



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Der Einfluss der Cyclohexadepsipeptide, Enniatin B und Beauvericin, auf die lysosomale Aktivität in KB-3-1 Zellen“

verfasst von / submitted by

Theresa Valentina Redinger

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meiner Betreuerin ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber für das Bereitstellen des interessanten Themas und die zahlreichen Ratschläge während der gesamten Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich Dr. Mohammed Aufy für die rasche Beantwortung all meiner Fragen und Einführung in die Arbeitstechnik der Zellkultur. Auch an Mag. Carina Kamplleitner möchte ich ein großes Dankeschön richten für ihre Hilfsbereitschaft und die ausgezeichnete Betreuung während der praktischen Arbeit.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, welche mir nicht nur das Studium ermöglicht hat, sondern auch immer für mich da war. Danke Mama, dass du mich für die Pharmazie begeistert hast und mich immer ermutigt hast weiter zu machen.

Bei meinem Partner, Florian, bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Danke, dass ich, egal ob beim Sammeln von Pflanzen oder beim Abfragen von Nebenwirkungen, immer auf dich zählen konnte!

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen beiden Studienkolleginnen und guten Freundinnen, Victoria und Lisa, bedanken. Ohne euch hätten die langen Lernnächte, Lernwochen und –monate und auch das Feiern danach nur halb so viel Spaß gemacht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer, als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, Juli 2018

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Cyclohexadepsipeptide	1
1.1.1 Enniatin B und Beauvericin	1
1.2 Das Lysosom	6
1.2.1 Aufbau und Funktion	6
1.2.2 Lysosomale Enzyme	8
1.2.3 Lysosomen als Auslöser von Apoptose	9
2. ZIELSETZUNG	10
3. MATERIAL UND METHODEN	11
3.1 Zusammenfassung des Versuchsaufbaus	11
3.2 Testsubstanzen und Reagenzien	12
3.3 Zelllinie und Kulturmedium	14
3.4 Kultivierung der Zellen	15
3.4.1 Auftauen der Zellen	15
3.5.2 Passagieren	15
3.4.3 Bestimmung der Zellzahl	16
3.5 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie	18
3.5.1 Prinzip der LysoTracker-Red DND-99 Färbung	18
3.5.2 Prinzip der DAPI-Färbung	19
3.5.3 Durchführung	19
3.5.4 Methodenoptimierung	22
3.6 Auswertung der Ergebnisse	23
3.6.1 Verwendete Software	23
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	25
4.1 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie	25
4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	25

4.1.2 Auswertung der Aufnahmen 30

5. ZUSAMMENFASSUNG UND ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN 33

6. KURZFASSUNG 35

7. ABSTRACT 36

Abkürzungsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis II

Tabellenverzeichnis IV

Literaturverzeichnis V

1. Einleitung

Krebserkrankungen sind ein weltweit vorhandenes Gesundheitsproblem. Für das Jahr 2018 werden etwa 1,7 Millionen Neuerkrankungen und etwa 600.000 durch maligne Erkrankungen bedingte Todesfälle alleine in den Vereinigten Staaten von Amerika geschätzt (Siegel et al., 2018). In Österreich treten jährlich etwa 40.000 neu diagnostizierte Tumorerkrankungen auf. Damit reihen sie sich als zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein (Statistik Austria, 2018).

Durch die Entstehung von therapieresistenten Tumorarten bzw. durch die oftmals schwerwiegenden Nebenwirkungen, die eine Zytostatikatherapie verursacht, ist man stets auf der Suche nach neuen Wirkstoffen und neuen Behandlungsstrategien (Fojo et al., 2014; Wu et al., 2017). In den letzten Jahren haben sich Cyclohexadepsipeptide hierfür als eine vielversprechende Substanzklasse herausgestellt (Lemmens-Gruber et al., 2009).

1.1 Cyclohexadepsipeptide

Strukturell betrachtet sind Cyclohexadepsipeptide zyklisch verknüpfte Peptide, welche sowohl aus α -Aminosäuren als auch α -Hydroxysäuren aufgebaut sind. Bei der Verknüpfung der Aminosäuren handelt es sich aus diesem Grund um keine Säureamidbindung, wie dies bei klassischen Peptiden der Fall ist, sondern um Esterbindungen (Sivanathan & Scherckenbeck, 2014).

1.1.1 Enniatin B und Beauvericin

Die Mykotoxine Enniatin B (EnnB) sowie Beauvericin (Bea) sind sekundäre Schimmelpilz-Metabolite, welche vor allem von verschiedenen *Fusarium-Arten* produziert werden. Sie gehören beide der Substanzklasse der Cyclohexadepsipeptide an. Das Vorkommen der beiden beschränkt sich vorwiegend auf Getreide, wodurch Brot,

Semmeln, Nudeln und andere getreidehaltige Nahrungsmittel häufig kontaminiert sind (Jestoi, 2008; Logrieco et al., 2002).

Zudem ist bekannt, dass auch die Verarbeitung von befallenem Getreide die Struktur von EnnB und Bea nicht beeinflusst (de Nijs et al., 2016; Luz et al., 2017). Nichtsdestotrotz existieren, betreffend einer akuten Exposition, seitens der *European Food Safety Authority* (EFSA) keine Grenzwerte für Enniatine bzw. Beauvericin. Zwar gibt es auch Bedenken bezüglich einer chronischen Aufnahme, jedoch konnte auch hier aufgrund der wenigen toxikologischen Daten kein endgültiges Risiko bestätigt werden (EFSA, 2014).

Das erste Enniatin, Enniatin A, wurde von Gaumann et al. im Jahr 1947 beschrieben (Gaumann & Roth, 1947). Die erste erfolgreiche Isolierung von Beauvericin aus *Beauveria bassiana* fand 1969 statt (Hamill et al., 1969).

1.1.1.1 Chemische Struktur

Die chemische Struktur von Enniatin B (Abbildung 1) und Beauvericin (Abbildung 2) ist sehr ähnlich. Beide sind jeweils aus drei α -Aminosäuren mit einer lipophilen, variablen Seitenkette und abwechselnd drei D-Hydroxyisovaleriansäuren aufgebaut. Zusammen bilden diese Strukturelemente einen 18-gliedrigen Ring. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Seitenketten der wichtigsten Enniatine sowie von Beauvericin. Hier lässt sich erkennen, dass es sich bei Bea um aromatische Reste, bei EnnB und den Derivaten um aliphatische handelt (Prosperini et al., 2017; Wang & Xu, 2012).

Die Moleküle weisen eine amphiphile Struktur auf, wobei der Ring selbst den hydrophilen Teil darstellt und die nach außen gerichteten Seitenketten einen lipophilen Charakter besitzen.

Tabelle 1: Übersicht über die unterschiedlichen Seitenketten ausgewählter Enniatine und Beauvericin (Mallebrera et al., 2018; Sy-Cordero et al., 2012)

Substanz	R1	R2	R3
Enniatin A	Sek. Butyl	Sek. Butyl	Sek. Butyl
Enniatin A1	Isopropyl	Sek. Butyl	Sek. Butyl
Enniatin B	Isopropyl	Isopropyl	Isopropyl
Enniatin B1	Isopropyl	Isopropyl	Sek. Butyl
Beauvericin	Phenylmethyl	Phenylmethyl	Phenylmethyl

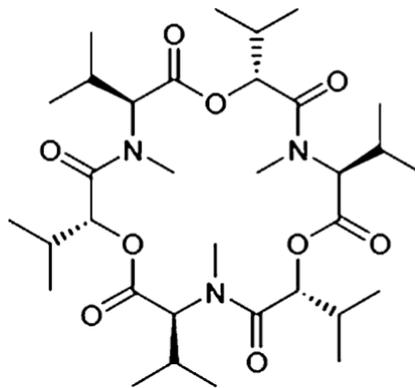


Abbildung 1: Chemische Struktur von Enniatin B (Ivanova et al., 2012)

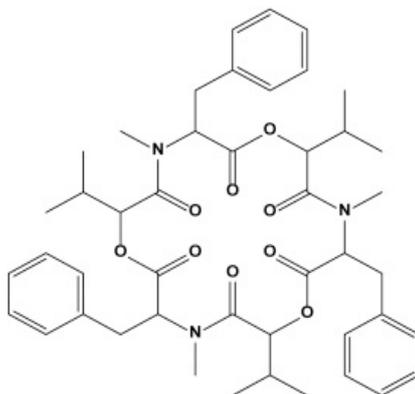


Abbildung 2: Chemische Struktur von Beauvericin (Mallebrera et al., 2018)

1.1.1.2 Wirkungen

Durch die hydrophobe Teilstruktur ist eine Inkorporation der Mykotoxine in die biologische Membran von Zellen möglich. Die Bildung einer Pore erfolgt mithilfe des hydrophilen Ringsystems. Diese Pore ist durchlässig für mono- und divalente Kationen, wobei vor allem K^+ , Ca^{2+} , Na^+ und Mg^{2+} in absteigender Selektivität transportiert werden können. Man bezeichnet EnnB und Bea folglich als ionophore Substanzen (Jestoi, 2008; Kamyar et al., 2004).

EnnB sowie Bea weisen generell ein breites biologisches Wirkungsspektrum auf. Für beide liegen Daten über deren insektizide, antibiotische und ionophore Eigenschaften vor (Kamyar et al., 2004; Kouri et al., 2003). Ein Gemisch von Enniatin A, A1, B und B1, auch bekannt als das Kombinationsarzneimittel Fusafungin, ist seit 1957 zur topischen Behandlung von Nasen- und Racheninfektionen im Handel (Taevernier et al., 2015). Beauvericin findet Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM), sowie in Zubereitungen mit bekannter antineoplastischer sowie antikonvulsiver Wirkung. Zusätzlich ist ein Patent für Bea in Tablettenform zur Senkung des Cholesterinspiegels im Blut vorhanden (Jestoi, 2008). Diese Wirkung beruht auf der Hemmung der Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT), welche vor allem durch Bea, aber auch von EnnB ausgelöst wird (Tomoda et al., 1992).

Neben diesen Effekten, gewann auch die zytotoxische Wirkung der beiden Substanzen in den letzten Jahren an Bedeutung. *In vitro* zeigte sich eine Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien, während der Effekt bei gesunden Zellen geringer ausgeprägt war. Jedoch war die Wirkung nur bei Konzentrationen im niedrigen, mikromolaren Bereich vorhanden. Eine kurze Exposition mit EnnB im nanomolaren Bereich führte hingegen zu einer gesteigerten Zellproliferation (Dornetshuber et al., 2007; Heilos et al., 2017; Tonshin et al., 2010).

Weiters zeigte sich auch *in vivo* bei Bea eine deutliche zytotoxische Wirkung bei Mäusen mit Colon- bzw. Cervixcarcinomen (Heilos et al., 2017). Bei Enniatin B hingegen wird eine synergistische Wirkung mit Sorafenib, einem Tyrosinkinaseinhibitor, beschrieben (Dornetshuber-Fleiss et al., 2015).

Sowohl EnnB als auch Bea führen zur Zellschrumpfung, DNA-Fragmentierung und Bildung von Apoptose-Körpern (Dornetshuber et al., 2007). All diese Effekte sind Kennzeichen für einen durch Apoptose ausgelösten Zelltod. Bei höheren Konzentrationen und längeren Inkubationszeiten, sind allerdings auch nekrotische Vorgänge zu beobachten (Ivanova et al., 2012).

Ein verändertes Ionengleichgewicht, genauer der Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum, führt zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. In weiterer Folge kommt es zu einer Depolarisation der Mitochondrien, wodurch Cytochrom c freigesetzt und so Caspase-3 aktiviert werden kann. Es erfolgt letztlich eine Einleitung der Apoptose durch den intrinsischen, mitochondrialen Weg (Jow et al., 2004; Tonshin et al., 2010).

