

5. Diskussion

Der Sphingolipidstoffwechsel spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Zelluntergang aller Zellen. Mit der Entdeckung des Sphingomyelinzyklus in der hämatopoetischen Zelllinie HL-60 (Okazaki *et al.*, 1989) wurde erstmals die Agonistenvermittelte Sphingomyelin-Hydrolyse beschrieben, die zu einem intrazellulären Ceramid-Anstieg führt. Später konnte dieser Signaltransduktionsweg auch für menschliche Keratinozyten bestätigt werden (Geilen *et al.*, 1996). Das so generierte Sphingolipid Ceramid stellt einen wichtigen „Second messenger“ dar, welcher Zellantworten wie Apoptose, Proliferationshemmung und Differenzierung vermittelt (Hannun, 1996; Venable *et al.*, 1995). Da sich viele benigne als auch maligne Erkrankungen dadurch kennzeichnen, daß ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Zellneubildung einerseits und Zelluntergang andererseits vorliegt, rücken solche intrazellulären Botenstoffe bzw. der am Metabolismus beteiligten Enzymsysteme in den Vordergrund vieler Betrachtungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Phenylaminoalkohol-Derivate D-e-MAPP, L-e-MAPP und das neu synthetisierte Analogon B13 (D-NMAPPD), in bezug auf ihre biochemisch-biologische Wirkung in HaCaT-Keratinozyten zu untersuchen (S. Abb. 6). Die beiden erstgenannten Substanzen waren kürzlich als neue Ceramid-Analoga synthetisiert und in der hämatopoetischen Zelllinie HL-60 getestet worden (Bielawska *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, daß D-e-MAPP die alkalische Ceramidase, nicht aber die saure Isoform hemmte, was zu einem erhöhten Ceramid-Spiegel intrazellulär führte und seine biologische Konsequenz in Proliferationshemmung und Zellzyklusstop hatte. Das Enantiomer L-e-MAPP blieb ohne jegliche biologische Wirkung und fungierte als Substrat für die alkalische Ceramidase.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die 3 Phenylaminoalkoholderivate zunächst im Hinblick auf die Beeinflussbarkeit der verschiedenen Ceramidase-Isoformen in HaCaT-Keratinozyten untersucht. Es konnte erstmalig das Vorhandensein der sauren Ceramidase in HaCaT-Keratinozyten auf Gen-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Zum Versuchszeitpunkt war noch keine menschliche alkalische bzw. neutrale Isoform näher charakterisiert und kloniert worden. Anschließend wurde in Vorversuchen das Vorhandensein

bzw. die Messbarkeit von Aktivität der einzelnen Ceramidase-Isoformen überprüft. Nachdem zytosolische und Membran-Fractionen der Zellen gewonnen wurden, konnte die Enzymaktivität mittels eines radioaktiven Enzymassays wie in Kap. 3.8. beschrieben unter Beachtung der verschiedenen pH-Optima der Isoformen bestimmt werden. Wie auch schon für HL-60-Zellen gezeigt, konnte in HaCaT-Keratinocyten eine Enzymaktivität sowohl im sauren (pH=4,5) als auch im alkalischen pH-Bereich (pH= 9,0) detektiert werden, eine rein im neutralen Bereich (pH=7,0) aktive Ceramidase war nicht nachweisbar. Dabei wurde nicht die absolute Enzymaktivität bestimmt, sondern relative Werte der einzelnen Isoformen untereinander (in cpm) ermittelt. Bei Einsatz gleicher Menge radioaktiven Substrates konnte in einer Probe bei saurem pH-Optimum eine 3-4fache Enzymaktivität gegenüber dem alkalischen Milieu gemessen werden. Entweder handelt es sich bei der sauren Isoform um die in höherem Maße aktive oder im Vordergrund in diesem Zelltyp stehende Form, oder möglicherweise sind beim Gewinnen der Zellsolubilisate noch zelluläre Organellen mit alkalischem pH-Milieu unerschlossen.

