res*. 1. Juli 1990;189(1):64–8.
185. Ghosh PK, Vasanthi A, Murugesan G, Eppell SJ, Graham LM, Fox PL. Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. *Nat Cell Biol*. November 2002;4(11):894–900.
186. Ross T. Der Einfluss unterschiedlicher Lysophosphatidylcholinderivate auf das Migrationsverhalten von Melanomzellen. Masterarbeit; 2012.

187. Ludwig T, Kirmse R, Poole K, Schwarz US. Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy. *Pflugers Arch.* April 2008;456(1):29–49.
188. JPK Instruments AG. NanoWizard® AFM Handbook [Internet]. [zitiert 9. August 2017]. Verfügbar unter: <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/jpk/manuf-manuals/handbook-2.2a.pdf>
189. Gorzelanny C, Pöppelmann B, Strozyk E, Moerschbacher BM, Schneider SW. Specific interaction between chitosan and matrix metalloprotease 2 decreases the invasive activity of human melanoma cells. *Biomacromolecules.* Oktober 2007;8(10):3035–40.
190. Gorzelanny C, Goerge T, Schnaeker E-M, Thomas K, Luger TA, Schneider SW. Atomic force microscopy as an innovative tool for nanoanalysis of native stratum corneum. *Exp Dermatol.* Mai 2006;15(5):387–91.
191. Klusch A, Ponce L, Gorzelanny C, Schäfer I, Schneider SW, Ringkamp M, u. a. Coculture model of sensory neurites and keratinocytes to investigate functional interaction: chemical stimulation and atomic force microscope-transmitted mechanical stimulation combined with live-cell imaging. *J Invest Dermatol.* Mai 2013;133(5):1387–90.
192. Liu BY, Zhang GM, Li XL, Chen H. Effect of glutaraldehyde fixation on bacterial cells observed by atomic force microscopy. *Scanning.* 1. Februar 2012;34(1):6–11.
193. DiDonato D, Brasaemle DL. Fixation Methods for the Study of Lipid Droplets by Immunofluorescence Microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1. Juni 2003;51(6):773–80.
194. Kusumi A, Suzuki K. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta.* 30. Dezember 2005;1746(3):234–51.
195. Fester T, Berg RH, Taylor CG. An easy method using glutaraldehyde-introduced fluorescence for the microscopic analysis of plant biotrophic interactions. *J Microsc.* August 2008;231(2):342–8.
196. Siegel AP, Kimble-Hill A, Garg S, Jordan R, Naumann CA. Native Ligands Change Integrin Sequestering but Not Oligomerization in Raft-Mimicking Lipid Mixtures. *Biophys J.* 5. Oktober 2011;101(7):1642–50.
197. Wittinghofer A. Signaling mechanistics: Aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr Biol.* 1. November 1997;7(11):R682–5.
198. Hill SJ, Williams C, May LT. Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies. *Br J Pharmacol.* November 2010;161(6):1266–75.
199. North EJ, Osborne DA, Bridson PK, Baker DL, Parrill AL. Autotaxin structure–activity relationships revealed through lysophosphatidylcholine analogs. *Bioorg Med Chem.* 1. Mai 2009;17(9):3433–42.
200. Wang L, Radu CG, Yang LV, Bentolila LA, Riedinger M, Witte ON. Lysophosphatidylcholine-induced surface redistribution regulates signaling of the murine G protein-coupled receptor G2A. *Mol Biol Cell.* Mai 2005;16(5):2234–47.
201. Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat Protoc.* August 2006;1(2):968–71.
202. Soltoff SP. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKC δ . *Trends Pharmacol Sci.* 1. September 2007;28(9):453–8.

7. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Schematischer Aufbau der Zellmembran von Säugetieren	5
Abbildung 2 Intrazelluläre Lipidsynthese von Säugetierzellen	6
Abbildung 3 Membranlipidremodulierung durch den Lands-Cycle	7
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Lipidsignalisierung	9
Abbildung 5 Kinetische Betrachtung der LysoPC-Verteilung	10
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Autotaxin Signalisierung	12
Abbildung 7 Vereinfachter schematischer Ablauf der hämatogenen Metastasierung	17
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Migration	18
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Aktinpolymerisation und Depolymerisation.....	19
Abbildung 10 Vereinfachte schematische Darstellung der Migrationssignalisierung	21
Abbildung 11 Schematischer Integrinaufbau und Bildungsschlüssel der humanen Integrine	23
Abbildung 12 Modulation der Integrinbindung	24
Abbildung 13 Schematischer Ablauf der Syndecan-induzierten Integrinaktivierung.....	27
Abbildung 14 Chemische Grundlage des MTT Assays.....	55
Abbildung 15 Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Zelladhäsion	56
Abbildung 16 Schematische Darstellung der konfokalen Mikroskopie	59
Abbildung 17 Schematische Darstellung der FRAP-Messung	64
Abbildung 18 Formel für die Berechnung der mobilen Fraktion	65
Abbildung 19 Mathematische Grundlage des Fluoreszenzwiederherstellungsmodells.....	66
Abbildung 20 Formel für die Berechnung des Zeitpunkts der Halbmaximalen Fluoreszenzwiederherstellung	66
Abbildung 21 Strukturformel TMA-DPH	67
Abbildung 22 Grundlage der Fluoreszenzanisotropie-Messung.....	68
Abbildung 23 Messaufbau der Fluoreszenzanisotropie-Messung.....	68
Abbildung 24 Berechnung der Fluoreszenzintensität	68
Abbildung 25 Berechnung der Fluoreszenzanisotropie	69
Abbildung 26 Chemische Grundlage des Bicinchoninsäure-Assays.....	71
Abbildung 27 Messprinzips der Dynamischen Massenumverteilung	73
Abbildung 28 MTT-Assay Ergebnisse von B16.F10-Zellen	76
Abbildung 29 MTT Assay von B16.F10 Zellen	77
Abbildung 30 Intrazelluläre Calciumkonzentration B16.F10 Zellen.....	79

Abbildung 31 Assay Ergebnisse mit MV3-Zellen	80
Abbildung 32 Zelluläre Adhäsion von MV3-Zellen und Flussbedingungen	81
Abbildung 33 Intrazelluläre Calciumkonzentration MV3-Zellen.....	83
Abbildung 34 Westernblot von Caspasen in MV3 Ganzzelllysaten	84
Abbildung 35 Lichtmikroskopische Aufnahme von MV3-Zellen unter LysoPC Behandlung....	85
Abbildung 36 Zweidimensionale Migration von B16.F10-Zellen	87
Abbildung 37 Zweidimensionale Migration von MV3-Zellen.....	90
Abbildung 38 Fluoreszenzanisotropie Messungen MV3.....	92
Abbildung 39 Prinzip AFM-Messung und Detailaufnahme Cantilever	93
Abbildung 40 Schematische Darstellung der Bestimmung des Elastizitätsmoduls	94
Abbildung 41 Berechnungsgrundlage des Elastizitätsmodul	94
Abbildung 42 AFM-Messungen von MV3-Zellen	95
Abbildung 43 FRAP Messung von B16.F10 Zellen	98
Abbildung 44 Schematische Darstellung von Problemen bei der FRAP-Messung.....	100
Abbildung 45 Schematische Darstellung der Fluoreszenzanisotropie.....	102
Abbildung 46 Schematische Darstellung der AFM-Messung.....	102
Abbildung 47 Schematische Darstellung der FRAP-Messung	103
Abbildung 48 Zweidimensionaler Wundheilungsassay von B16.F10-Zellen	105
Abbildung 49 DMR-Messungen von B16.F10-Zellen	106
Abbildung 50 DMR Messungen von MV3-Zellen	107
Abbildung 51 Western Blot von B16.F10-Zellen	109
Abbildung 52 FACS-Messung von GPR4 markierten B16.F10-Zellen.....	110
Abbildung 53 SDC-4 Phosphorylierung von B16.F10-Zellen	112
Abbildung 54 SDC-4 Phosphorylierung von MV3-Zellen.....	113
Abbildung 55 Schematische Darstellung des LysoPC Einfluss auf SDC-4.....	113
Abbildung 56 Prinzip des PKC Kinase Aktivitätsassays.....	116
Abbildung 57 PKC Aktivität von reinen PKC-Isoformen	117
Abbildung 58 PKC Aktivität von MV3 Ganzzelllysaten	117
Abbildung 59 PKC-Aktivität von reinen Isoenzymen unter Inhibition	119
Abbildung 60 PKC δ -Phosphorylierung im B16.F10-Zellsystem.....	120
Abbildung 61 PKC α -Phosphorylierung im B16.F10-Zellsystem.....	121
Abbildung 62 PKC δ -Phosphorylierung im MV3-Zellsystem	122

Abbildung 63 PKC α -Phosphorylierung im MV3-Zellsystem	122
Abbildung 64 Westernblot der Fokalen Adhäsionskinase in B16.F10 Zellen.....	123
Abbildung 65 Fluoreszenzmikroskopische Bilder von B16.F10-Zellen.....	124
Abbildung 66 FAK-Phosphorylierung im B16.F10 Zellsystem	125
Abbildung 67 Skizzierung der LysoPC-induzierten Adhäsionshemmung.....	128

8. Zusammenfassung

Aufbauend auf dem Zufallsbefund der antimetastatischen Wirksamkeit von leeren Liposomen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Massing wurde im Rahmen dieser Arbeit der Mechanismus der resultierenden Effektor-Substanz LysoPC weiter aufgeklärt.

Dafür mussten ein breites Spektrum an zellbiologischer und biophysikalischer Methoden eingesetzt werden.

Da mittels Biosensor-Techniken ein Rezeptor-vermittelter Effekt des LysoPCs auf die potentiellen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hinreichend ausgeschlossen werden konnte, fokussierten sich die weiteren Untersuchungen auf die biophysikalisch getriebenen Membran-Veränderung unter LysoPC.

Folgerichtig sehen wir Unterschiede in Abhängigkeit von der Sättigung des verwendeten LysoPCs, die sich im gewählten Zellsystem der murinen B16.F10 Zellen zu einem homogenen Funktionsbild zusammenfügen, das in dieser Arbeit als Postulat vorgelegt wird.

Eine LysoPC-Konzentration, für die in Gegenwart von Albumin eine Toxizität ausgeschlossen werden kann, induziert eine Membran-Rigidisierung, die durch FRAP bewiesen werden konnten.

Diese veränderte Membranfluidität induziert eine Deregulierung der zellulären Adhäsionsprozesse, was sich eindrucksvoll in einer Abnahme der Migrationsfähigkeit der Zellen manifestiert.

Die zugrunde liegende molekulare Erklärung hierfür zeigt sich in einer Störung der Fokalen Adhäsions-Komplex-Bildung, die auch fluoreszenzmikroskopisch detektierbar war.

Grundlage dafür ist die Aktivitätsbeeinflussung der Proteinkinase-C delta, in deren Folge die Komplexbildung aus Syndecan-4, PiP_2 und PKC-alpha gestört wird und zu einer Funktionsabnahme der Integrine führt.

Mit dem vorgelegten Interaktionsmodell konnte erstmals eine Erklärung für den antimetastatischen Effekt von LysoPC vorgelegt werden.

Die Daten dieser Arbeit stellen eindrucksvoll die Möglichkeiten und Grenzen des LysoPCs als pharmakologische Strategie dar.

Obwohl eine gezielte Gabe von LysoPC aus ersten präliminären Untersuchungen keine alleinige aussichtsreiche Möglichkeit repräsentiert, klären die Daten eindrucksvoll die positiven Nebeneffekte liposomaler Strategien.

In Anbetracht einer breiten Anwendung von Phospholipiden als Carrier Systeme weisen die Daten auf potentielle Eigenwirkungen der als pharmazeutische Hilfsstoffe angesehen Phospholipide hin.

So lässt sich die eingangs aufgeführte Hypothese erhärten, dass Phospholipide im neoplastischen Gewebe als Prodrugs anzusehen sind, die eine pharmakologische Eigenwirkung entfalten.

Dies sollte in Zukunft in Hinblick auf regulatorische Aspekte stärkere Beachtung finden. Möglicherweise sorgt diese Arbeit dafür, dass Phospholipid basierte Carrier Systeme in der Onkologie damit einen neuen Impuls erhalten.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die ihren ganz besonderen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung während der gesamten Dissertationszeit, die geschaffene angenehme wie auch gleichermaßen produktive Arbeitsatmosphäre und für das Liefern der nötigen Motivation, um auch in Tiefphasen das Ziel nicht völlig außer Augen zu verlieren.

Prof. Dr. Ulrich Massing danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur, die gute Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch im Zuge unserer Kooperationen.

Weitere im Rahmen dieser Arbeit entstandene Kooperationsmöglichkeiten boten neben dem Zugang zu neuen technischen Verfahren auch immer einen anderen Blickwinkel auf eigene Fragestellungen und ermöglichten es so eigene Konzepte zu optimieren.

In diesem Zusammenhang danke ich Professor Dr. Evi Kostenis und Dr. Manuel Grundmann für die Ermöglichung und die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Messungen der dynamischen Massenumverteilung am Institut für Pharmazeutische Biologie in Bonn sowie die gute Zusammenarbeit bei der aus dieser Arbeit resultierenden gemeinsamen Publikation.

Auch möchte ich Prof. Dr. Stefan Schneider und Dr. Christian Gorzelanny für die Ermöglichung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Rasterkraftmikroskopie-Messungen am Universitätsklinikum Mannheim danken.

Dr. Ursula Gerber, Sebastian Heuter, Bastian Jakubzig und Dr. Martin Schlesinger danke ich für die Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung neuer Messmethoden im Arbeitskreis Bendas.

Dem gesamten Arbeitskreis Bendas danke ich für die angenehme und familiäre Arbeitsatmosphäre während der gesamten Promotionszeit.

Christina Hoegen-Leist danke ich für das sorgfältige Lektorat dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen lieben Eltern Uschi und Manfred Ross danken, die mich während meiner gesamten Universitätszeit in einem ausgesprochenen Maß unterstützt haben und denen ich so Vieles in meinem Leben verdanke.