Auch ein Zellzyklus-Arrest während der G0/G1-Phasen zeigte sich bei Experimenten mit EnnB (Gammelsrud et al., 2012). Eine Beteiligung von DNA-Schäden sowie von oxidativem Stress an der Zytotoxizität konnte nicht nachgewiesen werden (Dornetshuber et al., 2009a).

Weiters haben sich Beauvericin und Enniatin B sowohl als Hemmer sowie Substrate von *ATP-binding-casette*(ABC)-Transportern herausgestellt. Diese Transporter stellen vor allem in der Krebstherapie ein Problem dar, da sie in der Lage sind Zytostatika aus den Zellen hinauszutransportieren (Dornetshuber et al., 2009b).

1.1.1.3 Einfluss auf die lysosomale Aktivität

Dennoch scheint der mitochondriale Weg nicht alleine verantwortlich bzw. nicht der initiale Schritt für die durch EnnB sowie Bea vermittelte Zytotoxizität zu sein (Dornetshuber et al., 2007; Ivanova et al., 2012; Tonshin et al., 2010). Durch eine lysosomale Membran-Destabilisierung ist ein „cross-talk“ zwischen den Mitochondrien und den Lysosomen möglich. Allerdings ist der genaue molekulare Mechanismus der Beteiligung der Lysosomen an der Apoptose noch nicht vollständig geklärt (Repnik & Turk, 2010).

Es wird jedoch vermutet, dass die ionophoren Eigenschaften der Mykotoxine eine bedeutende Rolle spielen (Ivanova et al., 2012). Eine weitere Studie berichtet zusätzlich von der Einlagerung von Lipiden in die Membran der Lysosomen als mögliche Ursache für eine lysosomale Membran-Permeabilisation (LMP) (Gammelsrud et al., 2012).

1.2 Das Lysosom

Lysosomen sind zelluläre, eukaryontische Vesikel, mit einer Vielzahl hydrolytischer Enzyme, um Makomoleküle in deren Untereinheiten abzubauen. Daneben wird auch eine lysosomal ausgelöste Apoptose diskutiert. Somit stellen diese speziellen Organellen einen vielversprechenden neuen Ansatzpunkt in der Krebstherapie dar (Boya & Kroemer, 2008; Repnik & Turk, 2010).

1.2.1 Aufbau und Funktion

Lysosomen (siehe Abbildung 3), welche auch „Abfalleimer der Zellen“ genannt werden, weisen einen Durchmesser von 0,2-0,5 μm auf. Sie sind von einer einfachen Membran umgeben. Durch die Glykosylierung der lysosomalen Membranproteine wird deren Stabilität gegenüber den Enzymen im Inneren der Lysosomen gewährleistet. Die Generierung des luminalen, sauren pH-Wertes zwischen 4,5-5,0 erfolgt durch eine membranständige V-Typ H^+ -ATPase. Dies ist essentiell für die optimale Funktionsweise der Hydrolasen, welche nur im Sauren aktiv sind, jedoch kaum bei physiologischem pH-Wert. So kann außerhalb der Lysosomen weniger Schaden durch diese Enzyme entstehen (Alberts et al., 2015).

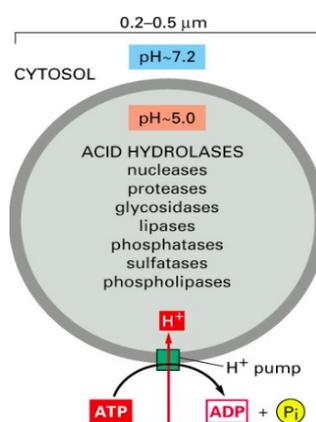


Abbildung 3: Übersicht über den Aufbau eines Lysosoms (Alberts et al., 2015)

Abbildung 4 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Wege, um die zum Abbau bestimmten Moleküle zu den Lysosomen zu transportieren. Alle angeführten Mechanismen führen zu einer Verschmelzung mit den Lysosomen.

Der bereits am besten untersuchte Weg ist die Endozytose (Alberts et al., 2015). Hierbei werden die Moleküle aus dem Extrazellularraum durch Einstülpung und nachfolgender Abschnürung der Membran von Zellen aufgenommen. Die gebildeten Vesikel sind mit verschiedenen Proteinen, wie Clathrin, beschichtet, wodurch das richtige Ziel gefunden werden kann (Müller-Esterl, 2011). Dem folgend kommt es zur Fusionierung mit den sogenannten frühen Endosomen, die sich in der Peripherie der Zelle befinden. Nach der Aufnahme der Vesikel werden späte Endosomen gebildet und die Aufnahme in das Lysosom ist möglich (Alberts et al., 2015).

Auch phagozytierende Zellen, z.B. Makrophagen, können Makromoleküle sowie Mikroorganismen durch Bildung von Phagosomen aufnehmen. Nach erfolgter Fusion können die Bestandteile im Lysosom abgebaut werden (Alberts et al., 2015).

Die Autophagie beschreibt den dritten Mechanismus des Abbaus. Hierbei werden zelleigene Moleküle, sogar ganze Organellen, verwertet. Das sogenannte Autophagosom ist von einer Doppelmembran umgeben (Alberts et al., 2015).

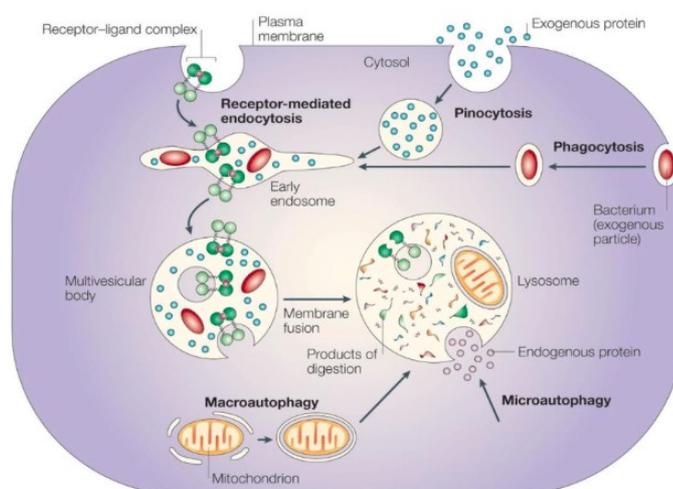


Abbildung 4: Verschiedene Wege des Transportes von abzubauenem Material zu den Lysosomen (Mitskevich et al., 2017)

1.2.2 Lysosomale Enzyme

Im Inneren der Lysosomen befinden sich zahlreiche verschiedene saure Hydrolasen. Dazu gehören auch Proteasen, welche die Peptidbindungen von Proteinen spalten können (Tardy et al., 2006). Eine Einteilung dieser kann anhand der Aminosäuresequenz in deren katalytischem Zentrum durchgeführt werden. Man unterscheidet Aspartat-, Asparagin-, Cystein-, Glutamin-, Threonin- und Metalloproteasen (Rawlings et al., 2011).

1.2.2.1 Cathepsine

Eine bedeutende Gruppe der lysosomalen Peptidasen sind die Kathepsine. Man unterteilt diese in die Papain-ähnlichen Cystein-Kathepsine (B, C, F, H, K, L, N, O, S, T, U, W, X), die Aspartat-Kathepsine D und E sowie die Serinprotease Kathepsin G (Tardy et al., 2006).

Die Synthese der Kathepsine findet am rauen Endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Hier erhalten sie zusätzlich zur N-terminalen Glykosylierung einen Mannose-6-Phosphat-Rest als Erkennungssequenz. Nachfolgend werden sie über den Golgi-Apparat mithilfe von Transportvesikeln zu den Lysosomen gebracht. Diese Vesikel enthalten einen spezifischen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR). Der so gebildete Proenzym-Rezeptor-Komplex kann allerdings nur bei saurem pH-Wert in den Lysosomen dissoziieren. Anschließend kann der nun leere Rezeptor wieder recycelt werden indem er zum Golgi-Apparat zurücktransportiert wird. Ist der pH-Wert in den Lysosomen erhöht können sich die Hydrolasen nicht mehr vom Rezeptor lösen und es kommt zu einer Anreicherung im Zytosol (Alberts et al., 2015; Löffler, 2008). Der Effekt einer Erhöhung des lysosomalen pH-Wertes ist zum Beispiel durch das lysosomotrope Amin, Ammoniumchlorid, gegeben. Dieses wird als NH_3 in die Zelle aufgenommen und durch das Ionen-Fallen-Prinzip in den Lysosomen angereichert. Schließlich neutralisiert das Amin so, durch Aufnahme von H^+ den sauren pH-Wert der Lysosomen (Lorenzo et al., 2000; Moriyama et al., 1992).

Weiters zeigte eine Studie, dass es bei einigen Tumorarten zur Freisetzung bestimmter Kathepsine, B und L, in den Extrazellularraum kommt. Dies resultiert in einer vermehrten Angiogenese und damit verbunden einer Erhöhung der Wachstumsrate und Metastasierung des Tumors (Lorenzo u. a., 2000).

1.2.3 Lysosomen als Auslöser von Apoptose

Der Prozess des programmierten Zelltodes, auch Apoptose genannt, führt zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen und ist ein Energie-abhängiger biochemischer Prozess. Zwar sind schon viele der apoptotischen Mechanismen und deren Schlüssel-Proteine bekannt, bestimmte molekulare Details bzw. alternative Initiationsrouten müssen noch geklärt werden (Elmore, 2007).

Obwohl bereits bekannt ist, dass Lysosomen gemeinsam mit Kathepsinen bei der Autophagie sowie bei der Nekrose eine wichtige Rolle spielen, ist deren Bedeutung bei der Apoptose noch nicht vollständig geklärt (Repnik et al., 2012). Durch eine lysosomale Destabilisierung können Kathepsine ins Zytosol freigesetzt werden. Diese wiederum können so über einen Caspase-abhängigen, mitochondrialen Mechanismus oder direkt, über einen Caspase-unabhängigen Weg, den programmierten Zelltod auslösen. Eine lysosomale Membran-Permeabilisation (LMP) kann entweder durch osmotische Lysis oder durch direkte permeabilisierende Eigenschaften von Substanzen erzeugt werden. In Abbildung 5 werden die Mechanismen der lysosomal vermittelten Apoptose durch eine LMP aufgezeigt. Zwar liegt die optimale Aktivität der Kathepsine bei saurem pH-Wert vor, eine Restaktivität zeigt sich allerdings auch bei physiologischem pH-Wert. Daraus ergibt sich, dass diese Organellen einen potentiellen Angriffspunkt neuer Substanzen in der Krebstherapie darstellen (Boya & Kroemer, 2008; Kirkegaard & Jäätelä, 2009; Repnik et al., 2014).