D-e-MAPP zeigt bis zu einer Konzentration von 500 μM im Gegensatz zu den Untersuchungen an HL-60 Zellen (halbinhibitorische Konzentration $\text{IC}_{50}=1-5 \mu\text{M}$) keine Hemmung der alkalischen Isoform. Dagegen scheint es in HaCaT-Zellen ein effizienterer Inhibitor der sauren Ceramidase-Aktivität als in HL-60 Zellen zu sein: 10 μM D-e-MAPP bewirkte eine Hemmung auf 90 %, 50 μM auf 80 %, 500 μM auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle ($\text{IC}_{50}=500 \mu\text{M}$). Auch B13 bewirkte keine signifikante Hemmung der Ceramidase im alkalischen pH-Bereich, war jedoch der effektivste Hemmstoff der sauren Ceramidase. Schon bei Konzentrationen von $< 10 \mu\text{M}$ war eine Inhibition von $> 50 \%$ zu verzeichnen und Konzentrationen von $> 50 \mu\text{M}$ B13 führten zu nahezu vollständiger Enzyminhibition. Die Beeinflussbarkeit der Ceramidase-Isoenzyme durch L-e-MAPP war nicht signifikant. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß HaCaT-Keratinocyten sowohl saure als auch basische Ceramidasen, jedoch keine neutrale Form besitzen. D-e-MAPP und B13 hemmen im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit HL-60 Zellen nicht die alkalische Isoform, sondern wirken bezüglich der sauren Ceramidase aktivitätsmindernd, wobei B13 eine viel stärkere Wirkung aufweist als D-e-MAPP. L-e-MAPP zeigte nahezu keine Wirkung.

Ceramid kann über die *de novo*-Synthese oder via Sphingomyelin-Hydrolyse entstehen. Die hauptsächlichsten intrazellulären Abbauwege von Ceramid bestehen in der weiteren Verstoffwechslung zu Sphingomyelin, der Biosynthese von Glucosyl- und Galactosylceramid, Bildung von Ceramid-1-Phosphat und der Abbau durch Ceramidasen. Ist es möglich, Einfluß auf diese Enzymsysteme zu nehmen, so läßt sich der intrazelluläre Ceramid-Gehalt modulieren. Somit könnten außer Kontrolle geratene Gleichgewichte zwischen Ceramid und seinen Gegenspielern geordnet werden. Bei sogenannten *Multidrug-resistant* (MDR)-Tumoren konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sich Tumorzellen der Chemotherapie entziehen, indem sie anfallende und Apoptose-auslösende Ceramidmengen mittels vermehrter Glucosylceramid-Synthase-Aktivität in Glucosylceramid umwandeln (Lavie *et al.*, 1996). Nach Hemmung dieses Enzyms nach Zugabe von Inhibitoren konnte eine Chemosensitivität des Tumors wieder hergestellt werden (Lucci *et al.*, 1999). Die ebenfalls hauptsächlich am Ceramid-Metabolismus beteiligten Ceramidasen stellen wichtige Enzyme dar, indem sie Ceramid zu Sphingosin und freier Fettsäure abbauen. Sphingosin kann durch die Sphingosin-1-Kinase weiter zu Sphingosin-1-Phosphat verstoffwechselt werden (Abb. 16).

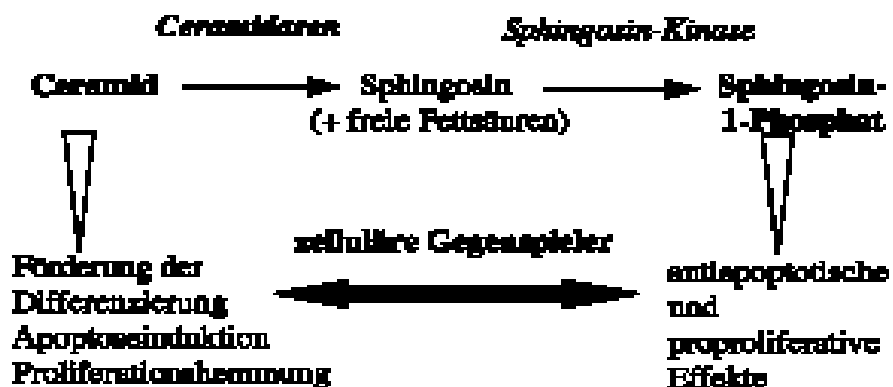


Abb. 16. Das Ceramid-Sphingosin-SPP-Gleichgewicht.

