

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie  
des Universitätsklinikums Benjamin Franklin  
der Freien Universität von Berlin  
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen)

**Charakterisierung von Ceramidase-Inhibitoren  
an der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Humanmedizin  
an der  
Freien Universität von Berlin

vorgelegt von  
Gerit Goltz  
aus Potsdam

Berlin, 2002

**Referent:** Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen

**Korreferent:** Prof. Dr. W. Reutter

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin.

Tag der Disputation: 09. 07. 2002

Promotionsdatum: 13. 09. 2002

*Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet*

## Abkürzungen

AK	Antikörper
Apaf-1	apoptotic protease activating factor-1
AP-1	Aktivatorprotein-1
aSMase	saure Sphingomyelinase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
B13	D-NMAPPD [D- <i>threo</i> -2-( <i>N</i> -Myristoylamino)-1-(4-nitrophenyl)- 1,3-propandiol]
CAPP	Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase
CAPK	Ceramid-aktivierte Proteinkinase
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
ced	cell death gene
CHES	2-[ <i>N</i> -Cyclohexylamino]-ethansulfonsäure
Ci	Curie
C <sub>2</sub> -Ceramid	<i>N</i> -Acetylsphingosin
D- <i>e</i> -MAPP	D- <i>erythro</i> -2-( <i>N</i> -Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol
DD	death domain
DMEM	Dulbeco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , gramnegatives Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FADD	Fas-associated protein with death domain
FAN	factor associated with neutral sphingomyelinase
f. c.	final concentration

FCS	fetal calf serum
x g	(mal) Erdbeschleunigung
HaCaT	immortalisierte Keratinozytenzelllinie
HEPES	<i>N</i> -[2-Hydroxyethyl]piperazin- <i>N'</i> -[2-ethansulfonsäure]
HPTLC	high performance thin layer chromatography
KBM	keratinocyte basal medium
KGM	keratinocyte growth medium
LDH	Lactatdehydrogenase
<i>L-e</i> -MAPP	<i>L-erythro</i> -2-( <i>N</i> -Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol
M	mol/l
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
PARP	Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PDMP	(+/-)-threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
PKC	Proteinkinase C
RAIDD	Rip-associated ICH-1/ <i>ced</i> -3 homologous protein with death domain
Rb	Retinoblastom-Genprodukt
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
S.D.	standard deviation (Standardabweichung)
SM	Sphingomyelin
TAE	Trisacetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-abhängige Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	TNF receptor-associated protein with death domain

---

Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume per volume</i> (Prozentangabe)
w/v	<i>weight per volume</i> (Prozentangabe)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Struktur und Biosynthese von Ceramid.....	1
1.2. Der Sphingomyelinzyklus.....	2
1.3. Biologische Rolle von Ceramid.....	4
1.3.1. Ceramid und Apoptose.....	4
1.3.2. Haut und Apoptose.....	9
1.3.3. Rolle von Ceramid in der Haut.....	10
1.4. Ceramid-vermittelte Signalwege.....	11
1.5. Modulation intrazellulärer Ceramid-Spiegel.....	14
1.5.1. Erhöhung des Ceramid-Spiegels.....	14
1.5.2. Verminderung des Ceramid-Spiegels.....	16
1.6. Ceramidasen.....	18
1.6.1. Vorkommen und Isoformen der Ceramidase.....	18
1.6.2. Ceramidase-Inhibitoren.....	21q
1.7. Fragestellung der Arbeit.....	22
<b>2. Material.....</b>	<b>24</b>
2.1. Geräte.....	24
2.2. Zelllinien.....	25
2.3. Phenylaminoalkohol-Derivate.....	25
2.4. Radioaktivität.....	26
2.5. PCR-Reagenzien.....	26
2.6. Chemikalien.....	27
2.7. Zellkulturmaterialien.....	27

### **3. Methoden.....29**

3.1.	Zellkultur.....	29
3.1.1.	Zellkulturmedien.....	29
3.1.2.	Kultivierung der Zellen.....	30
3.1.3.	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	30
3.2.	Behandlung der Zellen mit den Phenylaminoalkohol-Derivaten.....	31
3.3.	Messung der Zytotoxizität.....	31
3.4.	Messung der Apoptose.....	33
3.5.	Messung der Proliferation.....	35
3.6.	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure.....	37
3.7.	Lipidchemische Methoden.....	39
3.7.1.	Lipid-Extraktion.....	39
3.7.2.	Dünnschichtchromatographische Trennung von Lipiden.....	40
3.7.3.	Nachweis radioaktiv-markierter Lipide.....	40
3.7.4.	Nachweis nichtradioaktiver Lipide.....	41
3.8.	Bestimmung der Ceramidase-Enzymaktivität.....	41
3.9.	Messung des Ceramid-Gehaltes.....	44
3.10.	Polymerase-Kettenreaktion.....	45
3.11.	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	48

### **4. Ergebnisse.....49**

4.1.	Bestimmung der Zytotoxizität der Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf HaCaT-Keratinocyten.....	49
4.2.	Apoptotischer Effekt der Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13 auf HaCaT-Keratinocyten.....	52
4.3.	Einfluß von bcl-2 auf die Phenylaminoalkohol-induzierte Apoptose.....	55



---

4.4.	Beeinflussung des Wachstumsverhaltens von HaCaT-Keratinocyten durch die Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13.....	56
4.5.	Darstellung der sauren Ceramidase-Isoform in HaCaT-Keratinocyten mittels RT-PCR.....	59
4.6.	Effekte der Phenylaminoalkohol-Derivate auf die Ceramidase-Isoformen in HaCaT-Keratinocyten.....	60
4.7.	Beeinflussung des intrazellulären Ceramid-Spiegels durch die Phenylaminoalkohol-Derivate L-e-MAPP, D-e-MAPP und B13.....	63
<b>5. Diskussion.....</b>		<b>65</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>		<b>76</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>		<b>78</b>
<b>8. Veröffentlichungen.....</b>		<b>91</b>
Danksagung.....		I
Lebenslauf .....		II