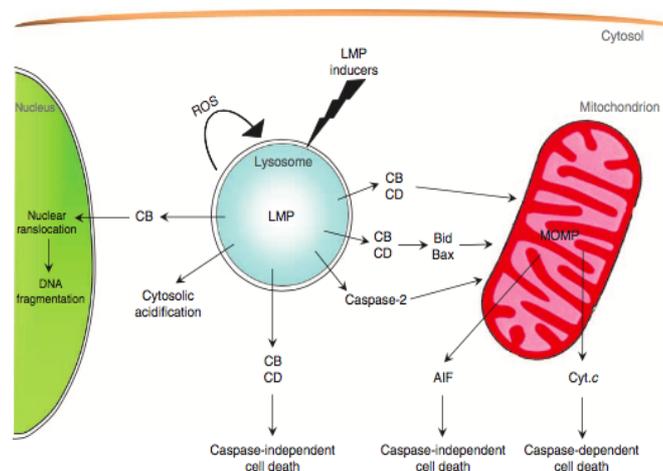


Abbildung 5: Mechanismen des Zelltodes durch freigesetzte, cytosolische Kathepsine (Boya & Kroemer, 2008)

2. Zielsetzung

Cyclohexadepsipeptide, zu denen auch Enniatin B (EnnB) und Beauvercin (Bea) gehören, sind Mykotoxine mit einem breiten biologischen Wirkspektrum. Neben einer zytotoxischen Wirkung auf Krebszellen konnte im Mausmodell auch eine synergistisch-zytotoxischer Effekt von EnnB mit Sorafenib, einem Proteinkinaseinhibitor, erwiesen werden (Dornetshuber et al., 2007; Dornetshuber-Fleiss et al., 2015). Daher gelten diese Wirkstoffe als potentielle Kandidaten in der Therapie maligner Tumorerkrankungen (Lemmens-Gruber et al., 2009).

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, die bereits vorhandenen, gesammelten Daten der beiden genannten Mykotoxine zu ergänzen. Hierbei wurde das Augenmerk auf die Beteiligung der Lysosomen an der durch EnnB und Bea vermittelten Zytotoxizität gelegt.

Zur Überprüfung dieser These, fand die Methode der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung. Dazu wurden die sauren Lysosomen von KB-3-1 Zellen mittels dem Farbstoff LysoTracker Red DND-99 angefärbt und sichtbar gemacht. Zusätzlich kam auch die häufig verwendete DAPI-Färbung zur Visualisierung des Zellkerns zum Einsatz. Anhand dieses Versuchsaufbaus sollte überprüft werden, ob es nach Behandlung mit den beiden Testsubstanzen zu einer lysosomalen Destabilisierung bzw. zu einer pH-Wert Erhöhung kommt. Beide Mechanismen sind durch einen Verlust der Fluoreszenzfärbung gekennzeichnet.

3. Material und Methoden

Dieser Abschnitt beinhaltet eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Versuche sowie eine Auflistung aller verwendeten Substanzen und Reagenzien.

3.1 Zusammenfassung des Versuchsaufbaus

Ziel der praktischen Arbeit war, wie in Abschnitt 2 beschrieben, die Erarbeitung einer geeigneten Methode zur Feststellung, ob es zu einer verminderten Anzahl der sauren Lysosomen kommt bzw. ob sich der pH-Wert der Lysosomen durch die Zugabe der beiden Cyclohexadepsipeptide, Enniatin B und Beauvericin, verändert. Dazu dienten Versuche der Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie. Da bereits im Vorfeld Experimente am Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit der KB-3-1 Zelllinie und den beiden oben genannten Substanzen durchgeführt worden waren, kamen diese für die nachfolgenden Versuche zur Verwendung. Die Färbung der Lysosomen erfolgte mittels dem roten Fluoreszenzfarbstoff, LysoTracker Red DND-99, welcher sich spezifisch in den sauren Lysosomen anreichert (Thermo Fischer Scientific, 2018b). Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden mit Enniatin B bzw. Beauvericin behandelt, anschließend gefärbt, fixiert und mikroskopiert. Als Referenzwerte dienten unbehandelte Zellen sowie mit Ammoniumchlorid behandelte. Zur Auswertung der Fluoreszenzbilder, im speziellen der lysosomalen Fläche einzelner Zellen, kam die Software Fiji zur Anwendung. Es bedingte jedoch verschiedener Optimierungen des Versuchsprotokolls, um die Lysosomen sichtbar zu machen. Für die Generierung von statistisch aussagekräftigen, experimentellen Daten war es notwendig alle Testreihen mit den jeweiligen Substanzen dreimal zu wiederholen.

3.2 Testsubstanzen und Reagenzien

Eine Übersicht aller verwendeter Substanzen, deren Hersteller, Anwendung und falls relevant auch deren verwendeter Konzentrationen, findet sich in Tabelle 2. Alle weiteren verwendeten Reagenzien und Chemikalien werden in Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 2: Testsubstanzen

Testsubstanzen	Hersteller	Anwendung	Verwendete Konzentration
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich, Austria	Lysosomotrop; Positivkontrolle (weniger LTR-Färbung)	20 mM
Beauvericin (in DMSO gelöst, bei -20°C gelagert)	BioAustralis, Smithfield, Australia	Testsubstanz	0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM
Enniatin B (in DMSO gelöst, bei -20°C gelagert)	R.D. Süssmuth, TU Berlin, Institut für Chemie	Testsubstanz	0,625 µM, 1,25 µM, 2,5 µM, 5 µM
LysoTracker Red DND-99 (in DMSO gelöst, bei -20°C gelagert)	Invitrogen by Life Technologies	roter Fluoreszenzfarbstoff, um saure Organellen zu markieren	600 nM
Roti® - Mount FluroCare DAPI	Carl Roth, Austria	Wasserlösliches Einschlussmittel für Fluoreszenzmikroskopie; enthält DAPI	-

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien	Hersteller	Anwendung	Verwendete Konzentration
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	gibco by Life Technologies	dient als Kulturmedium	-
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Austria	Lösungsmittel, Kryoschutzmittel	-
FBS (Fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Austria	für Wachstum der Zellen	10% in Medium gelöst
Immersionsöl	Carl-Roth, Austria	zwischen Präparat und Objektivlinse; fluoreszenzgetestet	-
4% Para-Formaldehyd	Carl-Roth, Austria	Fixierung der Zellen	-
PBS, pH 7,4 (Phosphate-Buffered Saline)	gibco by life technologies	Waschen der Zellen	-
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Austria	gegen bakterielle Kontaminationen	1% in Medium gelöst
0,04% Trypanblau	Sigma-Aldrich, Austria	Bestimmung der Zellzahl	-
0,05% Trypsin-EDTA	gibco by life technologies	Ablösen der adhärennten Zellen von Kulturflaschen	-

3.3 Zelllinie und Kulturmedium

Für die durchgeführten Experimente kommt die KB-3-1 Zelllinie (zur Verfügung gestellt von Dr. Shen Bethesda, USA) zur Anwendung. Diese wurde 1955 von Harry Eagle eingeführt und stammt ursprünglich von einem Epidermoidkarzinom (heute bekannt als Plattenepithelkarzinom) aus dem Rachen eines Mannes (Eagle, 1955a). Eagle arbeitete jedoch zur gleichen Zeit auch mit HeLa-Zellen, welche wiederum von einem mit HPV-18 infizierten Zervixkarzinom einer afroamerikanischen Frau abstammen (Eagle, 1955b).

Anhand verschiedener genetischer Testungen zeigte sich jedoch, dass es sich bei allen KB-Zellen der „American Type Culture Collection“ (ATCC) eigentlich um HeLa-Derivate handelte. Alle getesteten Zellen enthielten nicht nur spezifische Markerchromosomen, es fehlte auch das des Y-Chromosoms. Folglich kam es bereits vor der Deponierung bei der ATCC zu einer Kontamination mit HeLa-Zellen. Daher müssen KB-3-1 Zellen nun als Modelle einer humanen Zervixkarzinomlinie betrachtet werden (Lavappa et al., 1978; Vaughan et al., 2017).

Bei der Zelllinie KB-3-1 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen, welche sich bereits nach etwa 24 Stunden mithilfe von Adhäsionsmolekülen am Boden der Kulturflasche absetzen. Dabei verändert sich auch die Struktur der Zellen. Kommt es zum Zelltod, lösen sie sich wieder vom Untergrund und sie finden sich frei im Medium wieder.

Als Kulturmedium findet Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Anwendung. Dieses wird mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% Fetalem Bovinem Serum (FBS) versetzt. Die Zugabe des Antibiotikums schützt vor bakteriellen Kontaminationen der Zellen. FBS liefert den Zellen wichtige Nährstoffe, Wachstumsfaktoren und Hormone. Vor der Verwendung wird das ansonsten bei 2-8°C im Kühlschrank gelagerte Medium bei 37°C im Wasserbad erwärmt, um die Zellen nicht unnötigem Stress auszusetzen.

3.4 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 25 cm² Schräghalskulturflaschen mit je 5 ml Fassungsvermögen pro Flasche. Die Temperatur des Inkubators wird auf 37°C und 5% CO₂ konstant gehalten. Alle Arbeitsschritte der Zellkultur fanden stets unter sterilen Bedingungen unter dem Laminar-Air-Flow (LAF) statt.

3.4.1 Auftauen der Zellen

Um eine langfristige, sichere Lagerung der Zellen zu gewährleisten, findet die Aufbewahrung der Zellen entweder in DMSO-haltigem Medium, eingetaucht in flüssigen Stickstoff, oder bei einer Temperatur von -80°C im Gefrierschrank statt. Das Überführen der gefrorenen Zellen in ein 37°C-warmes Wasserbad führt zum Auftauen. Anschließend werden diese in ein mit 10 ml Medium befülltes „Falcon-Röhrchen“ pipettiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1000 Umdrehungen/Minute ist das Absaugen des Überstands notwendig. Dies ist nötig, um das noch vorhandene, für die Zellen schädliche DMSO im Medium zu entfernen. Das so erhaltene Zellpellet wird mit 1 ml frischem Kulturmedium durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette resuspendiert. Abschließend wird nach Vorlegen von 4 ml Medium in eine 25 cm² große Zellkulturflasche die Zellsuspension dazu pipettiert und inkubiert.

3.5.2 Passagieren

Da es sich bei KB-3-1 um adhärenzte Zellen handelt, können diese nur wachsen, wenn genug freie Fläche vorhanden ist. Bei einer Konfluenz der Zellen von 70-80% müssen diese in eine neue Kulturflasche überführt werden, was auch Passagieren oder Subkultivieren genannt wird. Liegt die Zellzahl unterhalb oder oberhalb dieses Richtwertes, kann sich die Zellteilungsgeschwindigkeit und auch die Zellpopulation verändern.

Nach dem Absaugen des Mediums mit Hilfe einer Saugflasche und einer sterilen Pipette erfolgt das Waschen des Zellrasens mit etwa 2 ml PBS durch mehrmaliges, leichtes

Schwenken der Flasche. Die Waschflüssigkeit wird erneut abgesaugt. Erst danach kann der Zellmonolayer mit 500 µl 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet und die Kulturflasche im Brutschrank für 5 Minuten inkubiert werden. Die Spaltung erfolgt enzymatisch durch die Endopeptidase Trypsin. Sollten sich nach Ende der Inkubationszeit Schlieren im Medium gebildet haben, weist dies auf eine erfolgreiche Spaltung hin und die Zellen haben sich vom Untergrund gelöst. Die Zugabe von etwa 4 ml frischem Medium führt zur Unterbrechung dieses Vorgangs. Erneutes Auf- und Abpipettieren resultiert in einer Resuspension. Von der so erhaltenen Zellsuspension werden nun 500 µl in eine neue, bereits mit 4,5 ml Medium befüllte Kulturflasche überführt.

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Aussäen der Zellen auf Coverslips ist es notwendig die exakte Zellzahl zu bestimmen, um konstante und optimale Versuchsbedingungen zu schaffen. Nach dem Ablösen des Zellrasens mit Trypsin (siehe Abschnitt 3.3.2), wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen gebracht und für 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgesaugt. So kann das Trypsin vollständig entfernt und das Zellpellet mit 5 ml neuem Medium resuspendiert werden.

Die eigentliche Zählung findet, nach Trypanblau-Färbung der Zellen, unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer, einem Hämocytometer, statt. Trypanblau, ein saurer Azofarbstoff, kann aufgrund seiner Größe nicht in lebende Zellen eindringen, wodurch ausschließlich tote Zellen im Mikroskop als tiefblaue Punkte erkennbar sind. Im Gegensatz dazu erscheinen lebende Zellen hell. Nur diese werden später für die Quantifizierung ausgezählt. Für die Bestimmung wird ein Aliquot (je 10µl) der Zellsuspension und der 0,4% Trypanblaulösung miteinander vermischt. Anschließend wird die Suspension in die zuvor mit 70%-igem Alkohol gereinigte Zählkammer überführt bis diese vollständig angefüllt ist. Die Auszählung sollte möglichst rasch unter dem Mikroskop erfolgen, da der Farbstoff bei längerer Einwirkdauer zytotoxisch wirkt.

Die Neubauer-Zählkammer ist aus vier identen Quadraten aufgebaut, von welchen jedes wiederum in 16 kleinere quadratische Abschnitte unterteilt ist. Abbildung 6 zeigt eines der vier großen Eckquadrate, sowie die Richtung der Auszählung. Hierbei ist zu beachten, dass je nur zwei Ränder pro Quadrat in die Zählung miteinbezogen werden um eine doppelte Zählung zu vermeiden. Nach der Auswertung von allen vier Quadraten wird der Mittelwert gebildet und wegen der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau mit zwei multipliziert. Da jedes Eckquadrat ein Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ ($= 0,1 \text{ }\mu\text{l}$) aufweist, muss der zuvor erhaltene Wert mit 10^4 multipliziert werden. Dies ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

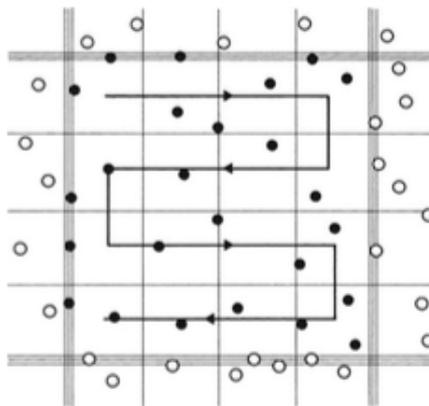


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer (Schmitz, 2011)

Die gesamte, in Abschnitt „3.4 Kultivierung der Zellen“ beschriebene, Arbeitsweise orientiert sich an dem Buch „Der Experimentator: Zellkultur“ (Schmitz, 2011).

3.5 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Der folgende Abschnitt widmet sich der detaillierten Beschreibung der durchgeführten Fluoreszenzfärbung und anschließender Mikroskopie.

3.5.1 Prinzip der LysoTracker-Red DND-99 Färbung

Der rote Fluoreszenzfarbstoff, LysoTracker Red DND-99, findet zur Markierung, sowie zur Untersuchung der Biosynthese und Pathogenese von sauren Organellen, wie den Lysosomen, Anwendung. Chemisch betrachtet, handelt es sich um eine schwache Base, welche mit einem Fluorophor verknüpft ist (Abbildung 7) und bei physiologischem pH-Wert nur teilweise in protonierter Form vorliegt. Dadurch kann der Farbstoff ungehindert die Zellmembran passieren. Bei saurem pH-Wert kommt es jedoch zu einer fast vollständigen Protonierung, wodurch der LysoTracker das saure Kompartiment nicht mehr verlassen kann. Folglich reichert sich der Farbstoff spezifisch in den Lysosomen an. Abbildung 8 zeigt das Fluoreszenzspektrum mit dem Absorptionsmaximum von 577 nm (blau) und dem Emissionsmaximum bei 590 nm (rot). (Molecular Probes by Life Technologies, 2013; Thermo Fischer Scientific, 2018b)

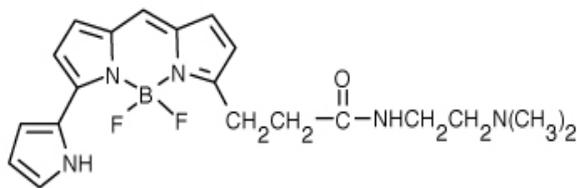


Abbildung 7: Chemische Struktur von LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fischer Scientific, 2018b)

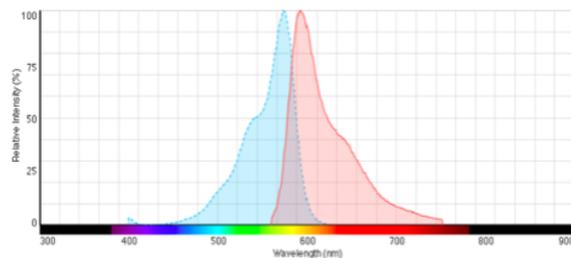


Abbildung 8: Fluoreszenzspektrum von LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fischer Scientific, 2018b)

3.5.2 Prinzip der DAPI-Färbung

4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Abbildung 9) ist eine blaue Fluoreszenz-Gegenfärbung für Chromosomen und Zellkerne, welche bevorzugt an Adenin-/Thyminreiche Regionen bindet. Der Farbstoff, erstmals 1971 von Dann et al. synthetisiert, erlaubt ein einfaches Sichtbarmachen von Chromosomen in mitotischen Zellen und des Zellkerns in Zellen während der Interphase und der Apoptose (Williamson & Fennell, 1975). DAPI interagiert mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) an zwei Bindungsstellen, genauer den DNA-Furchen, wobei es vor allem an der kleinen Furche bindet (Kubista, Aakerman, & Norden, 1987).

Abbildung 10 zeigt das Absorptionsmaximum (blau) von DAPI bei 358 nm, das Emissionsmaximum (rot) bei 461 nm (Thermo Fischer Scientific, 2018a).

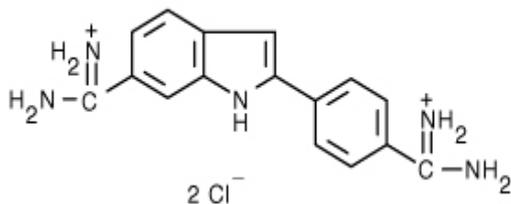


Abbildung 9: Chemische Struktur von DAPI (Thermo Fischer Scientific, 2018a)

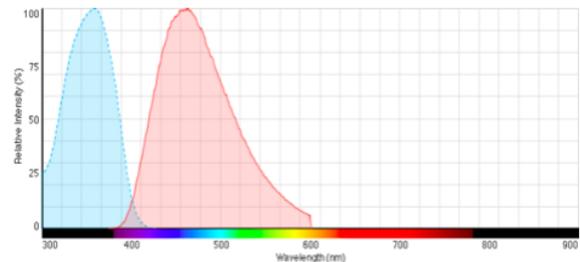


Abbildung 10: Fluoreszenzspektrum von DAPI (Thermo Fischer Scientific, 2018a)

3.5.3 Durchführung

Im folgenden Abschnitt ist die Durchführung der Fluoreszenzfärbung der KB-3-1-Zellen mit LysoTracker Red DND-99 und DAPI erläutert. Das Versuchsprotokoll wurde anhand mehrerer Vorexperimente optimiert, um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

3.5.3.1 Zellen Aussäen

Für diesen Arbeitsschritt sind zunächst sechs Deckgläser (2,2 x 2,2 cm) mit 70%-igem Alkohol zu desinfizieren. Diese werden in je ein Well einer 6-Well-Platte gelegt (Abbildung 11). Darauf wird je 1 ml Zellsuspension mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen pro ml genau auf die Deckgläser pipettiert. Die Inkubationszeit der Platten beträgt 2 Stunden. Danach erfolgt das Auffüllen des restlichen Mediums auf je 2 ml. So wird gewährleistet, dass sich die Zellen nicht außerhalb der Deckgläser anhaften.



Abbildung 11: 6-Well Platte mit Coverslips

3.5.3.2 Behandlung der Zellen

Am darauffolgenden Tag wird das alte Medium durch frisches, welches die Testsubstanzen, Enniatin B bzw. Beauvericin und Ammoniumchlorid enthält, ersetzt. Die exakten Konzentrationsangaben zeigt Tabelle 4 auf. Die Inkubationszeit für alle durchgeführten Experimente beträgt 24 Stunden.

Tabelle 4: Auflistung der jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanzen einer 6-Well-Platte

Well 1	Well 2	Well 3
Kontrolle	EnnB/Bea 0,625 μ M	EnnB/Bea 1,25 μ M
Well 4	Well 5	Well 6
EnnB/Bea 2,5 μ M	EnnB/Bea 5 μ M	NH ₄ Cl 20 mM

3.5.3.3 LysoTracker Red DND-99-Färbung

Nach den vorgegebenen 24 Stunden wird das Medium abgesaugt und durch ein frisches, welches den LysoTracker-Farbstoff in einer Konzentration von 600 nM enthält, ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt ist ein Arbeiten unter Lichtschutz essentiell, da der Farbstoff lichtempfindlich reagiert. Damit die Substanz sich ausreichend in den Lysosomen anreichern kann, erfolgt die Inkubation der Platten für 2,5 Stunden.

3.5.3.4 Fixierung der Zellen auf Deckgläsern

Im folgenden Arbeitsschritt wird das Medium erneut abgesaugt und die Deckgläser werden dreimal mit je 2 ml PBS durch leichtes Schwenken gewaschen. Die Waschflüssigkeit ist zu verwerfen. Die Fixierung der Zellen erfolgt durch Zugabe von jeweils 1 ml einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung für 8 Minuten. Daraufhin ist ein weiterer Waschschrift mit PBS durchzuführen, bevor die Deckgläser der Reihe nach auf Objektträgern platziert werden.

3.5.3.5 DAPI-Färbung und Vorbereitung für das Mikroskopieren

Auf sechs mit 70%-igem Alkohol desinfizierten Objektträgern ist jeweils ein Tropfen der Roti®-Mount FluorCare DAPI-Lösung zu tropfen. Dabei handelt es sich um ein wasserlösliches Einschlußmittel mit bereits gebrauchsfertigen DAPI, welches zudem vor raschem Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe schützt (Roth, 2018). Dem folgend werden die Deckgläser, mit den Zellen nach unten gerichtet, möglichst ohne Luftblasenbildung mit einer Pinzette auf die Objektträger gelegt. Abschließend erfolgt die Fixierung der Ränder mit einem transparenten Nagellack. Auch hierbei ist möglichst auf ein Arbeiten unter Lichtausschluss zu achten.

3.5.3.5 Mikroskopie

Unmittelbar vor dem Mikroskopieren ist ein Tropfen Immersionsöl auf das jeweilige Deckglas zu tropfen. Sowohl unbehandelte Kontrollzellen, als auch die mit den Testsubstanzen behandelten Zellen werden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops, Olympus BX51 (Abbildung 12), bei einer 60x-fachen Vergrößerung betrachtet. Für die computerunterstützten Bildaufnahmen ist die Kamera Prokyon der Progres Gryphax®-Serie von der Firma Jenoptic am Mikroskop montiert. Um eine Vergleichbarkeit der

einzelnen Experimente zu zeigen, sind die Zellen jeder Probe für jeweils 15 Minuten ausgewertet worden.



Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 mit aufgesteckter Progres Gryphax® Kamera

3.5.4 Methodenoptimierung

Erst durch verschiedene Maßnahmen zur Optimierung des Versuchsprotokolls, welche im Folgenden genauer erläutert werden, war es möglich reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

3.5.4.1 Anpassung der LysoTracker Red DND-99 Konzentration und der Inkubationszeit

Die Anwendung des LysoTracker-Farbstoffes beschränkt sich laut der Produktinformation ausschließlich auf die Färbung bzw. Mikroskopie lebender Zellen und sollte in einer Konzentration von 60 nM und einer Inkubationszeit von 30 Minuten durchgeführt werden (Molecular Probes by Life Technologies, 2013). Aufgrund der Mikroskop-Beschaffenheit mussten die Zellen jedoch fixiert werden. Durch die dadurch verlängerte Zeitspanne zwischen Färbung und Betrachtung im Mikroskop, ist es notwendig gewesen die Konzentration und die Inkubationszeit des Fluoreszenzfarbstoffes auf 600 nM und 2,5 Stunden zu erhöhen.

3.5.4.2 Anpassung der verwendeten Zellzahl

Da für die Auswertung der Bilder einzelne Zellen nötig waren, ist die Zellzahl mit 3×10^4 dementsprechend niedrig gewählt worden. Versuche mit einer höheren Zelldichte konnten nicht für die Auswertung herangezogen werden.

3.5.4.3 Auswahl des Fixierungsreagens

Zur Fixierung von Zellen auf Deckgläsern bzw. Objektträgern steht eine Vielzahl verschiedener Substanzen zur Verfügung. Mit Methanol als Fixierungsreagens konnte kein LysoTracker-Farbstoff, weder in unbehandelten, noch in behandelten Zellen, festgestellt werden. Der Grund hierfür sind die durch Methanol verursachten Schäden an den Lysosomen (Skrzydowska & Szynaka, 1997). Folglich konnte keine Anreicherung in den sauren Kompartimenten stattfinden und der Farbstoff ging vermutlich durch die Waschschriffe verloren.

3.6 Auswertung der Ergebnisse

Die lysosomale Fluoreszenz macht nur einen kleinen Teil der gesamten Zell-Fluoreszenz aus. Dies hat zur Folge, dass eine quantitative Auswertung der Anzahl der Lysosomen durch LysoTracker-Färbung mittels Durchflusszytometrie oder mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgeräts nicht möglich ist. (Molecular Probes by life technologies, 2013)

3.6.1 Verwendete Software

Zur Auswertung ist daher die Software Fiji, welche auf der bekannten Bildanalysesoftware ImageJ[®] basiert, verwendet worden (Schindelin et al., 2012). Die Anzahl der Lysosomen ist pro Zelle manuell, in Form der lysosomalen Fläche berechnet worden. Die so erhaltenen Werte sind mittels Microsoft[®] Office Excel 2011 gesammelt und die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet. Mittels GraphPad Prism[®] 7.0 sind nachfolgend alle Grafiken bzw. Layouts, sowie mehrere t-Tests, um die statistische Signifikanz festzustellen, erstellt worden. Bei den durchgeführten, ungepaarten t-Tests, erfolgte der Vergleich der jeweiligen Konzentrationen immer mit der

Kontrollgruppe. Eine genaue Auflistung aller verwendeten Software und deren Verwendungszweck gibt Tabelle 5 wieder.

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Verwendungszweck
Fiji (ImageJ®)	Bildverarbeitungsprogramm für die Auswertung der Bilder
GraphPad Molarity Calculator	Berechnung von Verdünnungen
GraphPad Prism® 7.0	Erstellung von Grafiken und Layouts, Berechnungen
Progres Gryphax®	Bildverarbeitungsprogramm der Mikroskop-Kamera
Microsoft® Office Excel 2011	Auflistung der Daten, Statistik, Berechnungen

4. Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel beinhaltet alle generierten Daten der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3. Material und Methoden). Für eine bessere Übersicht wurde pro Substanz nur eine charakteristische Aufnahme einer einzelnen Zelle für die Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15 sowie Abbildung 16 ausgewählt. Jedes Bild steht repräsentativ für jeweils drei durchgeführte Versuche pro Testsubstanz und Konzentration. Dies war zulässig, da die statistisch berechnete Standardabweichung für jedes Experiment ausreichend klein war.

4.1 Fluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Die 24-stündige Behandlung der KB-3-1 Zellen mit den beiden Mykotoxinen EnnB und Bea erfolgte in verschiedenen Konzentrationen. Die Untersuchung der lysosomalen Membranstabilität bzw. des pH-Wertes kam durch Anwendung der LysoTracker Red DND-99 (LTR) Färbung zustande. Dieser Fluoreszenzfarbstoff akkumuliert bevorzugt in sauren zellulären Kompartimenten mit einem pH-Wert von etwa 5,0 (Thermo Fischer Scientific, 2018b).

4.1.1 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Abbildung 13 und Abbildung 14 stellen Versuche mit EnnB dar, Abbildung 15 und Abbildung 16 Versuche mit Bea. Der Farbstoff LTR wird in Abbildung 13 sowie in Abbildung 15 in roter Farbe dargestellt, in Abbildung 14 und Abbildung 16 aufgrund der gleichzeitigen DAPI-Färbung in grüner Farbe.

Alle Aufnahmen zeigen einen deutlichen Verlust der Fluoreszenzintensität und -fläche nach 24-stündiger Inkubation mit EnnB bzw. Bea. Bereits bei der geringsten Konzentration von 0,625 μM ist dieser Effekt erkennbar. Die Lysosomen erscheinen bei den unbehandelten Kontrollzellen gleichmäßig, als kleine Punkte in der gesamten Zelle verteilt. Nach der Behandlung verringert sich jedoch nicht nur die Anzahl der sichtbaren

Lysosomen, sondern auch deren Verteilung innerhalb der Zelle. Es lässt sich zudem eine Anreicherung der noch vorhandenen Lysosomen um den Zellkern erkennen. Gleichzeitig ist eine eher mehr diffusere Verteilung der Fluoreszenzfarbe nach der Mykotoxin-Behandlung sichtbar. Trotz der schwachen Ausprägung, deutet dies auf eine Ansäuerung des Zytosols im Bereich der Lysosomen hin.

Als Positivkontrolle für eine pH-Wert Erhöhung kam die lysosomotrophe Substanz Ammoniumchlorid zum Einsatz (siehe 1.2.2.1). Diese liefert ähnliche Ergebnisse wie die beiden Cyclohexadepsipide. Auch hier ist ein Rückgang der Anzahl der fluoreszierenden Lysosomen deutlich erkennbar.

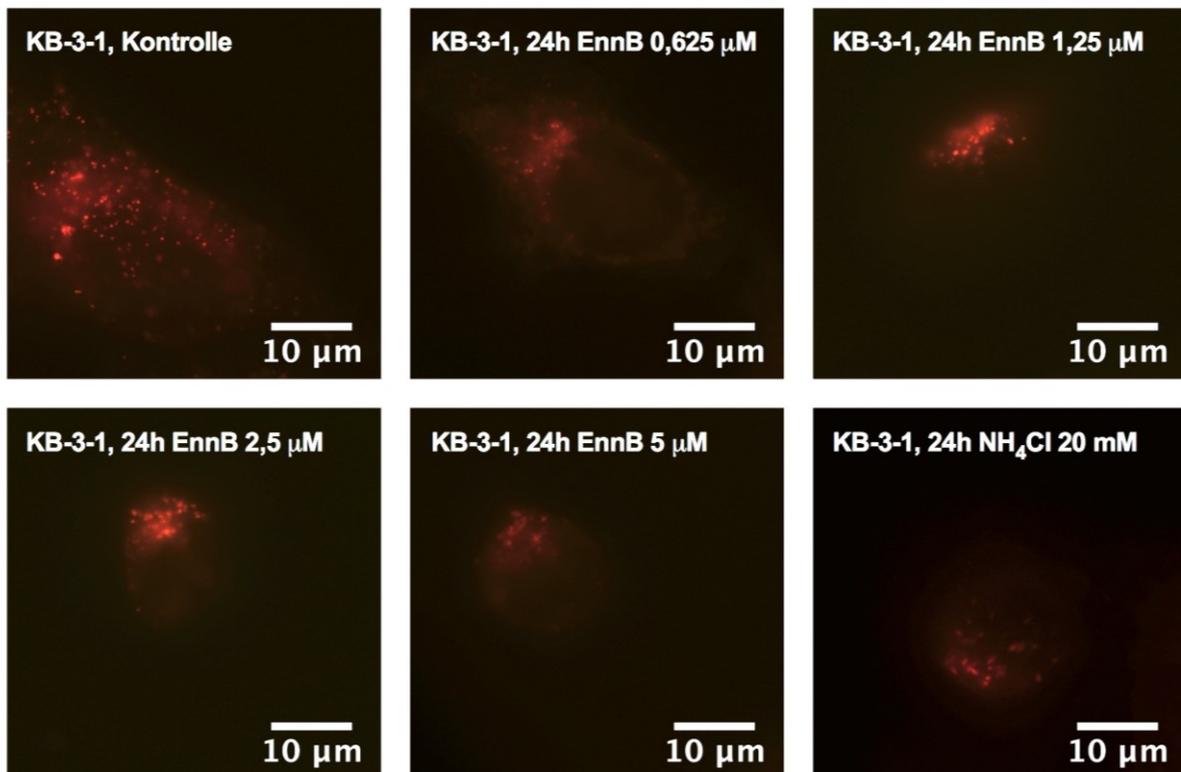


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 Färbung (rot) mit 24 Stunden Enniatin B bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen

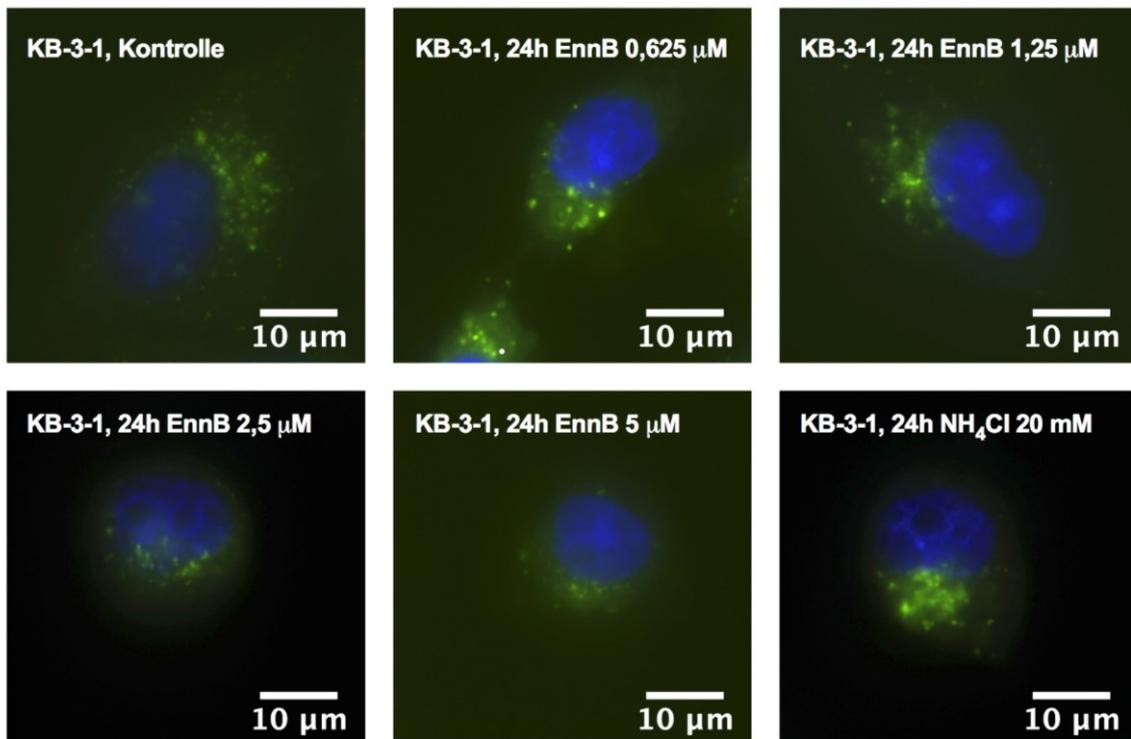


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 (grün) und DAPI (blau) Färbung mit 24 Stunden Enniatin B bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen

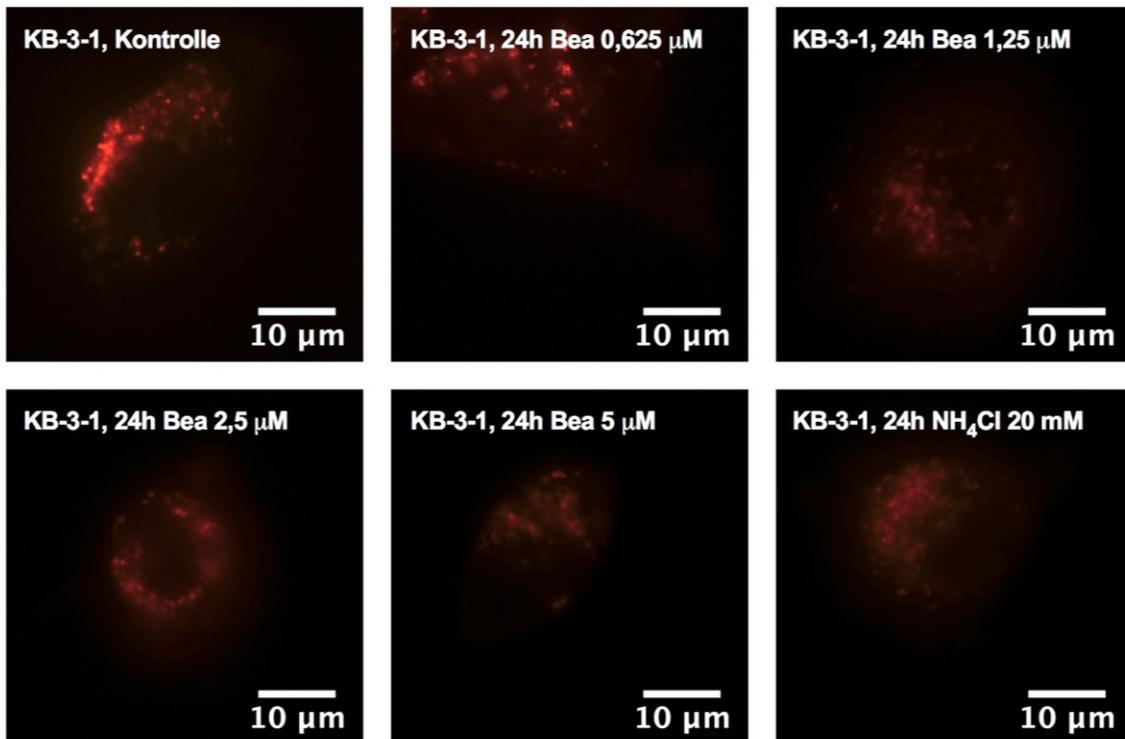


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 Färbung (rot) mit 24 Stunden Beauvericin bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen

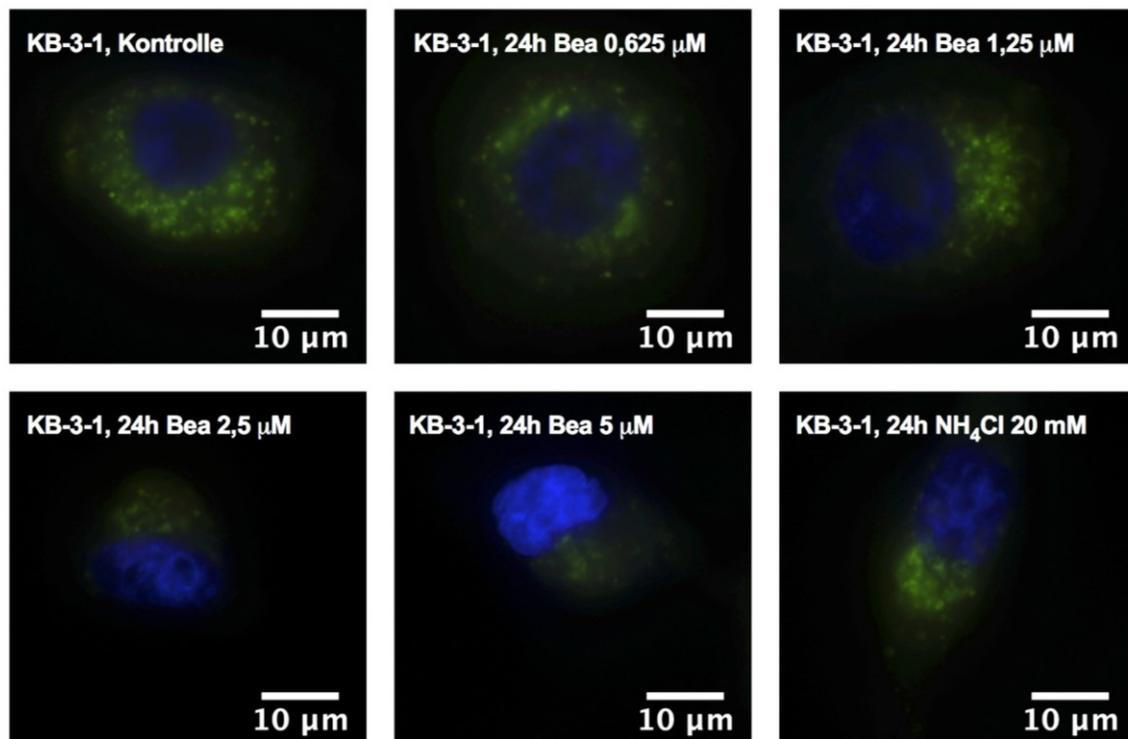


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 (grün) und DAPI (blau) Färbung mit 24 Stunden Beauvericin bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen

4.1.2 Auswertung der Aufnahmen

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden neben einer Überprüfung der Lysosomenverteilung auch hinsichtlich der genauen Flächenanteile überprüft. Diese sind in Abbildung 17 und Abbildung 18 in Form von Balkendiagrammen repräsentiert. Anhand dieser lässt sich ein signifikanter Rückgang der gefärbten, lysosomalen Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen ($p < 0,001$). Hinsichtlich der Konzentrationsabhängigkeit fällt auf, dass die Abnahme der Flächen keinem linearen Zusammenhang folgen. Vielmehr beschreibt eine exponentielle Abnahme den Trend.

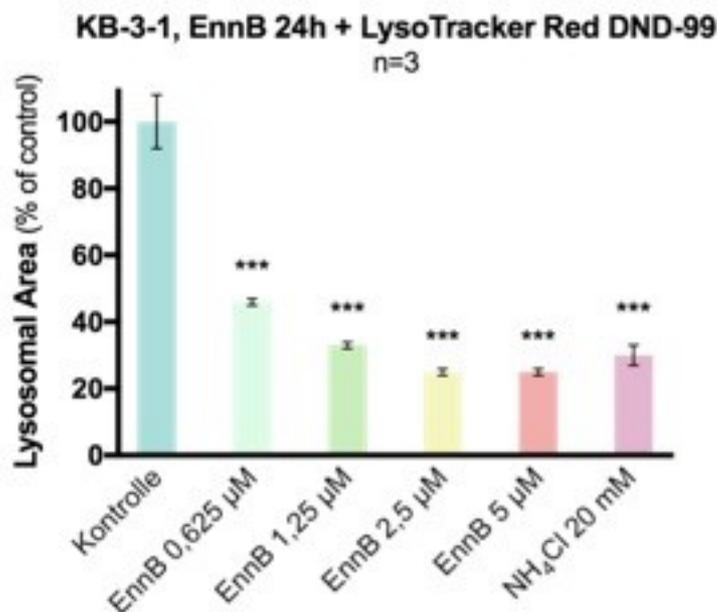


Abbildung 17: Anteil der lysosomalen Fläche pro Zelle nach 24 Stunden Behandlung mit EnnB bzw. NH₄Cl und ohne Behandlung; die Fläche der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt; $p < 0,001$ (***)

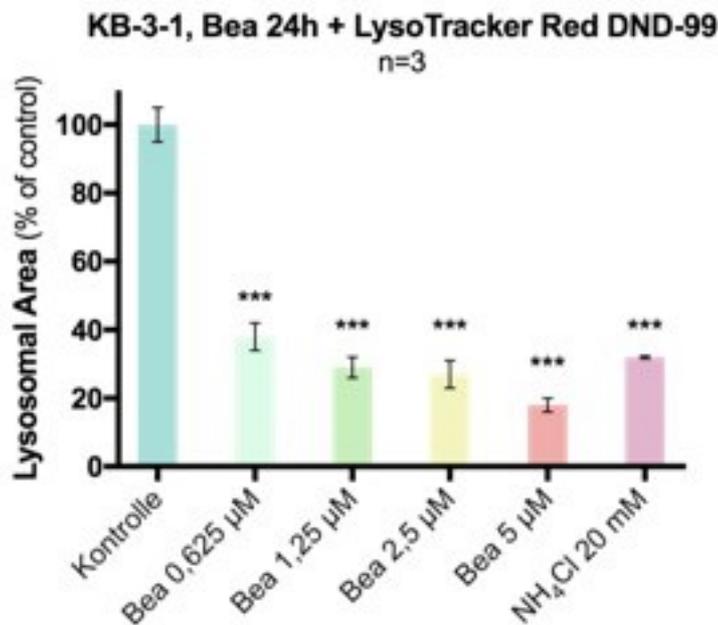


Abbildung 18: Anteil der lysosomalen Fläche pro Zelle nach 24 Stunden Behandlung mit Bea bzw. NH₄Cl und ohne Behandlung; die Fläche der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt; p < 0,001 (***)

Der Abnahme der Fluoreszenz von LTR kann zwei möglichen Mechanismen zu Grunde liegen. Zum einen kann die Fluoreszenz durch eine pH-Erhöhung innerhalb der Lysosomen abnehmen. Zum anderen ist ein Verschwinden des Farbstoffes durch den Untergang der Lysosomen, bedingt durch eine lysosomale Membran-Permeabilisation (LMP) möglich.

Ausgehend von den vorhandenen Daten, auf welche im folgenden Absatz genauer eingegangen wird, ist die als zweites genannte Möglichkeit, eine LMP, naheliegender. Sowohl anhand der Aufnahmen als auch mittels der Diagramme, zeigt sich die Abnahme der lysosomalen Fläche nicht als ein massiver Zerfall der Lysosomen, sondern vielmehr als ein langsam voranschreitendes Ereignis bei Erhöhung der Dosierung. Eine teilweise LMP steht oft am Beginn von Zelltod-Paradigmen und ist in der Lage Apoptose bzw. einen Apoptose-ähnlichen Zelltod auszulösen (Ivanova et al., 2012; Kirkegaard & Jäätelä, 2009).

Der genaue Mechanismus der durch Enniatin B bzw. Beauvericin vermittelten lysosomalen Destabilisierung ist allerdings noch nicht bekannt. Ein Ansatz ist die Anreicherung von Lipiden in der Membran der Lysosomen, wodurch lamelläre Strukturen

bzw. Myelinkörper gebildet werden (Gammelsrud et al., 2012). Eine weitere Studie beschreibt die ionophore Wirkung der beiden Mykotoxine als mögliche Ursache für eine LMP (Ivanova et al., 2012). Dies erklärt jedoch nicht die Freisetzung von Kathepsin B nach der Behandlung, was bereits durch verschiedenen Experimente, durchgeführt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien, herausgefunden wurde (Jungbauer, 2017; Topcagic, 2018). Die durch EnnB/Bea gebildeten Poren sind nur für mono- und divalente Kationen durchlässig (Hinaje et al., 2002; Kouri et al., 2003). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Kathepsine die Poren aufgrund ihres großen Durchmessers nicht passieren können. Ergebnisse die dies bestätigen liegen allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Im Falle einer pH-Erhöhung innerhalb der Lysosomen können sich die Cystein- und Aspartat-Kathepsine nicht mehr von dem Transport-Rezeptor, M6PR, lösen und es kommt zu einer Anreicherung im Zytosol (siehe 1.2.2.1). Da Kathepsine im Falle einer LMP im Zytosol eine Einleitung der Apoptose durch Aktivierung von Caspasen auslösen (Boya & Kroemer, 2008; Repnik & Turk, 2010), könnte dies auch durch eine lysosomale pH-Erhöhung erfolgen. Allerdings liegen diesbezüglich keine Daten vor.

Ein Zusammenhang zwischen einer Verschiebung des Ionengleichgewichtes innerhalb der Lysosomen durch Porenbildung, einer damit verbundenen Veränderung des lysosomalen pH-Wertes und einer LMP ist nicht auszuschließen, sondern vielmehr naheliegend.

Ob die Abnahme der LTR-Fluoreszenz einer pH-Erhöhung innerhalb der Lysosomen zugrunde liegt oder ob eine, zumindest teilweise, lysosomale Membrandestabilisierung stattfindet, konnte mittels dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass durch die Behandlung mit Enniatin B und Beauvericin die Anzahl der sauren Lysosomen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant abnimmt. Um die Funktion der Lysosomen bei der durch EnnB und Bea vermittelten zytotoxischen Wirkung genauer zu untersuchen, bedarf es weiteren Experimente. Diese sollten auch an anderen Zelllinien durchgeführt werden, um die erhaltenen Ergebnisse so zu bekräftigen.

5. Zusammenfassung und abschließende Bemerkungen

Krebserkrankungen reihen sich in Österreich als zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein (Statistik Austria, 2018). Durch die Entstehung von therapieresistenten Tumorarten bzw. durch die oftmals schwerwiegenden Nebenwirkungen, die eine Zytostatikatherapie verursacht, ist man stets auf der Suche nach neuen Wirkstoffen und neuen Behandlungsstrategien (Fojo et al., 2014; Wu et al., 2017). Hierfür haben sich Cyclohexadepsipeptide in den letzten Jahren als eine vielversprechende Substanzklasse herausgestellt (Lemmens-Gruber et al., 2009).

Ihr zytotoxisches Potential auf Tumorzellen konnte mittels *in vitro* und *in vivo* Testungen bestätigt werden (Dornetshuber-Fleiss et al., 2015; Heilos et al., 2017). Jedoch ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus hierfür noch nicht gänzlich untersucht. Der mitochondriale Weg scheint jedoch nicht alleine verantwortlich bzw. nicht der initiale Auslöser für die durch EnnB sowie Bea vermittelte Zytotoxizität zu sein (Dornetshuber et al., 2007; Ivanova et al., 2012; Tonshin et al., 2010). Mittels einer lysosomalen Membranstabilisierung ist ein „cross-talk“, durch Freisetzung von bestimmten Kathepsinen, zwischen den Mitochondrien und den Lysosomen möglich (Repnik & Turk, 2010).

Um den Zusammenhang zwischen den Lysosomen und der EnnB bzw. Bea vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen, kam die Methode der Fluoreszenzmikroskopie zur Anwendung. Das sichtbar machen der sauren Lysosomen erfolgte durch eine Anfärbung dieser mittels dem Farbstoff LysoTracker Red DND-99. So sollte überprüft werden, ob es nach Behandlung mit den beiden Testsubstanzen zu einer lysosomalen Destabilisierung bzw. zu einer pH-Wert Erhöhung kommt. Da beide Mechanismen durch einen Verlust der Fluoreszenzfärbung gekennzeichnet sind, konnte mit dieser Arbeit keine Unterscheidung festgestellt werden. Die Anzahl der sauren Lysosomen innerhalb der Zelle nahm jedoch signifikant ab. Auch eine diffusere Verteilung des Farbstoffes war erkennbar, was auf eine Erniedrigung des zytosolischen pH-Wertes und somit auf eine LMP rückschließen lässt.

Nichtsdestotrotz ist der genaue molekulare Mechanismus der lysosomalen Destabilisierung zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich geklärt. Ein Ansatz

beschreibt die Anreicherung von Lipiden in der Membran der Lysosomen als Ursache, wodurch lamelläre Strukturen bzw. Myelinkörper gebildet werden (Gammelsrud et al., 2012). Eine weitere Studie vermutet, dass die ionophore Wirkung der beiden Mykotoxine eine essentielle Rolle spielt (Ivanova et al., 2012). Allerdings ist bekannt, dass die durch EnnB/Bea gebildeten Poren nur für mono- und divalente Kationen durchlässig sind (Hinaje et al., 2002; Kouri et al., 2003), vermutlich aber nicht für Kathepsine, aufgrund deren größeren Durchmessers. Ergebnisse die diese Annahme für Kathepsine bestätigen liegen allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Ergebnisse für eine Beteiligung der Lysosomen bei der Bauvericin sowie Enniatin B ausgelösten Zytotoxizität sprechen. Allerdings ist die Notwendigkeit von weiteren Versuchen, auch an anderen Zelllinien, zum besseren Verständnis des zugrundeliegenden, molekularen Mechanismus unabdingbar.

6. Kurzfassung

Die Cyclohexadepsipeptide, Beauvericin und Enniatin B, gelten als vielversprechende Substanzen in der Entwicklung neuer Zytostatika. Neben den antibiotischen, insektiziden und ionophoren Eigenschaften zeigen die Mykotoxine eine über den intrinsischen, mitochondrialen Weg initiierte Zytotoxizität auf Krebszellen. Allerdings scheint dieser Mechanismus nicht der alleinige Auslöser für deren Wirkung zu sein.

Einige Studien weisen bereits auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen den Mitochondrien und den Lysosomen, nach einer Destabilisierung der lysosomalen Membran, hin. Jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus der lysosomal vermittelten Apoptose noch nicht vollständig untersucht.

Darauf aufbauend untersucht diese Arbeit, ob eine Verbindung zwischen den Lysosomen und der zytotoxischen Wirkung der Testsubstanzen besteht. Hierfür findet die Methode der Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie Anwendung. Die sauren Lysosomen von KB-3-1 Zellen werden mittels dem Farbstoff LysoTracker Red DND-99 angefärbt und so sichtbar gemacht. Auf diese Weise erfolgt die Überprüfung, ob es nach einer Behandlung mit den beiden Testsubstanzen zu einer lysosomalen Destabilisierung bzw. zu einer pH-Wert Erhöhung kommt. Da beide Mechanismen durch einen Verlust der Fluoreszenzfärbung gekennzeichnet sind, kann keine Unterscheidung diesbezüglich getroffen werden. Allerdings zeigt sich eine signifikante Reduktion der Anzahl der sauren Lysosomen nach der Behandlung. Zudem ist eine diffusere Verteilung des Farbstoffes erkennbar. Dies deutet auf eine Erniedrigung des zytosolischen pH-Wertes und somit auf eine lysosomale Membran-Permeabilisation (LMP) hin. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse auf eine Beteiligung der Lysosomen an der durch Beauvericin bzw. Enniatin B vermittelten Zytotoxizität rückschließen.

7. Abstract

The cyclohexadepsipeptides, Beauvericin and Enniatine B, are considered to be promising substances in the development of new cytotoxic drugs. In addition to the antibiotic, insecticidal and ionophoric properties, the mycotoxins show a cytotoxicity on cancer cells initiated via the intrinsic, mitochondrial pathway. However, this mechanism does not seem to be the sole trigger for their effect.

Some studies already indicate a possible interaction between the mitochondria and the lysosomes, after a destabilization of the lysosomal membrane. However, the underlying mechanism of lysosomal-mediated apoptosis has not been fully investigated.

Based on that previous work, this thesis investigates whether there is a connection between lysosomes and the cytotoxic effect of the test substances. The method of fluorescence staining and microscopy is used for this purpose. The acid lysosomes of KB-3-1 cells are stained using the dye LysoTracker Red DND-99 and made visible. Both substances can either cause a lysosomal destabilization or a pH increase. Since both mechanisms are characterized by a loss of fluorescence staining, no distinction can be made in this respect. However, there is a significant reduction in the number of acid lysosomes after treatment. In addition, a more diffuse distribution of the dye can be seen. This indicates a decrease of the cytosolic pH-value and, thus, a lysosomal membrane permeabilization (LMP). Taken together, the results suggest that lysosomes are involved in the lysosomal induced cytotoxicity of Beauvericin and Enniatin B, respectively.

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP-binding-casette-Transporter
ACAT	Acyl-CoA-Acetyl-Transferase
Bea	Beauvericin
Bzw.	beziehungsweise
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFSA	European Food Safety Authority
Enn B	Enniatin B
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FBS	Fetales Kälberserum
LMP	Lysosomale Membran Permeabilisation
LTR	LysoTracker Red DND-99
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
z.B.	Zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Chemische Struktur von Enniatin B (Ivanova et al., 2012)	3
Abbildung 2:	Chemische Struktur von Beauvericin (Mallebrera u. a., 2018)	3
Abbildung 3:	Übersicht über den Aufbau eines Lysosoms (Alberts et al., 2015)	6
Abbildung 4:	Verschiedene Wege des Transportes von abzubauenem Material zu den Lysosomen (Mitskevich et al., 2017)	7
Abbildung 5:	Mechanismen des Zelltodes durch freigesetzte, cytosolische Kathepsine (Boya & Kroemer, 2008).....	9
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer (Schmitz, 2011)	17
Abbildung 7:	Chemische Struktur von LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fischer Scientific, 2018b).....	18
Abbildung 8:	Fluoreszenzspektrum von LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fischer Scientific, 2018b).....	18
Abbildung 9:	Chemische Struktur von DAPI (Thermo Fischer Scientific, 2018a)	19
Abbildung 10:	Fluoreszenzspektrum von DAPI (Thermo Fischer Scientific, 2018a)...	19
Abbildung 11:	6-Well Platte mit Coverslips.....	20
Abbildung 12:	Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 mit aufgesteckter Progres Gryphax® Kamera.....	22
Abbildung 13:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 Färbung (rot) mit 24 Stunden Enniatin B bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen	26

- Abbildung 14:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 (grün) und DAPI (blau) Färbung mit 24 Stunden Enniatin B bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen ..27
- Abbildung 15:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 Färbung (rot) mit 24 Stunden Beauvericin bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen.....28
- Abbildung 16:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von KB-3-1 Zellen mit LysoTracker Red DND-99 (grün) und DAPI (blau) Färbung mit 24 Stunden Beauvericin bzw. Ammoniumchlorid; jedes Bild repräsentiert eine einzelne charakteristische Zelle aus drei durchgeführten Versuchen29
- Abbildung 17:** Anteil der lysosomalen Fläche pro Zelle nach 24 Stunden Behandlung mit EnnB bzw. NH_4Cl und ohne Behandlung; die Fläche der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt; $p < 0,001$ (***).....30
- Abbildung 18:** Anteil der lysosomalen Fläche pro Zelle nach 24 Stunden Behandlung mit Bea bzw. NH_4Cl und ohne Behandlung; die Fläche der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt; $p < 0,001$ (***)31

„Ich habe mich bemüht, alle Inhaber der verwendeten Bilder ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung dieser in meiner Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um umgehende Meldung bei mir.“

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die unterschiedlichen Seitenketten ausgewählter Enniatine und Beauvericin (Mallebrera et al., 2018; Sy-Cordero et al., 2012)	3
Tabelle 2:	Testsubstanzen	12
Tabelle 3:	Reagenzien und Chemikalien.....	13
Tabelle 4:	Auflistung der jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanzen einer 6-Well-Platte	20
Tabelle 5:	Verwendete Software	24

Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular biology of the cell. In *Molecular biology of the cell* (6. Auflage, S. 722–730). New York: Garland Science.

Boya, P., & Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*, 27(50), 6434–6451. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>

de Nijs, M., van den Top, H., de Stoppelaar, J., Lopez, P., & Mol, H. (2016). Fate of enniatins and deoxynivalenol during pasta cooking. *Food Chemistry*, 213, 763–767. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.024>

Dornetshuber, R., Heffeter, P., Kamyar, M.-R., Peterbauer, T., Berger, W., & Lemmens-Gruber, R. (2007). Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. *Chemical Research in Toxicology*, 20(3), 465–473. <https://doi.org/10.1021/tx600259t>

Dornetshuber, R., Heffeter, P., Lemmens-Gruber, R., Elbling, L., Marko, D., Micksche, M., & Berger, W. (2009a). Oxidative stress and DNA interactions are not involved in Enniatin- and Beauvericin-mediated apoptosis induction. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(9), 1112–1122. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800571>

Dornetshuber, R., Heffeter, P., Sulyok, M., Schumacher, R., Chiba, P., Kopp, S., Koellensperger, G., Micksche, M., Lemmens-Gruber, R., Berger, W. (2009b). Interactions between ABC-transport proteins and the secondary Fusarium metabolites enniatin and beauvericin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(7), 904–920. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800384>

Dornetshuber-Fleiss, R., Heilos, D., Mohr, T., Richter, L., Süssmuth, R. D., Zlesak, M., Novicky, A., Heffeter, P., Lemmens-Gruber, R., Berger, W. (2015). The naturally born fusariotoxin enniatin B and sorafenib exert synergistic activity against cervical cancer in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 93(3), 318–331. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.013>

Eagle, H. (1955a). Propagation in a Fluid Medium of a Human Epidermoid Carcinoma, Strain KB. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 89(3), 362–364. <https://doi.org/10.3181/00379727-89-21811>

Eagle, H. (1955b). The Specific Amino Acid Requirements of a Human Carcinoma Cell (strain Hela) in Tissue Culture. *Journal of Experimental Medicine*, 102(1), 37–48. <https://doi.org/10.1084/jem.102.1.37>

EFSA. (2014). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*, 12(8), 3802. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3802>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fojo, T., Mailankody, S., & Lo, A. (2014). Unintended consequences of expensive cancer therapeutics—the pursuit of marginal indications and a me-too mentality that stifles innovation and creativity: the John Conley Lecture. *JAMA Otolaryngology-- Head & Neck Surgery*, 140(12), 1225–1236. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.1570>

Gammelsrud, A., Solhaug, A., Dendelé, B., Sandberg, W. J., Ivanova, L., Kocbach Bølling, A., ... Holme, J. A. (2012). Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(1), 74–87. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.03.014>

Gaumann, E., & Roth, S. (1947). Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. *Experientia*, 3(5), 202.

Hamill, R. L., Higgins, C. E., Boaz, H. E., & Gorman, M. (1969). The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *artemia salina*. *Tetrahedron Letters*, 10(49), 4255–4258. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)88668-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)88668-8)

Heilos, D., Rodríguez-Carrasco, Y., Englinger, B., Timelthaler, G., van Schoonhoven, S., Sulyok, M., ... Berger, W. (2017). The Natural Fungal Metabolite Beauvericin Exerts Anticancer Activity In Vivo: A Pre-Clinical Pilot Study. *Toxins*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/toxins9090258>

- Hinaje, M., Ford, M., Banting, L., Arkle, S., & Khambay, B. (2002). An investigation of the ionophoric characteristics of destruxin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *405*(1), 73–77.
- Ivanova, L., Egge-Jacobsen, W. M., Solhaug, A., Thoen, E., & Fæste, C. K. (2012). Lysosomes as a possible target of enniatin B-induced toxicity in Caco-2 cells. *Chemical Research in Toxicology*, *25*(8), 1662–1674. <https://doi.org/10.1021/tx300114x>
- Jestoi, M. (2008). Emerging Fusarium -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(1), 21–49. <https://doi.org/10.1080/10408390601062021>
- Jow, G.-M., Chou, C.-J., Chen, B.-F., & Tsai, J.-H. (2004). Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. *Cancer Letters*, *216*(2), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.06.005>
- Jungbauer, S. (2017). Die Rolle der lysosomalen Peptidasen auf die Zytotoxizität von Enniatin B. Masterarbeit, Austrian Biotech University of applied sciences.
- Kamyar, M., Rawnduzi, P., Studenik, C. R., Kouri, K., & Lemmens-Gruber, R. (2004). Investigation of the electrophysiological properties of enniatins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *429*(2), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.06.013>
- Kirkegaard, T., & Jäätelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1793*(4), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.008>
- Kouri, K., Kamyar, M. R., & Lemmens-Gruber, R. (2003). Actions of the antibiotic mycotoxins beauvericin and enniatin on mammalian tissue. *Forum of Nutrition*, *56*, 413–414.
- Kouri, K., Lemmens, M., & Lemmens-Gruber, R. (2003). Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1609*(2), 203–210.
- Kubista, M., Aakerman, B., & Norden, B. (1987). Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry*, *26*(14), 4545–4553. <https://doi.org/10.1021/bi00388a057>

Lavappa et al. (1978). Survey of ATCC stocks of human cell lines for hela contamination. *In Vitro*, 14(5), 469–475. <https://doi.org/10.1007/BF02616110>

Lemmens-Gruber, R., Kamyar, M. R., & Dornetshuber, R. (2009). Cyclodepsipeptides - potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Current Medicinal Chemistry*, 16(9), 1122–1137.

Löffler. (2008). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie* (7. Auflage). Heidelberg: Springer Medizin.

Logrieco, A., Rizzo, A., Ferracane, R., & Ritieni, A. (2002). Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 82–85.

Lorenzo, K., Ton, P., Clark, J. L., Coulibaly, S., & Mach, L. (2000). Invasive Properties of Murine Squamous Carcinoma Cells: Secretion of Matrix-degrading Cathepsins Is Attributable to a Deficiency in the Mannose 6-Phosphate/Insulin-like Growth Factor II Receptor. *Cancer Research*, 60(15), 4070–4076.

Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., & Meca, G. (2017). Occurrence, toxicity, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.032>

Mallebrera, B., Prosperini, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2018). In vitro mechanisms of Beauvericin toxicity: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.019>

Mitskevich, N., Tsertsvadze, T., Mchedlishvili, K., & Guruli, G. (2017). Epigenetic induction of adaptive immune response and immunomodulation in mouse prostate cancer model. *Int Journal of on Immunorehabilitation*, Vol. 19, 39–42.

Molecular Probes by Life Technologies. (2013, Januar 11). LysoTracker® and LysoSensor™ Probes. Abgerufen von <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07525.pdf>

Moriyama, Y., Maeda, M., & Futai, M. (1992). Involvement of a non-proton pump factor (possibly Donnan-type equilibrium) in maintenance of an acidic pH in lysosomes. *FEBS Letters*, 302(1), 18–20.

Müller-Esterl, W. (2011). Biochemie - Eine Einführung für MEDiziner und Naturwissenschaftler (2. Auflage, S. 44–45). Spektrum Akademischer Verlag.

Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M. J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L. J., ... Lafranconi, A. (2017). A Review of the Mycotoxin Enniatin B. *Frontiers in Public Health*, 5, 304. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00304>

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011). Asparagine Peptide Lyases. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38321–38328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260026>

Repnik, U., Hafner Česen, M., & Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. *Mitochondrion*, 19 Pt A, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.06.006>

Repnik, U., Stoka, V., Turk, V., & Turk, B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1824(1), 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.016>

Repnik, U., & Turk, B. (2010). Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion*, 10(6), 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.07.008>

Roth, C. (2018). Roti®-Mount FluorCare DAPI | Einschlussmittel - wasserlöslich. Abgerufen 18. Juli 2018, von https://www.carlroth.com/de/de/Life-Science/Histologie-Mikroskopie/Einschlussmittel/Einschlussmittel---wasserl%C3%B6slich/Roti%3Csup%3E%C2%AE%3C-sup%3E-Mount-FluorCare-DAPI/p/000000080002a20100050023_de

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur* (3. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>

Sivanathan, S., & Scherkenbeck, J. (2014). Cyclodepsipeptides: a rich source of biologically active compounds for drug research. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(8), 12368–12420. <https://doi.org/10.3390/molecules190812368>

Skrzydłewska, E., & Szyńska, B. (1997). Ultrastructural evaluation of lysosomes and biochemical changes in cathepsin D distribution in hepatocytes in methanol intoxication. *Roczniki Akademii Medycznej W Białymstoku (1995)*, *42 Suppl 2*, 47–55.

Statistik Austria. (2018). Krebserkrankungen. Abgerufen 26. Juli 2018, von http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebs_erkrankungen/index.html

Sy-Cordero, A. A., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2012). Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination, and biological activities. *The Journal of antibiotics*, *65*(11), 541–549. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.71>

Taevernier, L., Detroyer, S., Veryser, L., & De, B. S. (2015). Enniatin-containing solutions for oromucosal use: Quality-by-design ex-vivo transmucosal risk assessment of composition variability. *International Journal of Pharmaceutics*, *491*(1–2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.029>

Tardy, C., Codogno, P., Autefage, H., Levade, T., & Andrieu-Abadie, N. (2006). Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1765*(2), 101–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.11.003>

Thermo Fisher Scientific. (2018a). DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) - Thermo Fisher Scientific. Abgerufen 14. Juli 2018, von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1306>

Thermo Fisher Scientific. (2018b). LysoTracker Red DND-99 - Special Packaging - Thermo Fisher Scientific. Abgerufen 14. Juli 2018, von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7528>

Tomoda, H., Huang, X. H., Cao, J., Nishida, H., Nagao, R., Okuda, S., ... Inoue, K. (1992). Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, *45*(10), 1626–1632.

Tonshin, A. A., Teplova, V. V., Andersson, M. A., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2010). The Fusarium mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. *Toxicology*, *276*, 49–57.

Topcagic, N. (2018). The role of lysosomalen cathepsines on the zytotoxicity of Beauvericin. Diplomarbeit, Universität Wien.

Vaughan, L., Glänzel, W., Korch, C., & Capes-Davis, A. (2017). Widespread Use of Misidentified Cell Line KB (HeLa): Incorrect Attribution and Its Impact Revealed through Mining the Scientific Literature. *Cancer Research*, *77*(11), 2784–2788. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2258>

Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. *Molecules*, *17*(3), 2367–2377. <https://doi.org/10.3390/molecules17032367>

Williamson, D. H., & Fennell, D. J. (1975). The Use of Fluorescent DNA-Binding Agent for Detecting and Separating Yeast Mitochondrial DNA. In D. M. Prescott (Hrsg.), *Methods in Cell Biology* (Bd. 12, S. 335–351). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60963-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60963-2)

Wu, D., Wang, D. C., Cheng, Y., Qian, M., Zhang, M., Shen, Q., & Wang, X. (2017). Roles of tumor heterogeneity in the development of drug resistance: A call for precision therapy. *Seminars in Cancer Biology*, *42*, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.11.006>