Die *second messengers* Sphingosin (SPH) und dessen phosphoryliertes Produkt Sphingosin-1-Phosphat (SPP) werden immer aus Ceramid generiert und vertreten häufig gegensätzliche intrazelluläre Funktionen.

SPP ist ein potentes proliferationsförderndes und antiapoptotisches Molekül (Spiegel *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*, 1996). In 3T3 Fibroblasten konnte die Stimulation der DNA-Synthese und mitogene Wirkung mittels SPP gezeigt werden (Zhang *et al.*, 1991). Sphingosin als das Intermediär-Produkt der Biodegradation von Ceramid zu SPP, kann in Abhängigkeit vom Zelltyp proliferationsfördernd oder -hemmend sein (Pyne *et al.*, 1997). So wirkt Sphingosin in einigen Zelllinien, wie humanen Keratinozyten (Wakita *et al.*, 1994) proliferationsfördernd, während es in anderen Zelllinien antiproliferative oder sogar proapoptotische Effekte erzielt (Sakakura *et al.*, 1996). Die proliferationsfördernden Effekte des Sphingosins werden größtenteils im Zusammenhang mit der weiteren Verstoffwechslung zu SPP mittels der Sphingosin-Kinase gesehen (Zhang *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, daß Hochregulierung des Ceramid-Levels im Verhältnis zu Sphingosin-1-Phosphat in einer vermehrten Apoptose-Rate und Proliferationshemmung resultierte (Cuvillier *et al.*, 1996). Somit spielt das Enzym Ceramidase eine große Rolle in der Modulation des Ceramid -und SPH/SPP-Gleichgewichts.

Nachdem sich eine Ceramidase-Inhibition durch D-e-MAPP und B13 nachweisen ließ, stellte sich die Frage nach der Konsequenz einer Ceramid-Erhöhung und deren Quantifizierung. Die HaCaT-Keratinozyten wurden metabolisch markiert und anschließend mit den gewünschten Inhibitoren über verschiedene Zeiträume behandelt. Es wurde eine Lipidextraktion, HPTLC-Separation und anschließende radioaktive Quantifizierung der entsprechenden Banden durchgeführt. Wie in Abb. 16 gezeigt, führten sowohl 25 µM D-e-MAPP als auch 25 µM B13 zu einem zeitabhängigen Ceramid-Anstieg, wobei der Ceramid-Anstieg nach D-e-MAPP-Behandlung Maximalwerte von ca. 600 % und nach B13-Behandlung von sogar 1160 % nach 24 h erreichte. Der Ceramid-Anstieg bei B13 schien schon nach den kurzen Behandlungsintervallen einer Sättigungskinetik zu unterliegen, da sich die stärkste Veränderung innerhalb der ersten 6 h vollzog und auch nach längeren Inkubationszeiten keine drastischen Änderungen des Ceramid-Gehaltes zu messen waren. Bei D-e-MAPP war eher ein kontinuierlicher Ceramid-Anstieg mit noch deutlichem Anstieg in den späteren Zeiträumen zu beobachten. Es sei dahingestellt, ob längere Zeitpunkte der Behandlung weitere Konzentrationszunahmen von Ceramid bewirken, da nach 24 h noch ein Ceramid-Anstieg von ca. 30 % im Vergleich zum 12-stündigen Wert erreicht wurde. Stimulation mit L-e-MAPP zeigte keine Beeinflussung des Ceramid-Spiegels. Ähnlich

und somit passend zu den Daten der Ceramidase-Aktivitätsbestimmung fungierte B13 als der potenteste Wirkstoff zur Induktion eines erhöhten Ceramid-Levels.

