

## 1. Einleitung

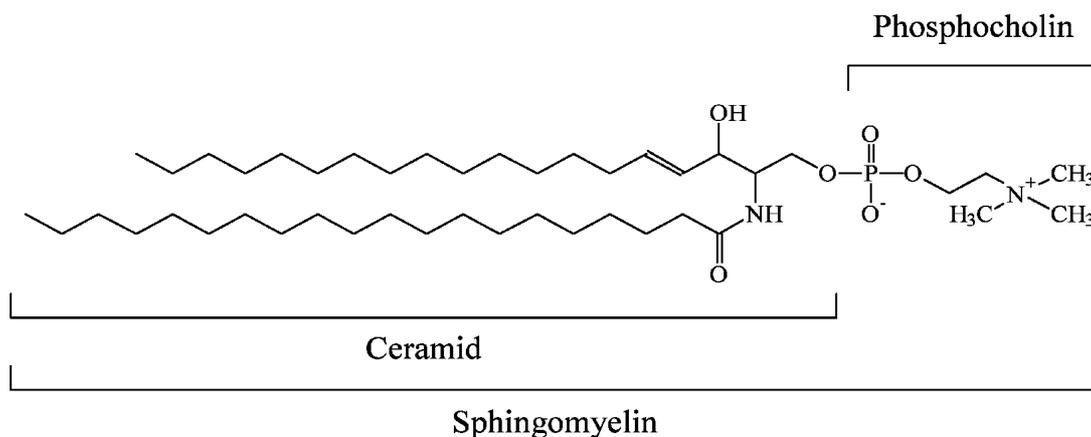
Die Hauptlipide der eukaryotischen Zellmembran sind Glycerophospholipide, Cholesterol und Sphingolipide (Phospho- und Glycosphingolipide).

Die Sphingolipide, deren Hauptvertreter Sphingomyelin ist, bilden darin einen Anteil von 1-2 %. In menschlichen Korneozyten der Haut liegt der Sphingolipidgehalt sogar bei 18 % (Elias, 1983). Während das erste Glycosphingolipid im Hirngewebe entdeckt und deshalb Cerebrosid genannt wurde, blieb noch lange Zeit die Funktion dieser Moleküle rätselhaft, weshalb sie nachfolgend nach der Sphinx der griechischen Mythologie als „Sphingolipide“ bezeichnet wurden. Später glaubte man nur an die strukturgebenden Eigenschaften dieser Lipide im Aufbau von Zellmembranen. Erst die Entdeckung der Hemmung der Proteinkinase C (PKC) durch Sphingosin (Hannun *et al.*, 1986) führte zu der Hypothese, daß Sphingolipide als intrazelluläre Botenstoffe, sogenannte „*Second Messenger*“, fungieren. Besonderes Forschungsinteresse gilt diesbezüglich den Sphingolipiden Ceramid, Ceramid-1-phosphat, Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat. Im folgenden konzentrieren sich die Ausführungen auf Ceramid.

### 1.1. Struktur und Biosynthese von Ceramid

Ceramid besteht aus Sphingosin, einem C<sub>18</sub>-Aminoalkohol, welcher über eine Amidbindung mit einer langkettigen, meist gesättigten und unverzweigten Fettsäure verbunden ist. Dieser Fettsäure-Rest besitzt Kettenlängen zwischen 16 und 24 Kohlenstoffatomen, wobei der größte Anteil 16 bis 18 C-Atome aufweist. Die *de novo*-Synthese von Ceramid beginnt mit der Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A zu 3-Dehydrosphinganin (3-Ketosphinganin). Dieser Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und wird durch die Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysiert. Die 3-Dehydrosphinganin-Reduktase katalysiert nachfolgende Reduktion zu D-erythro-Sphinganin. Mittels der Sphinganin-Acyltransferase (Ceramid-Synthase) wird eine langkettige Fettsäure auf die Aminogruppe übertragen, wobei D-erythro-Dihydroceramid entsteht (Mandon *et al.*, 1992). Zuletzt fügt eine Desaturase eine trans-

4,5-Doppelbindung ein, so daß Ceramid entsteht (Rother *et al.*, 1992). Man unterscheidet die von Ceramid sich ableitenden Phosphosphingolipide (Phosphocholin-Kopfgruppe am C<sub>1</sub>-Atom des Sphingosinrückgrates), deren Hauptvertreter Sphingomyelin ist, von den Glycosphingolipiden (Kohlenhydratmolekül(e) am C<sub>1</sub>-Atom des Sphingosinrückgrates), deren Hauptvertreter Glucosylceramid ist. Limitierend für die Neusynthese ist das Vorhandensein der Ausgangsmoleküle Serin und Palmitinsäure und die relativen Enzymaktivitäten aller beteiligter Enzyme. Die Ceramid-Neubildung findet im Endoplasmatischen Retikulum statt (van Echten und Sandhoff, 1993), die anschließende Bildung der Glycosphingolipide und Phosphosphingolipide erfolgt im Golgi-Apparat (Futerman *et al.*, 1990). Nachfolgend gelangen die Sphingolipide mittels Membranvesikeln an die Zelloberfläche. Abb. 1. zeigt die Grundstruktur der beiden wichtigsten Sphingolipide Sphingomyelin und Ceramid. Die *de novo*-Synthese wird als einer der Ceramid-modulierenden Wege in Abb. 2. gezeigt.

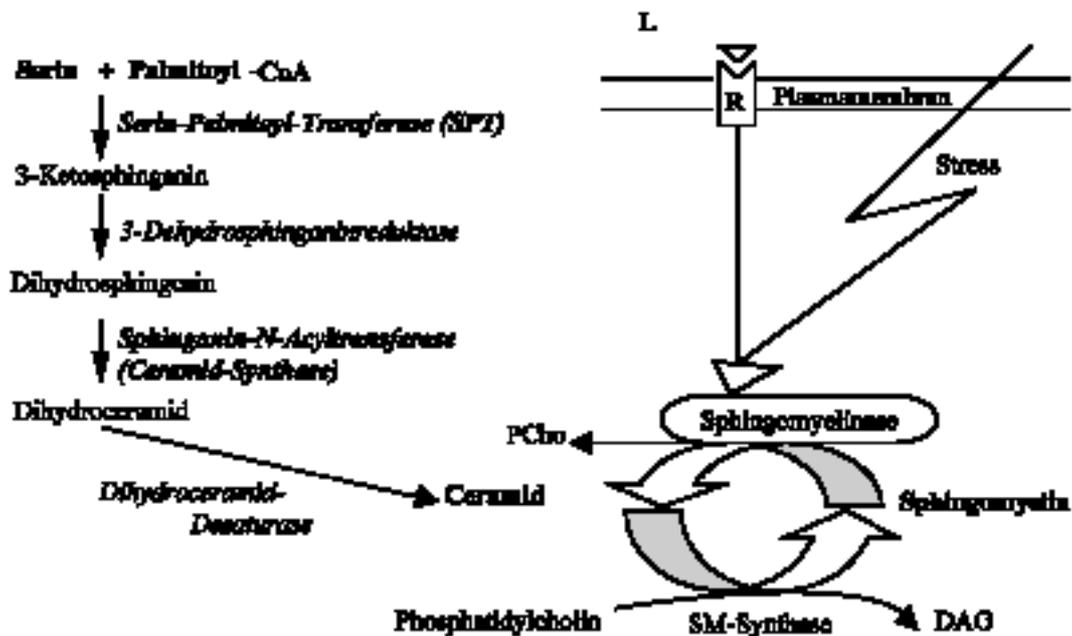


**Abb.1. Chemische Struktur von Ceramid und Sphingomyelin**

## 1.2. Der Sphingomyelin-Zyklus

Neben der *de novo*-Synthese existiert ein weiterer, die Ceramid-Bildung forcierender Stoffwechselweg, der erstmals in HL-60 Zellen nachgewiesen wurde (Okazaki *et al.*, 1989). Das

in eukaryotischen Plasmamembranen vorkommende Sphingomyelin (Hannun *et al.*, 1996) wird durch Sphingomyelin-spezifische Formen der Phospholipase C hydrolysiert, die Sphingomyelinasen genannt werden (Kolesnick, 1991) und Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin hydrolysieren. Die Agonisten-vermittelte Hydrolyse von Sphingomyelin und die anschließende Neusynthese von Sphingomyelin wurden als Sphingomyelin-Zyklus bezeichnet. Ähnlich dem Glycerophospholipid-Zyklus führt ein extrazelluläres Signal über die Bindung an einen spezifischen Rezeptor oder direkt Plasmamembran-vermittelt zu einer Aktivierung von Sphingomyelinasen. Diese Signale können sowohl Zytokine (TNF, Fas-Ligand, IFN, IL-1) als auch Stress durch Hitze-Schock, ionisierende und ultraviolette Strahlung, Wachstumsfaktoren-Mangel, Medikamente, Verletzung oder Infektionen (z.B. HIV) sein (Hannun und Luberto, 2000). Abbildung 2 zeigt schematisch den Sphingomyelin-Zyklus neben der *de novo*-Synthese von Ceramid.



**Abb.2. Die 2 Hauptwege der intrazellulären Ceramid-Bildung.**

Ceramid entsteht entweder über den *de novo*-Syntheseweg aus Serin und Palmitoyl-CoA (linke Bildhälfte) oder mittels der Sphingomyelin-Hydrolyse im Sphingomyelin-Zyklus (rechte Bildhälfte). Letzterer wird entweder Rezeptor-vermittelt oder direkt über die Plasmamembran einwirkende Stress-Faktoren angeschaltet (L=Ligand; R=Rezeptor; SM=Sphingomyelin; DAG=Diacylglycerol; PCho=Phosphocholin).

### 1.3. Biologische Rolle von Ceramid

Ceramid als zentrales Molekül im Sphingolipid-Stoffwechsel moduliert die Aktivität von verschiedenen Enzymen, die schließlich zu der typischen zellulären Antwort führen. Zu dieser gehören die Hemmung des Zellwachstums, die Induktion der Apoptose, die Förderung der Zelldifferenzierung, Zellalterung und entzündliche Reaktionen (Venable *et al.*, 1995). Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Ceramid und seinen Gegenspielern, wie Sphingosin-1-phosphat (SPP), scheint wichtig für die Homöostase aller Gewebe zu sein. Dysregulation des intrazellulären Ceramid-Levels wird für viele Krankheiten, wie AIDS, Autoimmunkrankheiten und maligne Erkrankungen verantwortlich gemacht (Sandhoff *et al.*, 1998). Diese Mißstände gehen mit einem gestörten Rheostat zwischen apoptotischen und proliferativen Einflüssen einher. Obwohl erhöhte Ceramidspiegel häufig toxisch und proapoptotisch sind (Jarvis und Grant, 1998) und beim Auftreten von z.B. Diabetes mellitus und systemischem Lupus erythematodes gefunden werden konnten, ist eine Minimalkonzentration für Zellproliferation und Differenzierung erforderlich, um z.B. neurodegenerative Erkrankungen, wie M. Parkinson und M. Alzheimer am Entstehen zu hindern (Sharma und Shi, 1999). Pathologisch erniedrigte Ceramid-Konzentrationen führen zu Zellzyklusstop und undifferenziertem zellulären Phänotyp (Merrill *et al.*, 1997).

#### 1.3.1. Ceramid und Apoptose

Ceramid und andere Sphingolipide wirken antiproliferativ, differenzierungsfördernd und spielen als sogenannte Botenstoffe ("*second messenger*") besonders in der Apoptose-Regulation eine wichtige Rolle. Die Apoptose als eine bestimmte Form des programmierten Zelltodes ist neben Zellwachstum, Zellteilung und Differenzierung von Geweben einer der grundlegenden und die Homöostase des Organismus aufrechterhaltenden Vorgänge. Maligne oder benigne Erkrankungen zeichnen sich entweder durch eine verminderte Apoptose-Rate oder eine vermehrte Proliferation aus, so daß das biologische Gleichgewicht zwischen diesen beiden die Zellzahl konstant haltenden Faktoren gestört ist. Deshalb sind in den letzten Jahren Untersuchungen in den

Mittelpunkt gerückt, die sich mit der zellulären Regulation der Apoptose und den daraus ableitbaren Eingriffsmöglichkeiten beschäftigen. Der programmierte Zelltod wurde zuerst mit Vorgängen der Evolution und Embryogenese assoziiert, wobei genetisch festgelegt ist, wann der Zelltod in bestimmten Organen ohne äußeren Stimulus eingeleitet wird (Fesus, 1993). Andererseits gibt es den Vorgang der Apoptose als Unterform des programmierten Zelltodes, der durch ein äußeres Signal und ohne genetische Steuerung eingeleitet werden kann (Gerschenson und Rotello, 1992). Beide Begriffe werden in der Literatur oft synonym verwendet. Das Studium des Nematoden *Caenorhabditis elegans* leistete einen wertvollen Beitrag zum Verständnis des apoptotischen Prozesses. Während der Entwicklung dieses Wurmes sterben genau 131 von 1090 somatischen Zellen, was auf den klar regulierten Ablauf der Apoptose hinweist (Hale *et al.*, 1996). Bei der genetischen Analyse wurden 3 Gene entdeckt, die wichtig für den geregelten Ablauf der Apoptose sind. Die beiden Gene *cell death gene (ced)-3* und *cell death gene-4* wirken proapoptotisch, *ced-9* wirkt antiapoptotisch (Fesus, 1993). Die homologen menschlichen Gene konnten in den letzten Jahren durch Screening-Verfahren entdeckt werden. Das Gen *ced-3* kodiert z.B. für eine Cystein-Protease, welche den Mitgliedern der Caspasen-Proteasen-Familie sehr ähnlich ist, die das Apoptose-Programm in Säugetier-Zellen regulieren.

Die Apoptose wird eingeteilt in die Initiationsphase, die Effektorphase und die Exekutionsphase (Kroemer *et al.*, 1997). In jeder dieser Phasen werden bestimmte Proteine aktiviert bzw. deaktiviert:

*1. Initiationsphase:* Als die Zelltyp - und Stimulus-spezifischste Phase wird sie wegen dieser Variabilität auch *private pathway* genannt. Hier erhalten die Zellen den zumeist Rezeptor-vermittelten, exogenen, die Signalkaskade anschaltenden Stimulus, wobei Signalstärke, Zelltyp und Zustand der Zelle darüber entscheiden, ob die nächste Phase eingeleitet oder verhindert wird und die Zelle überleben kann (Kroemer *et al.*, 1997). Abhängig von dem Auslöse-Modus der Apoptose wird die Rezeptor-vermittelte Apoptose von der durch DNA-Schädigung eingeleiteten Apoptose unterschieden. Gut beschriebene Signalwege sind die über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor I (TNFRI) und den Fas-Rezeptor (Apo-1/CD95/FasR) vermittelten Zellantworten (Nagata, 1997). Diese Rezeptoren werden auch "Todesrezeptoren"

genannt, weil sie einen direkten Zugang zur Apoptose-Maschinerie (Caspasen-Kaskade) haben (Ashkenazi und Dixit, 1998), ihre zytoplasmatische Seite kann mittels Adapterproteinen die Apoptose auslösen und wird „Todesdomäne“ (*death domain*) genannt: An die Todesdomäne des TNF-Rezeptor I wird das Adapterprotein *TNF receptor-associated protein with death domain* (TRADD) gebunden, nachfolgend das Adapterprotein *Fas-associated protein with death domain* (FADD) assoziiert und die saure Sphingomyelinase aktiviert (Okazaki *et al.*, 1989). Das somit durch Sphingomyelin-Hydrolyse entstehende Ceramid leitet in der Effektorphase die Apoptose ein (Zhang *et al.*, 1997). Ceramid wurde in diesem Zusammenhang als unterhalb von TRADD und FADD und oberhalb der Effektor-Caspasen eingeordnet (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Oberhalb der Todesdomäne des TNFI-Rezeptors befindet sich eine *neutral sphingomyelinase activating domain* (NSD), (Adam, 1996). An diese kann das Protein *factor associated with neutral sphingomyelinase* (FAN) binden, welches die neutrale Sphingomyelinase (nSMase) koppelt (Adam-Klages, 1996). Dieser alternative Signalweg ist unabhängig von der durch TNFR und FASR-vermittelten Apoptose und führt durch Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase zur Ceramid-Generation, welches über die CAPK die Entzündungsreaktion auslöst (siehe SM-Zyklus). Die Aktivierung des Fas-Rezeptors (FasR) führt zumeist zur Apoptose (Green und Ware, 1997; Scaffidi *et al.*, 1998), wobei somit aktivierte T-Zellen nach Immunantwort, virusinfizierte Zellen, Krebszellen u.a. eliminiert werden (Ashkenazi und Dixit, 1998).

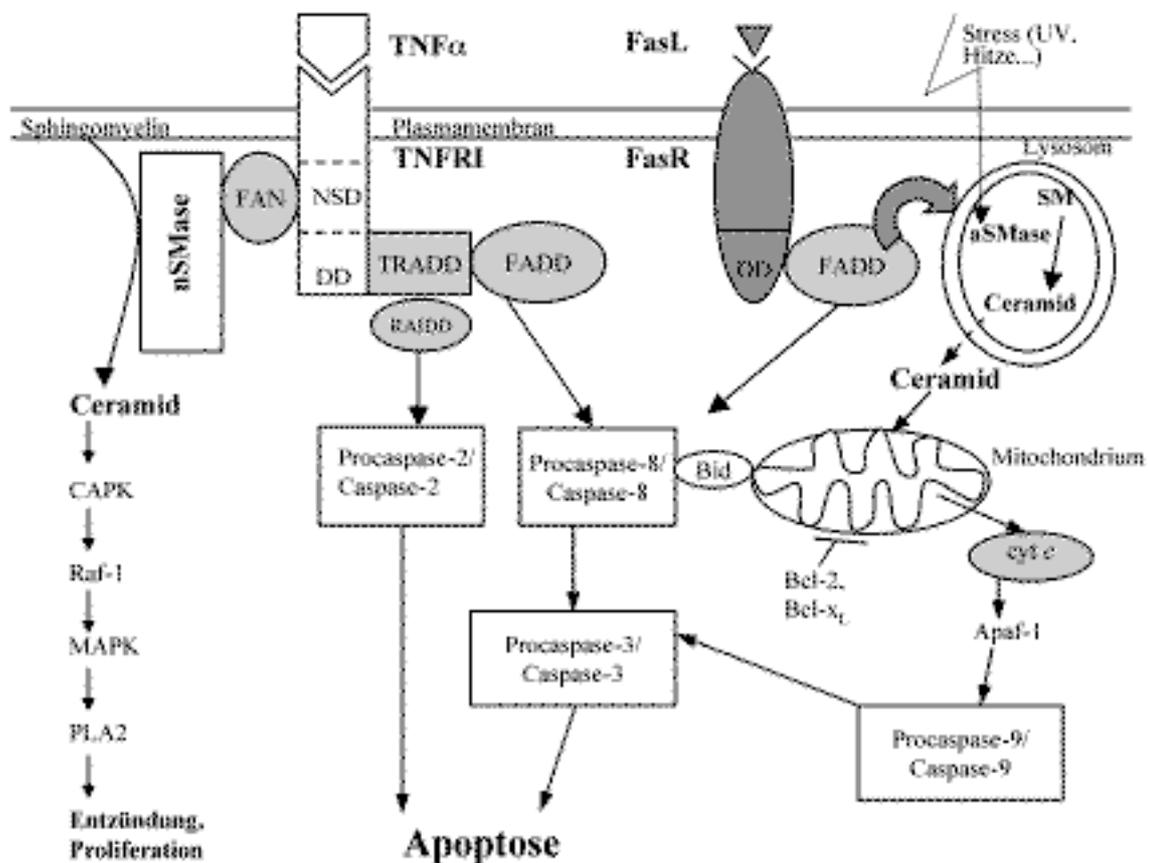
Der Initiationsphase zugehörig sind die Initiator-Caspasen, zu denen die Caspasen -8, -9, -10 und -2 gehören und welche sich nach Anbindung an die zytoplasmatische Rezeptorseite durch Selbstspaltung aktivieren können. Die mittlerweile 13 bekannten Mitglieder der Caspasen-Familie spielen als Apoptose-ausführende Enzyme eine hauptsächliche Rolle (Cohen, 1997; Villa *et al.*, 1997).

2. *Effektorphase*: Die Effektorphase ist durch die Aktion einer Vielfalt von Apoptose-modulierenden Faktoren gekennzeichnet. Das Signalmolekül Ceramid, welches durch saure und neutrale Sphingomyelinasen gebildet wird, ist eines der hauptsächlichen Moleküle: Einerseits kann es direkt bestimmte Proteinkinasen und -phosphatasen aktivieren und somit die Apoptose-Maschinerie in Gang setzen (s. Kap. 1.4.). Andererseits kann es neben anderen Faktoren die mitochondriale Cytochrom *c*-Freisetzung initiieren, was letztendlich zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade und zur Apoptose führt. In der Effektorphase als auch der

anschließenden Exekutionsphase sind die Effektor-Caspasen (Caspasen -3, -6, -7) von Bedeutung, welche durch die Initiator-Caspasen gespalten und somit aktiviert werden. Wird ein bestimmter Punkt in der Signalweiterleitung erreicht, ist die Apoptose nicht mehr reversibel. Dieser *point of no return* liegt, obwohl bis zu einem gewissen Grad Zell-spezifisch, in der Effektorphase und wird der Caspase-3 zugeordnet. Ein anderer die Effektorphase modulierender Faktor ist das Bcl-2-Onkogen, dessen Besonderheit darin besteht, daß seine Aktivität nicht wie bei den meisten Onkogenen mit einem gesteigerten Zellwachstum einhergeht, sondern daß es den apoptotischen Zelltod unterdrückt (Yang und Korsmeyer, 1996). In Gegenwart von Bcl-2 wird kein Cytochrom *c* freigesetzt (Yang *et al.*, 1997; Gharfourifar *et al.*, 1999). Dabei wirkt Bcl-2 als eine Art Pore mit dosierter Ionen-Durchlässigkeit in der äußeren Mitochondrienmembran so, daß die während der Apoptose sonst rasch Protein-durchlässige Membran ihre Integrität weitestgehend behält. Die stetig wachsende Bcl-2-Familie besteht aus mindestens 15 humanen Mitgliedern und mehreren viralen (Adams und Cory, 1998). Im Zusammenhang mit der Apoptose werden die Mitglieder in 2 Gruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe antiapoptotisch wirkt (z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, *ced-9* in *C. elegans* u.a.) (Yang *et al.*, 1997) und die andere Gruppe proapoptotische Funktionen hat (z.B. Bcl-x<sub>s</sub>, Bax, Bid, *ced-3* in *C. elegans* u.a.). Liegen in der gegebenen Zelle mehr antiapoptotische Bcl-2-Proteine als proapoptotische Bcl-2-Proteine vor, so wird der Zelltod verhindert, wobei im umgekehrten Fall die Zelle empfänglicher für apoptotische Stimuli wird (Gajewski und Thompson, 1996). So konnte gezeigt werden, daß Bcl-2 überexprimierende Zellen die vorher durch Ceramid vermittelte Apoptose (via Mitochondrien) in geringerem Maße zeigen (Wieder *et al.*, 1997). Die Akkumulation von Ceramid wurde dabei nicht verhindert, d.h. Bcl-2 fungiert in der Signalkaskade unterhalb von Ceramid.

3. *Exekutionsphase*: Die Zelltyp-unabhängigste Phase ist durch das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen im Abstand von ca. 200 Basenpaaren durch eine Ca<sup>2+</sup>-und Mg<sup>2+</sup>-abhängige Endonuklease gekennzeichnet (Wyllie, 1998). Die Effektor-und Exekutions-Caspasen spalten in der letzten der Apoptose-Phasen verschiedene Zielsubstrate, wodurch die Zelle nachfolgend die typische apoptotische Morphologie zeigt. So wird z.B. Gelsolin, ein Zytoskelett-regulierendes Protein gespalten und das nukleäre DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP) dient der Caspase-3 als Zielsubstrat.

Die Rezeptor-vermittelte Apoptose, wie sie sich aktuell darstellt, wird in Abb. 3. gezeigt.



### Abb.3. Rezeptor-vermittelte Apoptose.

TNF und FasL binden an die jeweiligen Rezeptoren und führen zur Kopplung von intrazellulären Adapterproteinen, wie *TNF receptor-associated protein with death domain* (TRADD) und *Fas-associated protein with death domain* (FADD). Intrazellulärer Rezeptoranteil und Adapterproteine binden mit ihren jeweiligen Todesdomänen (*death domains*, DD) aneinander. An TRADD kann über RAIDD (*Rip-associated ICH/ced-3 homologous protein with death domain*) Procaspase-2 binden, was über weitere Caspasen zur Apoptose führt. Andererseits kann FADD an TRADD binden. Ein alternativer Signalweg ist die Aktivierung der neutralen Sphingomyelinase (nSMase) über eine am TNFR proximal gelegene NSD (*neutral sphingomyelinase activating domain*), welche *factor associated with neutral sphingomyelinase* (FAN) koppelt. Das durch diesen Weg entstandene Ceramid wirkt über die Ceramid-aktivierten Proteinkinasen (CAPK) entzündungsfördernd und proliferativ. FADD führt über Kopplung von Procaspase-8 zu deren Aktivierung, weiterhin zu Caspase-3-Stimulation, die als wichtige Effektorcaspase zur irreversiblen Apoptose-Antwort der Zelle führt. Alternativ stimuliert FADD die saure, lysosomale Sphingomyelinase (aSMase), die auch direkt durch exogenen Stress via Plasmamembran aktivierbar ist. Das so generierte Ceramid kann die mitochondriale Cytochrom *c* (*cyt c*)-Freisetzung stimulieren, wobei die Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie entweder hemmend oder fördernd eingreifen. *Cyt c* führt über *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) zur Procaspase-9-Aktivierung und weiterhin zur Procaspase-3-Aktivierung mit anschließender Apoptose.

### 1.3.2. Haut und Apoptose

Die Epidermis als oberste Hautschicht besteht aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel. Darin bildet das *Stratum basale* die mit der Basalmembran verankerte Zellschicht, welche sich nach apikal zum *Stratum spinosum*, weiter zum *Stratum granulosum*, der noch Zellorganellen besitzenden Schicht und schließlich zur Hornschicht, dem *Stratum corneum* ausdifferenziert. Lange Zeit wurde kontrovers diskutiert, ob Keratinozyten Apoptose eingehen oder nicht, wohl deswegen, weil sie nur eine wenig typische Apoptose-Morphologie eingehen. Sie bilden nur in geringem Maße *apoptotic bodies*, wahrscheinlich weil durch die verhornte Proteinhülle (*cornified envelope*) die Membranstruktur rigider ist (Raskin, 1997). In primären Mäusekeratinozyten wurde gezeigt, daß die Zellen im *Stratum granulosum* im Gegensatz zum *Stratum basale* deutliche DNA-Fragmentierungen aufweisen (McCall und Cohen, 1991). Es wird vermutet, daß Keratinozyten in der Basalschicht durch Expression von Bcl-x<sub>L</sub> bzw. Bcl-2 gegen Apoptose geschützt sind und im Laufe der Differenzierung dieses Protein herunter- und das proapoptotische Protein Bax hochreguliert wird (Bianchi *et al.*, 1994; Mitra *et al.*, 1997). Auch andere Marker-Proteine kennzeichnen bestimmte Differenzierungsstadien. So findet man bestimmte Zytokeratine (CK5, CK14) in den basalen Schichten, während z.B. im *Stratum granulosum* CK1 und CK10 sowie die Differenzierung anzeigende Proteine (Involucrin, Cornifin, Loricrin, Filaggrin, Transglutaminase 1) zu detektieren sind (Gandarillas *et al.*, 1999). Daß die Differenzierung von Keratinozyten wohl eine weiterentwickelte, komplexere Form der Apoptose darstellt, wurde durch die Expression und Aktivierung der Transglutaminase 1 in den oberen epidermalen Zellagen angenommen. Die experimentelle Überexpression dieser Proteine zum *cornified envelope* vernetzenden Enzyms führte zur Apoptose-Induktion der Zellen (Fesus, 1993). Heute geht man davon aus, daß die beiden Prozesse Apoptose und Differenzierung als voneinander unabhängige Prozesse auftreten. So ist der Differenzierungsvorgang für die Einleitung der Apoptose in Keratinozyten keine vorhergehende Bedingung (Mitra *et al.*, 1997). Für den Ablauf der Apoptose sind spezifische Proteine notwendig, die sich in allen kernhaltigen Zellen finden lassen, also nicht im *Stratum corneum* existent sind (Gandarillas *et al.*, 1999). Die Zelle stirbt entweder langsam durch den Vorgang der Differenzierung, wobei sie ihre eigentliche Barrierefunktion erhält, oder

schnell durch Apoptose, die vor allem in den weiter basal gelegenen Hautschichten und infolge von exogenen, schädigenden Einflüssen schon innerhalb von Minuten zu beobachten sein kann.

### 1.3.3. Rolle von Ceramiden in der Haut

Ceramide entfalten in der Epidermis ihre Wirkungen entweder als intrazelluläre Botenstoffe oder extrazellulär als die Hautbarriere bildende Lipide, deren gemeinsame intrazelluläre Herkunft durch die *de novo*-Synthese angenommen wird (Geilen *et al.*, 1997). Auszuschleusendes Ceramid wird im Golgi-Apparat zu polaren, z.B. glykosylierten Derivaten umgesetzt (Madison und Howard, 1996) und extrazellulär wieder durch enzymatische Hydrolyse zu Ceramid umgesetzt (Doering *et al.*, 1999). Das *Stratum corneum* ist die oberste, verhornte Schicht der Epidermis. Sie besteht aus den Hauptlipidkomponenten Ceramid, Cholesterol und freien Fettsäuren (Elias, 1983), deren Biosynthese eng mit der Barrierefunktion der Haut verknüpft ist. Eine Hauptfunktion des *Stratum corneum* ist der mechanische Schutz der Haut vor exogenen schädlichen Einflüssen und Verhinderung einer Austrocknung. Letztere Funktion ist eng mit den mehrschichtigen, extrazellulär gelegenen Lipidlamellen verbunden (Sweeny und Downing, 1970), welche größtenteils aus komplexen, z.T. O-acylierten Ceramidspezies mit langen Fettsäureresten bestehen (Wertz *et al.*, 1987). Die Rolle des Ceramids in der Barrierebildung zeigt sich darin, daß nach Störung der obersten Schichten der Epidermis die Synthese von Ceramid und anderen Sphingolipiden ansteigt (Proksch und Brasch, 1997). Außerdem ist die Aktivität des Schlüsselenzyms der Ceramid-Synthese, der SPT, in der Epidermis viel höher als in anderen Geweben (Holleran *et al.*, 1991). Bei vielen Hautkrankheiten scheint eine veränderte Lipidzusammensetzung pathogenetisch zu sein. So gehen die meisten epidermalen Erkrankungen, wie z.B. atopische Dermatitis, Ichthyosen und Psoriasis (mit Ausnahme der Xerosis und der Farber'schen Krankheit), mit einem signifikant erniedrigten Ceramid-Gehalt einher, wobei der genaue Defekt im Sphingomyelin-Metabolismus unbekannt ist (Geilen *et al.*, 1997).

## 1.4. Ceramid-vermittelte Signalwege

Im folgenden sind die fünf wichtigsten direkten Angriffsziele von Ceramiden charakterisiert und in Abb.4. schematisch dargestellt.

### A.) Ceramid-aktivierte Protein-Phosphatase (CAPP)

Sie wird spezifisch nur durch Ceramid stimuliert und gehört zur Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen 2A (PP2A), erstmalig von der Arbeitsgruppe um Hannun beschrieben (Dobrowsky und Hannun, 1992). Die CAPP ist in die Apoptose-Antwort der Zelle und die Hemmung des Zellwachstums involviert. Die Proliferationshemmung erfolgt über die Suppression des c-myc-Gens, eines Oncogens (Wolff *et al.*, 1994). Daneben existiert eine neuere Protein-Phosphatase 1 (PP1), die der gleichen Familie zuzuordnen ist und wie auch die CAPP das Retinoblastom-Genprodukt dephosphorylieren kann. Die Dephosphorylierung führt zur Inaktivierung dieses Onkogens und somit zur Zellwachstumshemmung (Perry und Hannun, 1998). Die CAPP kann durch Okadainsäure gehemmt werden.

### B.) Ceramid-aktivierte Protein-Kinase (CAPK)

Sie stellt ein membrangebundenes 97-kDa Protein dar (Liu *et al.*, 1994) und gehört zu der Gruppe der Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Kinasen mit der minimalen Erkennungssequenz Leu-Thr-Pro (Joseph *et al.*, 1993). Kürzlich veröffentlichten Untersuchungen zufolge ist CAPK Kinase-Suppressor von Ras (KSR=*kinase suppressor of Ras*) (Zhang *et al.*, 1997). Gut beschrieben ist ihre Aktivierung durch TNF, IL-1 $\beta$ , bakterielle Sphingomyelinasen und Ceramid-Analoga. CAPK leitet den Signalweg weiter, der zu Proliferation und Entzündung führt. Der TNF-Rezeptor I besitzt neben der Todesdomäne (DD) eine oberhalb davon lokalisierte *neutral SMase activating domain* (NSD), an welche das Protein FAN koppelt. Letzteres bindet wiederum die neutrale Sphingomyelinase, welche anschließend Ceramid durch Sphingomyelin-Hydrolyse bildet und zu nachfolgender CAPK-Stimulation führt (Adam-Klages *et al.*, 1996). CAPK aktiviert Raf-1, welches die *mitogen activated protein kinases* (MAP-Kinasen) stimuliert (Yao *et al.*, 1995). Es folgen Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, die aus

Phosphatidylcholin Arachidonsäure freisetzt und über Eikosanoide zur Entzündungsreaktion führt (Zhang *et al.*, 1997).

### C.) Die Proteinkinase C (PKC)-Isoenzyme

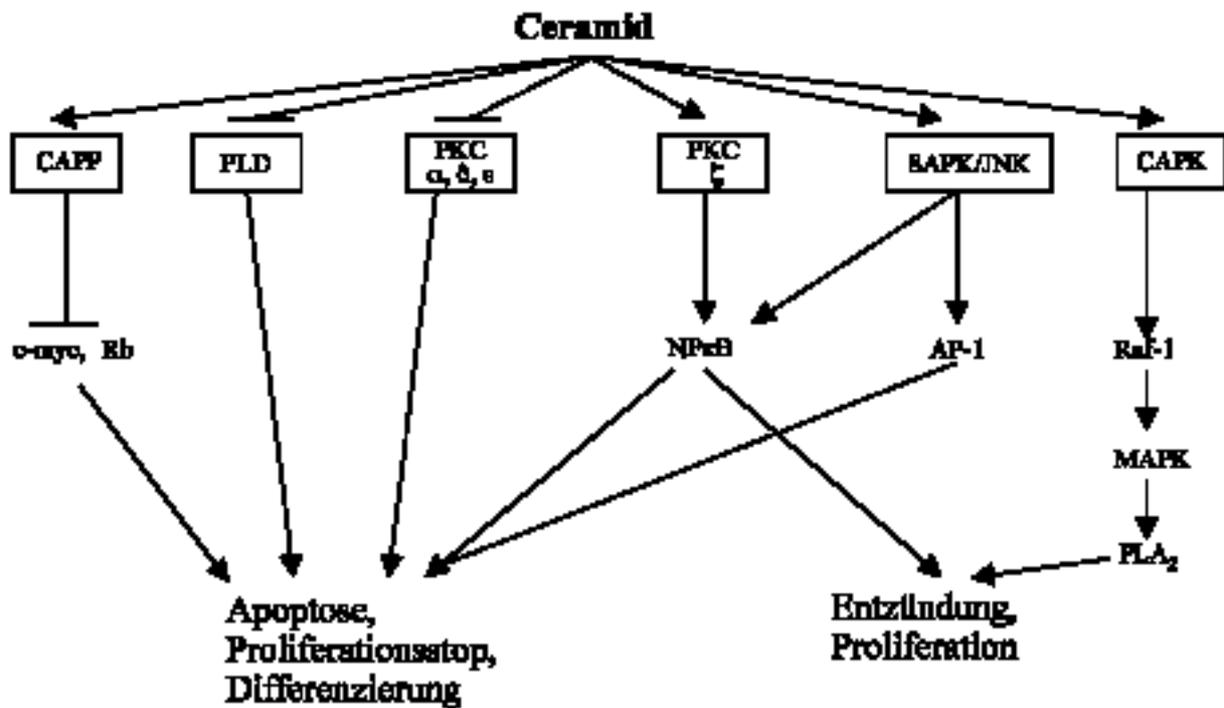
Sie werden ebenfalls von Ceramid moduliert und gehören in die Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Die Proteinkinase C-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  werden durch Ceramid inaktiviert, indem sie von der Plasmamembran in das Zytosol transloziert werden (Gomez-Munoz, 1998). Diese Inaktivierung ist wichtig für die Apoptose-Einleitung durch Ceramid, ohne die es zur Blockierung der Apoptose (Sawai *et al.*, 1997) oder verminderter Differenzierung von humanen Keratinozyten kommt (Jones und Sharpe, 1994). Im Gegensatz dazu wird die Isoform PKC $\zeta$  durch Ceramid zur Autophosphorylierung angeregt, was im weiteren zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF  $\kappa$ B führt (Müller *et al.*, 1995).

### D.) Phospholipase D (PLD)

Man vermutet, daß die PLD für den intrazellulären Vesikel-Transport zuständig ist (Nickel und Wieland, 1997). Ceramid unterbindet den Vesikeltransport möglicherweise durch Hemmung der PLD (Jones und Murray, 1995; Hannun, 1997). In HaCaT-Keratinozyten konnte gezeigt werden, daß die Ceramid-induzierte Apoptose mit einer erniedrigten PLD-Aktivität einhergeht (Iwasaki-Bessho *et al.*, 1998).

### E.) Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK)

Die SAPK oder auch *jun nuclear kinase* (JNK) genannt, gehört zur MAP-Kinasen-Superfamilie und wird für die Stress-vermittelte Apoptose, z.B. durch Hitzeschock oder ionisierende Strahlen, welche unter Umgehung der TNF  $\alpha$ -oder Fas-Rezeptoren direkt die Sphingomyelinase(n) über die Plasmamembran aktivieren können, benötigt (Verheij *et al.*, 1996). Die Stimulation der SAPK führt im weiteren zur Aktivierung der Transkriptionsgene NF  $\kappa$ B sowie AP-1 und somit zur Einleitung der Apoptose (Hannun, 1997).



**Abb.4. Ceramid-vermittelter Signalweg.**

Ceramid als intrazellulärer „second messenger“ stimuliert oder inhibiert verschiedene Enzyme, über die es seine vielfältigen, zumeist im Gleichgewicht stehenden biologischen Wirkungen entfaltet. Die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase (CAPP) wird stimuliert und hemmt die Onkogene c-myc und Retinoblastom-Genprodukt (Rb), was zur Apoptose führt. Die für den Vesikeltransport verantwortliche Phospholipase D (PLD) wird gehemmt, was die Apoptose auslöst. Proteinkinase C (PKC)-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  werden gehemmt, was ebenfalls die Apoptose initiiert. PKC  $\delta$  wird stimuliert, führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF  $\kappa$ B, welcher sowohl proapoptotische als auch proliferative/entzündungsfördernde Funktionen besitzt. Die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), oder auch c-jun-Kinasen (JNK) genannt, werden durch Ceramid aktiviert und stimulieren ihrerseits NF  $\kappa$ B und den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher Apoptose auslöst. Die Ceramid-aktivierte Proteinkinase (CAPK) wird stimuliert, nachdem eine neutrale Sphingomyelinase aus Sphingomyelin Ceramid freigesetzt hat. CAPK stimuliert über Raf-1 die Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK), welche Phospholipase A<sub>2</sub> aktivieren. Diese setzt Arachidonsäure frei und führt über Eikosanoide zur Entzündungsreaktion.

## 1.5. Modulation intrazellulärer Ceramid-Spiegel

Weil die fein abzustimmende Balance der intrazellulären Ceramid-Konzentration für die Aufrechterhaltung einer gesunden Zellfunktion unerlässlich ist, sind Enzymsysteme, die den Ceramid-Spiegel kontrollieren, in den Mittelpunkt vieler Betrachtungen gerückt.

### 1.5.1. Erhöhung des Ceramid-Spiegels

Enzyme der *de novo*-Ceramid-Synthese führen zu einem Ceramid-Anstieg, wobei die Serin-Palmitoyltransferase (SPT) als auch die Sphingamin-*N*-Acyltransferase (Ceramid-Synthase) die geschwindigkeitsbestimmenden Schlüsselenzyme darstellen. Es konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung der Ceramid-Synthase mittels Daunorubicin (ein in der Tumorthherapie eingesetztes Anthrazyklin) möglich ist. Der nachfolgende zelluläre Ceramid-Anstieg führte zu Apoptose (Bose *et al.*, 1995). Andererseits wirkt das Pilzgift Fumonisin B<sub>1</sub> hemmend auf die Ceramid-Synthase und unterdrückt die beobachteten Ceramid-Effekte (Merrill *et al.*, 1996). Hautzellen, die UV-Licht ausgesetzt waren, zeigten anschließend eine Aktivierung der SPT mit nachfolgendem zellulärem Ceramid-Anstieg (Farrell *et al.*, 1998). Alle diese, die DNA der Zellen schädigenden Faktoren, die die *de novo*-Synthese des Ceramids aktivierten, führten zu dessen Anstieg erst nach einigen Stunden.

Durch Sphingomyelin-Hydrolyse via Sphingomyelinasen (SMasen) kann Ceramid innerhalb von Sekunden bis Minuten entstehen, wobei dieser Weg durch die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie oder direkt über die Plasmamembran in der Stress-vermittelten Zellantwort initiiert wird.

Es wurden bisher 5 Isoformen der humanen Sphingomyelinasen beschrieben (Liu *et al.*, 1997; Kolesnick und Krönke, 1998):

**A) saure SMase:** pH 4,5-5; lysomal und in fast allen Geweben präsent, aSMase-Defizienz bei Niemann-Pick'scher Erkrankung Typ 1 und 2, (Lansmann *et al.*, 1996)

**B) saure SMase:** pH 4,5-5; im Serum als sezernierte Form vorkommend, Zn<sup>+</sup>-Abhängigkeit, zuerst im fötalen Rinderserum entdeckt, (Spence *et al.*, 1989)

**C) neutrale SMase:** pH 7,4; zytosolisch lokalisiert, Mg<sup>2+</sup>-Unabhängigkeit, (Okazaki *et al.*, 1994)

**D) neutrale SMase:** pH 7,4; Plasmamembran-gebunden, in vielen Geweben existent [Gehirn, (Neben-) Niere, Leber, Milz u.a.],  $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit, (Liu *et al.*, 1997, erstmalige genaue Charakterisierung durch Bernardo *et al.*, 2000)

**E) alkalische SMase:** pH 9,0; Dünndarm-assoziiert, (Nyberg *et al.*, 1996)

In einer Zelllinie werden neutrale und saure SMasen unterschiedlichen Signalwegen zugeordnet, d.h. daß in Abhängigkeit vom Zelltyp und von der Art des Stimulus entweder die saure oder die neutrale Isoform angesprochen wird (Wiegmann *et al.*, 1994). Die saure SMase (aSMase) wird mit der Ceramid-induzierten Apoptose, hauptsächlich durch TNF- und Fas-Rezeptor-vermittelt, in Verbindung gebracht (Schütze *et al.*, 1992). Dies belegen genetische Modelle: Patienten mit Niemann-Pickscher Erkrankung leiden an erblicher aSMase-Defizienz. Sie reichern bevorzugt im Gehirn, in Leber und Milz Sphingomyelin an. Lymphoblasten dieser Patienten weisen eine defekte apoptotische Antwort auf: Nach  $\gamma$ -Bestrahlung zeigen diese Zellen im Gegensatz zu normalen Lymphoblasten keine Ceramid-Erhöhung und nachfolgend auch keine Apoptose. Transgene aSMase-*knock-out* Mäuse haben im Vergleich zu gesunden Tieren eine verminderte Apoptose-Rate nach äußeren Reizen, wie UV-Strahlen, *reactive oxygen species* (ROS), Hitzeschock bzw. ionisierender Strahlung (Santana *et al.*, 1996). Glykosyliertes Ceramid in Form von komplexen Gangliosiden wird durch spezifische saure Hydrolasen und desweiteren durch Cerebrosidasen zu Ceramid in den Lysosomen abgebaut. Glycosphingolipide als Bestandteile der Plasmamembran erreichen durch Endozytose die lysosomale Membran, werden in das Lysosol abgeschnürt, in welchem die Degradation stattfindet (Sandhoff und Kolter, 1998). Das über diesen Mechanismus gebildete Ceramid scheint im Hinblick auf Signaltransduktionsprozesse nach den bisherigen Erkenntnissen nur im geringen Maße von Bedeutung zu sein. Jedoch findet sich eine Störung der Biodegradation im Rahmen der Glycosphingolipidosen, einer heterogenen Gruppe von erblichen Krankheiten mit verschiedenen Enzymdefekten, die den lysosomalen Abbau von Glycosphingolipiden betreffen. So findet man z.B. bei der Tay-Sachs-Krankheit und der Sandhoff'schen Krankheit Defekte der Hexosaminidase(n), bei der Krabbe'schen Erkrankung einen Defekt der Galactocerebrosidase, bei der Gaucher-Krankheit Glucocerebrosidase-Defizienz und beim Fabry-Syndrom einen Defekt der  $\beta$ -Galactosidase A (Schuette *et al.*, 1999). Fast allen diesen mit verkürzter Lebenserwartung

einhergehenden Erkrankungen ist die Beteiligung des Zentralnervensystems mit mentaler Retardierung gemein sowie je nach Typ eine Beteiligung verschiedener innerer Organe.

### 1.5.2. Verminderung des Ceramid-Spiegels

Durch glykosidische Verknüpfung von Glucose oder Galaktose an die 1-OH-Gruppe des Sphingosinrückgrates entstehen Cerebroside. Werden weitere Zucker angehängt, entstehen die komplexeren Cerebroside bzw. die komplexen Sulfatide oder Ganglioside, welche mindestens einen sauren Zuckeranteil, die *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure), enthalten. Die Kohlenhydratmoleküle werden zumeist als Uridindiphosphat (UDP)-aktivierte Zucker oder Cytidinmonophosphat (CMP)-aktivierte Sialinsäure gekoppelt. Es wird vermutet, daß die Glukosylceramid-Synthase eine entscheidende Rolle bei der Regulation des intrazellulären Ceramid-Spiegels und damit des zellulären Proliferationsverhaltens spielt. Eine besondere Rolle spielt die Glukosylceramid-Synthase in sog. "*Multidrug-resistant*" (MDR)-Tumoren, also Geweben, die auf verschiedenste Chemotherapeutika nicht ansprechen. Therapie-sensitive Zellen reagieren z.B. auf Adriamycin-Gabe mit vermehrter *de novo*-Synthese von Ceramid, welches zur Apoptose führt, wohingegen sich die resistenten Zellen dieser apoptotischen Antwort entziehen. Es konnte gezeigt werden, daß bei der Adriamycin-resistenten Mammakarzinomzelllinie MCF-7-AdrR der Gehalt an Glukosylceramid im Vergleich zu nicht resistenten MCF-7-Zellen erhöht ist (Lavie *et al.*, 1996). Behandlungsmöglichkeiten für diese MDR-Tumoren eröffneten sich, als man mit sog. „Multi Drug Resistance“-Modulatoren wie z.B. Tamoxifen zeigen konnte, daß sie die Glukosylceramid-Synthase hemmen und die Tumor-Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika wiederherstellen (Lucci *et al.*, 1999). Eine neue Substanzgruppe, zu der PDMP, PMMP und PPMP (1-Phenyl-2-*N*-amino-3-Morpholino-1-Propanol) gehören, hat sich ebenfalls als potenter Inhibitor der Glukosylceramid-Synthase erwiesen (Barbour *et al.*, 1992; Radin, 1999).

Ceramid wird nur in geringen Anteilen durch die Ceramid-Kinase, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzym, zu Ceramid-1-Phosphat umgesetzt. Dabei wird nur das durch Sphingomyelin-Hydrolyse generierte und nicht das durch Abbau von Glykosphingolipiden entstandene Ceramid diesem Abbauweg zugeführt (Dressler und Kolesnick, 1990). Ceramid-1-Phosphat wurde in HL-60 Zellen (Dressler und Kolesnick, 1990), in Ratten-Leberzellen (Waggoner *et al.*, 1996) und

Hirngewebe von Ratten (Shinghal *et al.*, 1993) gefunden, wobei weiterhin die reverse Reaktion mittels einer Phosphatase nachgewiesen wurde. Inwieweit jedoch diese Phosphatase und Ceramid-Kinase in die Apoptose-Regulation durch Ceramid involviert sind, ist relativ unklar, da die Funktionen von Ceramid-1-Phosphat noch genauer definiert werden müssen. Den nur wenigen veröffentlichten Untersuchungen zufolge wirkt es im Gegensatz zu Ceramid proliferationsanregend (Gomez-Munoz *et al.*, 1997).

Die Sphingomyelin-Synthase (Phosphatidylcholin-Ceramid-Phosphocholtransferase) überträgt Phosphocholin auf Ceramid, wobei Sphingomyelin und Diacylglycerol (DAG) entstehen (Diringer *et al.*, 1972). Dieses Enzym reguliert somit den Ceramid- und Diacylglycerol-Spiegel gleichzeitig und gegenläufig, wobei sie in ihrer biologischen Funktion in der Zelle auch als Gegenspieler betrachtet werden (Luberto und Hannun, 1999). Es ist eines der bisher am schlechtesten charakterisierten Enzyme im Sphingolipid-Stoffwechsel, und bisher ist seine Rolle im Rahmen der Ceramid-vermittelten Signaltransduktion relativ unklar. In einigen malignen Transformationen, wie *Morris-Hepatomen* und SV40-Transformationen ist eine erhöhte SM-Synthase-Aktivität zu messen (Luberto und Hannun, 1998).

Weiterhin wird Ceramid durch verschiedene Ceramidasen zu Sphingosin (SPH) abgebaut, welches durch die Sphingosin-Kinase zu Sphingosin-1-Phosphat (SPP) verstoffwechselt wird. Letzteres wird durch eine Lyase zu Palmitaldehyd (welches weiter zu Glycerolipiden umgesetzt wird) und Ethanolamin-Phosphat verstoffwechselt. Die Ceramidasen, ihre Aktivatoren und Inhibitoren werden in den weiterführenden Kapiteln eingehend beschrieben.

Einen Überblick über die vielfältigen Stoffwechselwege des Ceramids gibt Abb. 5.

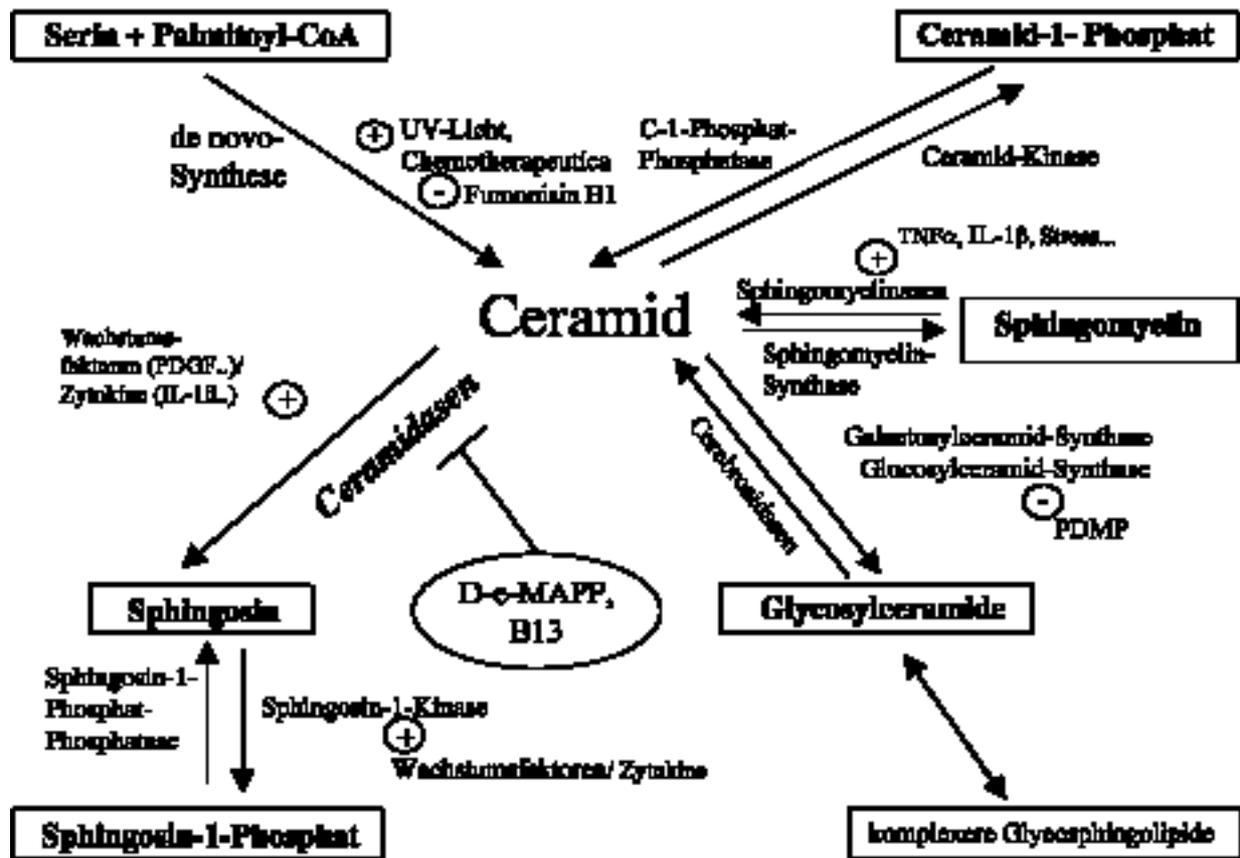


Abb.5. Modulation des intrazellulären Ceramid-Spiegels.

Hier sind die wichtigsten Auf- und Abbauege von Ceramid dargestellt, wobei die Hauptmetabolite schwarz umrandet und die beteiligten Enzyme kursiv gedruckt sind. Die Ceramidase als in dieser Arbeit focussiertes Enzym ist eines der wichtigsten Ceramid-abbauenden Enzyme und regelt intrazellulär das relative Verhältnis zwischen den gegensätzlich wirkenden *second messenger* Ceramid und Sphingosin bzw. Sphingosin-1-Phosphat. Die Enzymaktivität fördernde Faktoren werden mit „+“ gekennzeichnet, hemmende Faktoren werden mit „-“ dargestellt.

## 1.6. Ceramidasen

### 1.6.1. Vorkommen und Isoformen der Ceramidase

Das Enzym Ceramidase (*N*-Acylsphingosin-Deacylase; EC 3.5.1.23) hydrolysiert Ceramid zu Sphingosin und freier Fettsäure. Die Ceramidase nimmt eine Schlüsselrolle in der Modulation der Botenstoffe Ceramid und Sphingosin (SPH) und dessen Metabolit Sphingosin-1-Phosphat

(SPP) ein. Sphingosin und sein phosphoryliertes Produkt SPP entstehen nie über eine *de novo*-Synthese, sondern werden immer aus Ceramid generiert, welches häufig gegensätzliche intrazelluläre Funktionen bewirkt. Somit spielt das Enzym Ceramidase eine große Rolle in der Modulation des Ceramid- und SPH/SPP-Gleichgewichtes. Trotzdem ist noch vieles in bezug auf ihre biochemische Regulation und ihre Rolle in zellulären Signaltransduktionswegen unklar. Es werden drei Ceramidase-Isoformen bezüglich ihres katalytischen pH-Optimums unterschieden, bekannt als saure, neutrale und alkalische Ceramidasen (Hassler und Bell, 1993).

Die am besten identifizierte Isoform ist die saure Ceramidase, die auch als erste in Rattenhirn gefunden (Gatt, 1963), aus menschlichem Urin isoliert (Bernardo *et al.*, 1995), molekular charakterisiert und aus humanen Fibroblasten kloniert wurde (Koch *et al.*, 1996). Kürzlich wurde die genaue Genstruktur sowohl der murinen sauren Ceramidase als auch der humanen sauren Ceramidase und die chromosomale Position der letzteren (Chromosom 8; 8p21,3-8p22) charakterisiert (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). Die saure Ceramidase wurde als ubiquitär vorkommend beschrieben (Rattenhirn,-leber,-niere,-milz und menschliches Gehirn, Niere, Milz, Plazenta, Leukozyten, Fibroblasten). Die saure Isoform hat ein pH-Optimum von 4,5-5 (Sugita *et al.*, 1975) und wird als lysosomales Enzym dargestellt (Chen *et al.*, 1981). In den Lysosomen ist sie für den enzymatischen Abbau von Ceramid verantwortlich, welches durch die saure Sphingomyelinase und andere Hydrolasen freigesetzt wird. Innerhalb des Sphingolipidstoffwechsels wurde ihre hauptsächliche Rolle bislang im Katabolismus von Sphingolipid-haltigen Membranen gesehen. Die seltene, erbliche Farber-Krankheit, auch Lipogranulomatose genannt, ist durch eine verminderte bis fehlende Aktivität der sauren Ceramidase in den Lysosomen charakterisiert (Sugita *et al.*, 1972). Exzessive Ceramidansammlungen in vielen Organen, wie Leber, Niere, Milz, Gehirn und Haut, erklären die klinischen Symptome von gelenksnah subkutan auftretenden Knoten, Hepatosplenomegalie bis zu zentralnervöser Beteiligung und verkürzter Lebenszeit. Das lysosomale Anreichern spezifisch nur von Ceramiden mit Hydroxy-Fettsäuren (aus Cerebrosiden und Sulfatiden) weist auf die Substratspezifität der sauren Isoform hin. Es wurden kürzlich drei der die bisher unheilbare Farber-Krankheit auslösenden Genmutationen detektiert (Li *et al.*, 1999).

Alkalische Isoformen wurden bisher in Rattenhirn, -niere und -leber, tierischer Epidermis und Darm, humanen Fibroblasten und Gehirn nachgewiesen (Hassler und Bell, 1993, Spence *et al.*,

1986). Es wurde sowohl mikrosomale (Stoffel *et al.*, 1980) als auch Plasmamembran-gebundene Aktivität des bei einem pH-Optimum von pH 8-9 arbeitenden Enzyms beschrieben (Yada *et al.*, 1995). Die erste klonierte Form war die des Prokaryoten *Pseudomonas aeruginosa* (Okino *et al.*, 1998), wenig später wurden in *Saccharomyces cerevisiae* zwei verschiedene, eukaryotische alkalische Ceramidasen charakterisiert und kloniert (Mao *et al.*, 2000 a, b). Kürzlich wurde die erste humane neutral/basische Ceramidase aus Nierengewebe charakterisiert und kloniert, die in den Mitochondrien lokalisiert ist (El Bawab *et al.*, 2000). Mittels Proteinsequenz-Analysen ist eine Konservierung dieses Enzyms in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren zu beobachten.

Als Modulator des zytosolischen Ceramid-Sphingosin-Gleichgewichts wird vermutet, daß die alkalische Ceramidase in den zellulären Signaltransduktionswegen eine vermittelnde Rolle spielen könnte. Anlaß zu dieser Vermutung gab die Aktivierung dieser Isoform durch Zytokine, wie TNF , IL1 (Nikolova-Karakashian *et al.*, 1997) und Wachstumsfaktoren, wie platelet derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) und epidermal growth factor (EGF), (Coroneus *et al.*, 1995).

Die neutrale Isoform ist am wenigsten charakterisiert worden. Sie wurde in Plasmamembranen und Mikrosomen von Rattenleber (Slife *et al.*, 1989; Stoffel *et al.*, 1980), Dünndarm (Nilsson, 1969) und Epithelien gefunden. Manche Autoren stellen sie nicht als von der alkalischen Form getrennt dar, wegen der organabhängigen, z.T. nicht klar abzugrenzenden pH-Optima (Nikolova-Karakashian und Merrill, 2000; