

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des
Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Prof. h.c. C.E. Orfanos)

**Mechanismus der $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ induzierten Apoptose
in humanen Keratinozyten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Meryem Bektas
aus
Bafra/Türkei

Berlin 1999

Für Zonya und Fazi
-Es lebe die Freundschaft-

4.1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 induzierten Apoptose in humanen Keratinozyten untersucht. Dies erfolgte anhand von verschiedenen Methoden auf unterschiedlichen zellulären Ebenen. Es konnte gezeigt werden, daß $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ seine Wirkung in humanen Keratinozyten wie Zellwachstumshemmung und Auslösen der Apoptose über die Steigerung der TNF α -Genexpression entfaltet. Nach Behandlung der Zellen mit $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ ist eine erhöhte TNF α -mRNA zu detektieren, die in Protein translatiert wird. Das entstandene TNF α -Protein wird sezerniert und wirkt autokrin über seinen 55 kDa-Rezeptor auf die Zelle. In Abb. 26 ist der Ablauf schematisch dargestellt. Werden die Zellen mit einem neutralisierenden Antikörper gegen den 55 kDa-TNF α -Rezeptor vorbehandelt, so wird die von $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ bewirkte Zellproliferationshemmung und Apoptose teilweise blockiert. TNF α löst in HaCaT-Zellen die Sphingomyelin-Hydrolyse aus, wobei Ceramid entsteht, das als *Second Messenger* das Signal in das Zellinnere weiterleitet. Die Herabsetzung der basalen Ceramidkonzentration über Fumonisin B1, einem spezifischen Inhibitor eines Enzyms der Ceramid-Biosynthese, der Sphingosin-*N*-Acyltransferase, wirkt der $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ -verursachten Apoptose entgegen. Exogen zugegebene zellpermeable Ceramidanaloga wie C $_2$ -Cer=O (*N*-Acetylsphingosin), C $_2$ -Cer=S (*N*-Thioacetylsphingosin) und FS-5 (4-Dodecanoylamino-decan-5-ol) führen ebenfalls zur Proliferationshemmung und Apoptose in HaCaT-Zellen, wobei die Analoga C $_2$ -Cer=O und C $_2$ -Cer=S starke Agonisten und FS-5 ein schwacher Agonist der Proliferationshemmung und Apoptose ist. Die schwache Wirkung von FS-5 ist höchstwahrscheinlich auf die fehlende Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 des Sphingosinrückgrates zurückzuführen.

Neben $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ wurden auch seine Analoga EB 1213, GS 1500, Tacalcitol und Calcipotriol in HaCaT-Zellen untersucht. Alle vier Analoga bewirkten ebenfalls die Sphingomyelin-Hydrolyse, wobei bei EB 1213 die Hydrolyse auch noch nach 6 h Behandlung zu messen war. Weiterhin wirkten die Analoga antiproliferativ und Apoptose-induzierend. Jedoch war nur EB 1213 in der Lage die mRNA für TNF α zu steigern, was dadurch zu erklären wäre, daß die Analoga unterschiedliche Promotorselektivität besitzen.

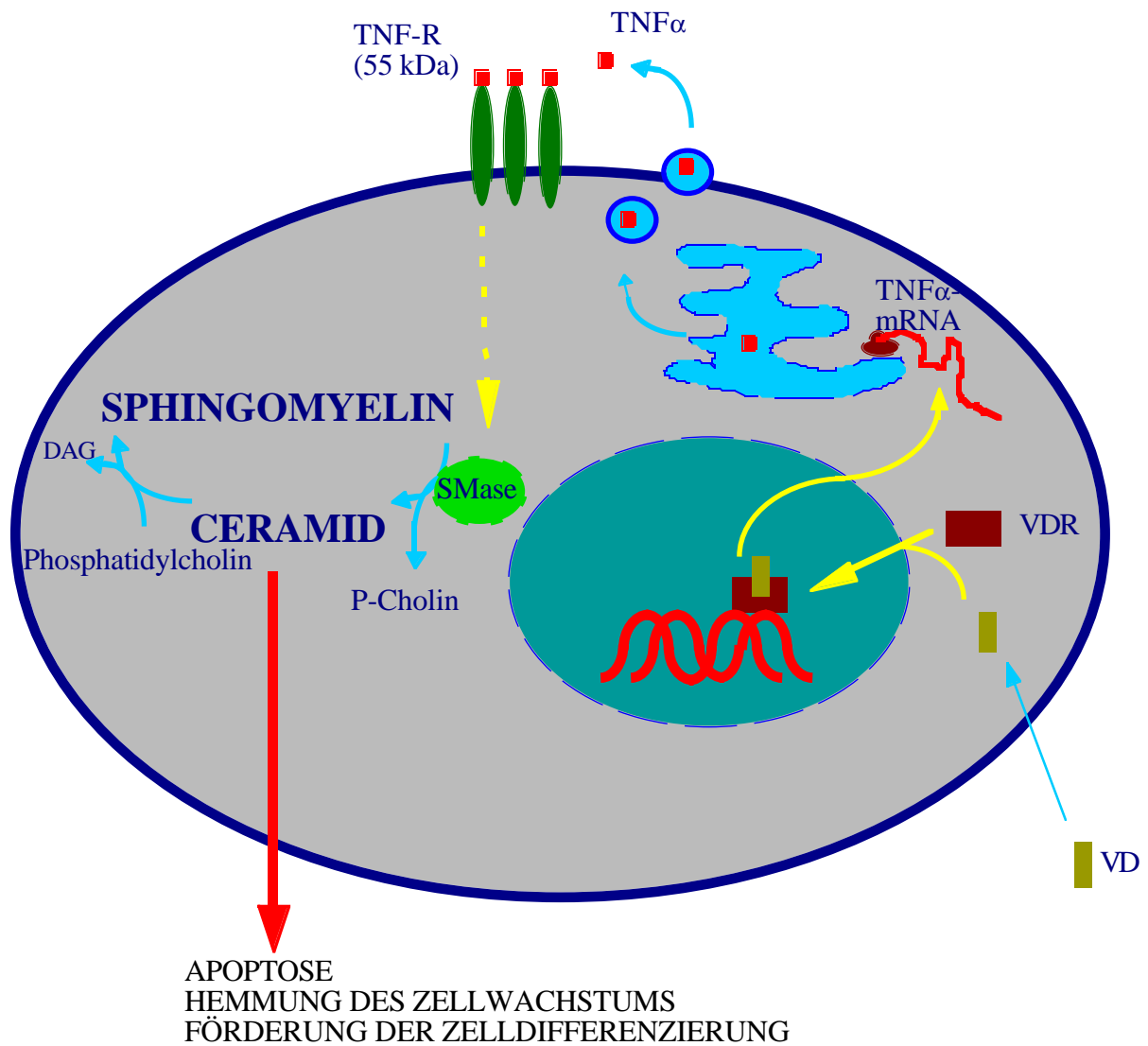


Abb.26. Schematische Darstellung des Mechanismus der Wirkung von $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ in HaCaT-Zellen.

VD: Vitamin D_3 , VDR: Vitamin D_3 -Rezeptor, P-Cholin: Phosphocholin, DAG: Diacylglycerin, SMase: Sphingomyelinase.

4.2. SUMMARY

Mechanism of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 induced apoptosis in human keratinocytes

In the present study the mechanism of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 induced apoptosis was investigated in human keratinocytes. This was done with different methods at distinct cellular levels. It could be demonstrated that $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ mediated its effect on cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes via upregulation of TNF α gene expression. After treatment of cells with $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ an increased TNF α -mRNA is detected, which is then translated into protein. The TNF α -protein is secreted and it affects the cell through an autocrin mechanism via the 55 kDa-receptor. When the cells are preincubated with neutralizing antibodies against the 55 kDa-TNF α -receptor, the $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ induced inhibition of cell proliferation and apoptosis are partially blocked. TNF α leads to sphingomyelin-hydrolysis in HaCaT-cells, whereby ceramide is generated, which as a second messenger transduces the signal into the cell. The reduction of the basal ceramide concentration with fumonisins B1, a specific inhibitor of an enzyme in the ceramide-biosynthesis, the sphinganine-*N*-acyltransferase, antagonizes $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ -induced apoptosis. Exogenously applied cellpermeable ceramide analogues such as C $_2$ -Cer=O (*N*-acetylsphingosine), C $_2$ -Cer=S (*N*-thioacetylsphingosine) and FS-5 (4-dodecanoylamino-decan-5-ol) lead also to inhibition of cell growth and apoptosis in HaCaT-cells, whereas the analogues C $_2$ -Cer=O and C $_2$ -Cer=S are strong agonists and FS-5 a weak agonist of the inhibition of proliferation and apoptosis. The weak effect of FS-5 could be most probably explained by the lack of the double-bond between carbon atom 4 and 5 of the sphingosine backbone.

In addition to $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ its analogues EB 1213, GS 1500, Tacalcitol and Calcipotriol were also tested in HaCaT-cells. All four analogues caused sphingomyelin-hydrolysis, whereas with EB 1213 the hydrolysis was detectable even after 6 h of treatment. Furthermore, the analogues were shown to be antiproliferative and apoptosis-inducing. Nevertheless, only EB 1213 could upregulate the mRNA for TNF α , which could be explained by the fact that the analogues have different promoter selectivity.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	10
1.1. Vitamin D ₃	10
1.1.1. Vitamin D ₃ -Metabolismus	10
1.1.2. Nukleäre Rezeptoren	12
1.1.2.1. Die DNA-Erkennungssequenz der nukleären Rezeptoren	13
1.1.3. Wirkung von Vitamin D ₃ auf die Haut	15
1.1.4. Regulationsmechanismen der Keratinozytendifferenzierung durch 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	17
1.1.5. Regulationsmechanismen der Keratinozytenproliferation durch 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	18
1.2. Apoptose	19
1.2.1. Todesrezeptoren	20
1.2.1.1. TNF α -RI-System	21
1.2.1.2. Fas-System	22
1.2.2. Bcl-2-Familie	23
1.2.3. Caspasen	25
1.2.3.1. Substrate der Caspasen	26
1.2.4. Apoptose in Keratinozyten	28
1.2.5. Ceramidvermittelter Signalweg	29
1.2.5.1. Regulation des Stoffwechsels von Ceramid	30
1.2.5.2. Biosynthese und Abbau von Sphingomyelin	32
1.2.5.3. Rolle von Ceramid in der Haut	33
1.3. Ziel der Arbeit	34
2. ERGEBNISSE	36
2.1. Bestimmung der Zytotoxizität von Vitamin D ₃ -Analoga auf HaCaT-Zellen	36
2.2. Wirkung von Vitamin D ₃ -Analoga auf das Wachstum von HaCaT-Zellen	36
2.3. Vitamin D ₃ -Analoga bewirken die Sphingomyelin-Hydrolyse	38
2.4. 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃ -Vorstufen bewirken keine Sphingomyelin-Hydrolyse	40
2.5. Vitamin D ₃ -Analoga lösen Apoptose in HaCaT-Zellen aus	42
2.6. Expression der Tumornekrosefaktor α -mRNA nach der Behandlung mit Vitamin D ₃ -Analoga	44
2.7. TNF- α Proteinexpression nach Behandlung mit 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃	46
2.8. Eine Blockierung des TNF-RI mittels Antikörper wirkt der 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃ -induzierten Apoptose und Proliferationshemmung entgegen	47
2.9. Fumonisin B1 blockiert die 1 α ,25-(OH) ₂ D ₃ eingeleitete Apoptose	49

2.10.	Induktion der Apoptose durch Tumornekrosefaktor α	50
2.11.	Bestimmung der Sphingomyelinase-Aktivität in HaCaT-Zellen unter Behandlung mit $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ und $\text{TNF}\alpha$	51
2.12.	Wirkung von Ceramidanaloga auf das Wachstum von HaCaT-Zellen	53
2.13.	Ceramid-Analoga lösen Apoptose in HaCaT-Zellen aus	56
3.	DISKUSSION	59
4.1.	ZUSAMMENFASSUNG	68
4.2.	SUMMARY	70
5.	MATERIAL	71
5.1.	Geräte	71
5.2.	Zelllinie	71
5.3.	Chemikalien	72
5.3.2.	Antikörper	73
5.3.3.	Radioaktivität	73
5.3.4.	Primer	73
5.4.	Materialien für die Zellkultur	74
6.	METHODEN	75
6.1.	Zellkultur	75
6.1.1.	Kultivieren der Zellen	75
6.1.2.	Einfrieren und Auftauen der Zellen	76
6.2.	Radioisotopenmarkierung	76
6.3.	Totallipidextraktion	77
6.4.	Bestimmung der Sphingomyelin-Hydrolyse	77
6.5.	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	78
6.6.	Bestimmung der Enzymaktivität von der sauren und neutralen Sphingomyelinase	79
6.7.	Messung der Zytotoxizität	82
6.7.1.	Messung der Laktatdehydrogenase	82
6.7.2.	Messung der alkalischen Phosphatase	83
6.8.	Bestimmung der Proliferation	84
6.9.	Messung des apoptotischen Zelltodes mittels eines Sandwich-ELISAs	85
6.10.	Ribonuklease (RNase)-freies Arbeiten	87
6.10.1.	Isolierung der mRNA aus Zellen	88
6.10.2.	Isolierung der Total-RNA nach Quiagen	89
6.11.	Northern-Blot	90
6.11.1.	Radioaktive Markierung der DNA-Sond	92

6.11.2.	Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran mit der Sonde	93
6.12.	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	94
6.13.	Immunpräzipitation von TNF α	97
6.14.	Synthese von der zur RNA komplementären DNA (cDNA)	98
6.15.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	100
6.16.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	101

7. LITERATURVERZEICHNIS 102

8. VERÖFFENTLICHUNGEN 115

8.1.	Originalarbeiten	115
8.2.	Kurzveröffentlichungen	115
8.3.	Manuskripte	116

Danksagung

Lebenslauf

LEBENS LAUF

Name: Meryem Bektas
Geburtsdatum: 01.03.1970
Geburtsort: Bafra / Türkei
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Nigar Bektas
Dursun Bektas

Schulbildung

1977-1982: Besuch der Grundschule in Berlin
1982-1986: Besuch der Frithjoff-Nansen Realschule in Berlin
1986-1989: Gymnasiale Oberstufe Theodor-Heuss in Berlin
31.05.1989 Abiturprüfung

Hochschulausbildung

WS 1989/90: Beginn des Chemie-Studiums an der Freien Universität Berlin
WS 1991/92: Wechsel in das Fach Biochemie
März 1993 Vordiplom in Biochemie
Dezember 1995 Diplom in Biochemie mit der Note sehr gut
seit April 1996 Arbeit an der Dissertation in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. Geilen
an der Haut- und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin
Franklin der FU Berlin

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dr. Christoph C. Geilen in der Haut- und Poliklinik (Leiter: Prof. Dr. Prof. h. c. Constantin E.Orfanos) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin fertiggestellt.

Ich möchte hier vor allem meinen ganz besonderen Dank für meinen Doktorvater PD Dr. Dr. Christoph Geilen zum Ausdruck bringen, nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern auch für seine stets motivierenden Diskussionen und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

PD Dr. Thomas Wieder danke ich ebenfalls für seine Diskussionsbereitschaft und seine tatkräftige Unterstützung.

Insbesondere möchte ich Dr. Verena Müller-Wieprecht für ihr großes Engagement beim Lösen so vieler frustrierender und nervenaufreibender labortechnischer Probleme danken. Weiterhin danke ich Dr. Vitam Kodelja, dessen Hilfe ich in „Notfällen“ nicht selten in Anspruch genommen habe.

Frau Marianne Hoffmann danke ich für ihre Hilfe in der Zellkultur.

An dieser Stelle möchte ich auch nicht missen, die hervorragende Arbeitsatmosphäre des gesamten „Geilen-Teams“ hervorzuheben, in der ich sehr gerne gearbeitet habe. Dafür danke ich: Dr. Michael Arnold, Yvonne Dullin, Christian Riebeling, Pia Harbich, Gerit Goltz, Carola Müller, Arnim Stooss, Steffen Barz und Monika Raisova.

Ferner möchte ich der Sonnenfeld-Stiftung danken, die mich mit einem zweijährigen Stipendium unterstützt hat.

1. Gutachter: PD Dr. Dr. Christoph Geilen
2. Gutachter: Prof. Dr. Eberhard Riedel

Tag der Disputation: 27. April 1999