Somit scheint mittels dieser neuartigen Substanzgruppe eine Möglichkeit gefunden, den internen Ceramid-Gehalt durch Eingriff der im Gleichgewicht stehenden Enzymsysteme zu verändern. Um die vielfältigen Funktionen von Ceramid in der Signaltransduktion näher zu charakterisieren und neue therapeutische Optionen zu eröffnen, standen bisher eher Veränderungen des Ceramid-Levels durch externe, zusätzliche Ceramid-Gabe im Vordergrund des Interesses: Es wurden kurzkettige synthetische Ceramide (C₂-, C₆-, C₈-Ceramide) eingesetzt, die aufgrund ihrer kurzen Fettsäure-Ketten zellpermeabel sind, anschließend ins Zytosol gelangen und schließlich durch den intrazellulären Ceramid-Anstieg zu Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion führen (Obeid *et al.*, 1993). Ähnliche Wirkungen konnten auch nach dem Einsatz von längerkettigen C₁₈-Ceramiden in U937-Zellen (Ji *et al.*, 1995) beobachtet werden. Daß Ceramid in menschlichen Hautzellen neben seinen strukturgebenden Eigenschaften als eines die Hautbarriere bildenden Lipides eine Signal-vermittelnde Funktion spielt, ist seit längerem bekannt: So gehen die meisten epidermalen Erkrankungen, wie z.B. atopische Dermatitis, Ichthyosen und Psoriasis mit einem signifikant erniedrigten Ceramid-Gehalt einher, wobei der genaue Defekt zumeist unbekannt ist (Geilen *et al.*, 1997). Aus diesem Wissen ergeben sich therapeutische Überlegungen. So konnte bereits gezeigt werden, daß sowohl kurzkettige als auch langkettige exogen zugegebene Ceramide in humanen Keratinozyten das Zellwachstum hemmen und Apoptose auslösen. Dieser Effekt kann auch über die Modulation des endogenen Ceramidspiegels via Calcitriol-Gabe mit anschließender Sphingomyelin-Hydrolyse erreicht werden (Geilen *et al.*, 1996, 1997, Bektas *et al.*, 1998). Die Wirkung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) bzw. seiner Analoga (z.B. Tacalcitol, Calcipotriol) konnte in der Therapie der Psoriasis und Ichthyosis (Kragballe *et al.*, 1988, 1995) schon erprobt werden. Ferner kann Ceramid die Differenzierung der Keratinozyten fördern (Wakita *et al.*, 1994).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun geklärt werden, inwieweit nachgewiesene Ceramidase-Inhibition und konsekutiver intrazellulärer Ceramid-Anstieg biologische Konsequenzen wie die bezüglich Ceramid beschriebene antiproliferative und proapoptotische Wirkung hat. Zunächst wurde die Zytotoxizität der 3 Substanzen auf HaCaT-Keratinozyten zeit- und

konzentrationsabhängig bestimmt, um den Konzentrationsbereich herauszufinden, in welchem spezifisch Apoptose oder Proliferationshemmung ausgelöst wird, ohne unspezifische Effekte wie Nekrose von Zellen zu verursachen. Der Zytotoxizitätsbestimmung diene die Aktivitätsmessung der Laktathydrogenase, eines zytoplasmatisch lokalisierten Enzyms, das nur bei Zerstörung der Zellmembran freigesetzt wird. Weder D-e-MAPP noch L-e-MAPP weisen bis zur untersuchten Konzentration von 50 μM und bis zu einer max. Behandlungsdauer von 48 h zytotoxische Effekte auf. B13 hat bis zu einer Konzentration von 25 μM in den Zeiträumen bis 12 h keinen signifikanten zytotoxischen Effekt, erst höhere Konzentrationen und längere Inkubationszeitpunkte zeigen zytotoxische Wirkung an.

Diese LDH-Freisetzung zu den späteren Zeitpunkten ist jedoch nicht auf primäre Toxizität der Behandlungssubstanz zurückzuführen, sondern unter Zuhilfenahme der Experimente zur Messung der Apoptose als Folge der „sekundären Nekrose“ zu sehen. Letzere beschreibt den späteren Anstieg der zytoplasmatischen Enzyme nach Entleeren der membranumhüllten apoptotischen Vesikel, der sog. „apoptotic bodies“ *in vitro*, da die *in vivo* aktiven, Apoptose-Vesikeln- phagozytierenden Makrophagen fehlen.

Nachfolgend wurden Untersuchungen zur Proliferations- und Apoptosebeeinflussung der Ceramidase-Inhibitoren in einer einheitlichen, nicht-zytotoxischen Maximalkonzentration von 25 μM durchgeführt. Da es wichtig ist, bei welchen Zelldichten die Proliferations- und nachfolgende Apoptosemessungen durchgeführt werden, wurden wegen besserer Vergleichbarkeit gleiche Zelldichten eingesetzt. Dünnere HaCaT-Zellkulturen sind empfindlicher gegenüber eingesetzten Substanzen als dichtere und die gemessenen Effekte größer, möglicherweise deshalb, weil pro Zelle mehr Agens im Verhältnis einwirken kann. Daß die gemessene Apoptoserate in HaCaT-Zellen abhängig von der Zelldichte ist, wurde bereits beschrieben (Iwasaki-Bessho *et al.*, 1998). Präkonfluente oder konfluente Zellen zeigen ein eingeschränktes Proliferationsverhalten und beginnen nach Kontaktinhibition zu differenzieren. Proliferationsmessungen wurden einheitlich bei ca. 30-40 % und Apoptose-Testungen bei 80-90 % Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Wie bereits erwähnt konnte auch für andere, in den Ceramid-Haushalt eingreifende Substanzen wie Vitamin D-Abkömmlinge und synthetische kurzkettige Ceramide eine Wachstumshemmung von Keratinozyten nachgewiesen werden. Andererseits wurde die Wirkung von L-e-MAPP und

D-e-MAPP auf HL-60-Zellen untersucht, wobei zwar durch das *D*-Derivat ein Proliferationshemmung mit einem Verbleiben der Zellen in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus resultierte, jedoch das *L*-Derivat ohne Effekt blieb (Bielawska *et al.*, 1996).

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde indirekt über eine Zellzahlbestimmung nach Anfärbung der vitalen Zellen mittels der Kristallviolett-Methode bestimmt. Somit könnte eine scheinbare Proliferationshemmung auf unspezifischen, die Zellyse hervorrufenden primär toxischen Eigenschaften der verwendeten Substanzen beruhen. Dies konnte jedoch durch die vorherige LDH-Bestimmung von spezifischen, das Zellwachstum hemmenden Wirkungen abgegrenzt werden. D-e-MAPP, jedoch in noch stärkerem Maße B13, zeigten eine dosis- und zeitabhängige antiproliferative Wirkung. Diese entfaltet sich beginnend nach 24 h Inkubationszeit und verstärkt sich hin zu der längeren Behandlungszeit von 48 h, wobei weitere Behandlung keine signifikante Änderung mit sich bringt. Während 25 μM D-e-MAPP nach 48 h Inkubation eine maximale Wachstumsinhibition von 40 % initiiert, hemmt B13 die Zellen nahezu vollständig ($>10 \mu\text{M}$; 48 h Inkubation). Dabei liegt die entscheidende wachstumshemmende halbinhibitorische Konzentration von B13 bei 7,5 μM . Eine Stärke gegenüber B13 besitzt D-e-MAPP sicherlich in der antiproliferativen Potenz gerade der niedrigen Konzentrationen (1 μM , 5 μM), in denen B13 noch ohne Effekt ist. L-e-MAPP ließ keinen Einfluß auf das Zellwachstum erkennen. Inbezug auf die an HL-60 Zellen durchgeführten Versuche mit L- und D-e-MAPP läßt sich eine Vergleichbarkeit mit den in HaCaT-Keratinocyten beobachteten Effekten feststellen. Somit läßt sich zusammenfassen, daß B13 der Ceramidase-Inhibitor mit der stärksten antiproliferativen Wirkung ist, D-e-MAPP einen schwächeren antiproliferativen Effekt in HaCaT-Keratinocyten hat und L-e-MAPP ohne wachstumshemmenden Einfluß ist.

Bei Nachweis einer Proliferationshemmung durch die Phenylaminoalkohol-Derivate wurden zusätzlich Versuche zur Messung einer möglichen Apoptose-Induktion durchgeführt. Die Apoptose wurde mittels eines „Cell Death Detection ELISA^{PLUS}“ zur Messung von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten bestimmt. Die internukleosomale, ca. 200 Basenpaare umfassende DNA-Fragmentierung als wichtigstes biochemisches Kennzeichen der Apoptose wird somit spezifisch erfaßt. Nekrose führt zwar auch zur DNA-Fragmentierung, hat jedoch in ihrer Größe variierende Bruchstücke zur Folge, die mit dieser Methode nicht erfaßt werden. L-e-MAPP löste keine apoptotische Antwort in HaCaT-Keratinocyten aus. D-e-MAPP als auch

B13 führten innerhalb des nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereiches bis 25 μM zur Apoptose-Induktion, wobei die Apoptoserate eine direkte Konzentrationsabhängigkeit erkennen ließ. So führten 25 μM D-e-MAPP nach 24 h zu ca. 230 % Apoptose-Induktion und B13 zu ca. 760 % Apoptose-Induktion im Vergleich zur Kontrolle, wonach B13 die weitaus größere apoptotische Potenz besitzt. Ebenfalls ist eine Zeitabhängigkeit des programmierten Zelltodes nach D-e-MAPP -und B13-Behandlung zu beobachten, wobei der beste Zeitpunkt der Apoptose-Detektion nach 24 h gegeben ist. Kürzere Zeiträume zeigten nur unwesentliche Apoptose-Raten, längere Inkubationszeiten führten zur Abnahme der Apoptose, was im wesentlichen dadurch zu begründen ist, daß in Zusammenschau mit der Zytotoxizitätsmessung die in Apoptose gegangenen Vesikeln, wie bereits erwähnt, durch spätere Lyse nicht mehr detektierbar sind. Die in vorherigen Versuchen gesehene antiproliferative Wirkung der Substanzen ist somit zumindest zu einem Teil durch Apoptose-Induktion bedingt, wobei ein zusätzlicher direkt antimitogener Effekt zwar möglich wäre, jedoch nicht spezifisch getestet wurde. Zur korrekten Interpretation der Ergebnisse ist immer ein Vergleich der parallel zur Anwendung kommenden Viabilitätsmessungen mittels Apoptose-, Zytotoxizitäts- und Proliferationsbestimmung wichtig.

Ceramid vermittelt seine intrazellulären Wirkungen einerseits über die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen und -phosphatasen, wie in Kap. 1.4. näher beschrieben, andererseits ist es direkt in der Effektorphase der Apoptose aktiv. Innerhalb der Signaltransduktionskaskade steht Ceramid unterhalb von nach exogenen Signalen Apoptose-vermittelndem Fas- und TNF-Rezeptor und oberhalb vom Mitochondrium und den Mitgliedern der mitochondrial aktiven Bcl-2-Gruppe. Es ist eines der Moleküle, welches die mitochondriale Cytochrom *c*-Freisetzung induziert (Ghafourifar *et al.*, 1999), wonach es zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade mit anschließender Apoptose kommt. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß eine Überexpression des Onkogens Bcl-2 die durch Ceramid induzierte Apoptose verhindert (Wieder *et al.*, 1997, Müller-Wieprecht *et al.*, 2000) und eine verminderte Cytochrom *c*-Freisetzung aus dem Mitochondrium resultiert (Yang *et al.*, 1997), wobei die Ceramid-Bildung via Sphingomyelin-Zyklus selbst nicht tangiert wird (Zhang *et al.*, 1996). Es konnte für Melanom-Zelllinien gezeigt werden, daß es ein zellspezifisches Muster an pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Gruppe gibt, welches für die jeweilige Sensitivität der einzelnen Zelllinie

gegenüber exogenen Apoptose-induzierenden Stimuli, wie Fas-Ligand und Ceramid verantwortlich zu sein scheint (Raisova *et al.*, 2000, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion der Ceramidase-Inhibitoren im Hinblick auf das Signaltransduktionsmolekül Ceramid und seine Rolle in der mitochondrial vermittelten Apoptose näher bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß die vormals durch B13 induzierte Apoptose in HaCaT-Keratinocyten vollständig durch Bcl-2 Überexpression inhibiert wurde. Schlußfolgernd ergibt sich, daß die neu synthetisierte Substanzklasse die saure Ceramidase hemmt und das so generierte Ceramid seine apoptotische Wirkung via mitochondriale Cytochrom *c*-Freisetzung entfaltet, welche durch Bcl-2-Überexpression antagonisiert werden kann.

Innerhalb der letzten Jahre ranken sich viele Fragestellungen um das Phänomen Apoptose, deren Bedeutung klarer wurde, als man sie mit dem Auftreten verschiedener Krankheiten in Verbindung bringen konnte, bei denen ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation pathogenetisch zu sein scheint (Carson und Ribeiro, 1993). Erhöhte Apoptose-Raten werden in neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. M. Parkinson), Infektionen mit dem HI-Virus und Hepatitis beobachtet, während erniedrigte Apoptose-Raten in Verbindung mit verschiedenen Tumoren (z.B. Lymphomen, Ovarialkarzinomen) und Autoimmunkrankheiten (z.B. Systemischer Lupus erythematodes, Immunkomplex-Glomerulonephritis) gesehen werden (Sandhoff *et al.*, 1998; Sharma und Shi, 1999). Diese Erkenntnisse macht man sich heute bei der Entwicklung von neuen Therapiestrategien zunutze, um in die außer Kontrolle geratene Apoptose-Regulation einzugreifen. Auch für viele Hautkrankheiten, wie *Psoriasis vulgaris*, *Alopecia areata* und *Lichen ruber planus* ist die Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose ursächlich. Die *Psoriasis vulgaris* ist eine multifaktoriell bedingte chronisch-rezidivierende Hautkrankheit, die sich durch entzündlich gerötete und verdickte, schuppige Hautareale kennzeichnet. Pathogenetisch spielen eine Hyperproliferation/Hyperkeratose der Keratinocyten in der Epidermis und eine begleitende Entzündungsreaktion der Dermis eine Rolle. Die normale Wachstumsdauer eines basalen kernhaltigen Keratinocyten bis hin zum kernlosen Korneozyten beträgt ca. 28 Tage. Diese Entwicklungsdauer ist beim psoriatischen Keratinocyten auf ca. 3-4 Tage verkürzt, was zu einer Unreife des apikalen Korneozyten mit noch vorhandenen Kernanteilen führt. Dieses Phänomen wird auch Parakeratose genannt. Nicht nur überschießende Proliferation, auch Fehlsteuerung der

Apoptose scheint einen Mechanismus zur Entstehung der Erkrankung darzustellen: Keratinozyten psoriatischer Patienten sind gegenüber Apoptose-Signalen resistenter als Hautzellen gesunder Vergleichspersonen, wofür eine Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-x_L verantwortlich gemacht wurde (Wrone-Smith *et al.*, 1997).

Es sind verschiedene Therapieformen bei der Therapie der Psoriasis erprobt, die jedoch in der Langzeitanwendung häufig von Nebenwirkungen begleitet werden. So kommen UV-Therapie, Salzbadanwendung, Kortikosteroide, Retinoide (Vitamin A-Derivate), Dithranol und Vitamin-D-Analoga, wie Tacalcitol und Calcipotriol zum Einsatz. Letztere haben im Vergleich zu Calcitriol einen geringeren Effekt auf die Kalzium-Homöostase, jedoch lassen Hyperkalzämie und Hyperkalzurie nur einen begrenzten Einsatz zu. Somit wäre es bezüglich der Behandlung von hyperproliferativen Erkrankungen, wie der Psoriasis, von ganz besonderem Interesse, neben diesen Vitamin-D-Analoga neue Substanzgruppen mit antiproliferativer, proapoptotischer Wirkung zu entwickeln. Möglicherweise könnten die exogen verabreichten Ceramidase-Inhibitoren eine nebenwirkungsarme Alternative darstellen, was in präklinischen Versuchen noch getestet werden müßte. Auch für maligne Hauterkrankungen, wie das Plattenepithelkarzinom, das Basalzellkarzinom und andere Tumoren wäre ein Einsatz dieser Substanzgruppe als alternative Therapiemethode denkbar.

In den durchgeführten Versuchen konnten biochemische Effekte wie Ceramidase-Inhibition und nachfolgender Ceramid-Anstieg sowie die wesentlichen biologischen Effekte Apoptose-Induktion und Proliferationshemmung nur bei den D-Stereoisomeren, nicht aber bei dem L-Stereoisomer, beobachtet werden. Daß auch bei den eigentlichen Ceramidanaloga eine gewisse Stereospezifität bzw. -selektivität wichtig für die biologische Funktionalität ist, konnte bei Versuchen mit exogen gegebenen kurzkettigen Ceramiden gezeigt werden: Strukturell verwandte Moleküle, wie das C₂-Dihydroceramid, welches sich vom C₂-Ceramid nur durch das Fehlen der trans-Doppelbindung zwischen den C-Atomen 4 und 5 unterscheidet, führten nicht zu diesen Effekten, was auf die vorhandene Stereospezifität der Moleküle in bezug auf ihre Effektoren hinweist (Bielawska *et al.*, 1993). D-NMAPPD könnte möglicherweise aufgrund verschiedener struktureller Unterschiede der wirksamste Ceramidase-Inhibitor sein (s. Abb. 6): Der Hauptunterschied zu D-e-MAPP ist die Hydroxyl-Gruppe an einer der Hydroxyl-Gruppe des Ceramids gleichen Position. Diese Gruppe könnte für bessere Substraterkennung-und/oder

bindung seitens des Enzyms zuständig sein. An gleicher Stelle steht beim D-e-MAPP und L-e-MAPP nur eine Methylgruppe. Andererseits könnte die *threo*-Form im Gegensatz zur *erythro*-Form der anderen beiden Substanzen für die bessere Substraterkennung verantwortlich sein. Auch die am Phenylring substituierte NO₂-Gruppe könnte eine Wirkungsverstärkung, z.B. durch verbesserte Membrangängigkeit bedingen.

Mit der Beeinflussung der alkalischen Ceramidase durch D-e-MAPP wurde in vorherigen Versuchen mit HL-60-Zellen eine andere Ceramidase-Isoform angesprochen als in HaCaT-Keratinocyten. Ähnlich den HaCaT-Keratinocyten wurde in Melanom-Zelllinien ebenfalls die saure Ceramidase inhibiert, resultierend in zellulärem Ceramid-Anstieg und Apoptose-Induktion (Raisova *et al.*, Manuskript eingereicht). Somit wirken diese Substanzen nicht nur stereoselektiv bzw. in Abhängigkeit ihrer Struktur sondern auch enzym- bzw. zellselektiv, d.h. in verschiedenen Zelltypen werden verschiedene Enzyme bzw. Isoenzyme angesprochen. Es scheinen jedoch verschiedene Isoformen wichtig bei der Vermittlung von Signaltransduktionsprozessen zu sein, da bei Inhibition derselben das so vermehrt anfallende Ceramid gleiche Zellantworten, wie Apoptose und Wachstumshemmung vermittelte. Bisher wurde nur in Zusammenhang mit der mikrosomal und Plasmamembran-gebundenen alkalischen sowie auch der neutralen Ceramidase eine signalvermittelnde Rolle gesehen (Coroneus *et al.*, 1995; Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997). Die hauptsächlich in den Lysosomen lokalisierte saure Ceramidase wurde zumeist in Verbindung mit der Biodegradation von Sphingolipiden, z.B. des ebenfalls dort durch die saure Sphingomyelinase anfallenden Ceramids diskutiert. Es wurde postuliert, daß das durch lysosomalen Abbau bzw. das Recycling von Membranlipiden generierte Ceramid keine Rolle bei der Vermittlung von Zellantworten auf exogene Reize spielt (Hassler und Bell, 1993; Bielawska *et al.*, 1996). Einzelne, neuere Studien jedoch beleuchten die saure Ceramidase von einer anderen Seite: Eine Überexpression der sauren Isoform in der Fibrosarkom-Zelllinie L929 verhinderte die durch TNF-induzierte Apoptose (Strelow *et al.*, 2000), implizierend, daß die saure Isoform doch eine signalvermittelnde Rolle spielt. Auch in unserem System konnte gezeigt werden, daß der sauren Ceramidase, zumindest in Hautzellen, eine bedeutende Funktion in der Signaltransduktionskaskade zukommt.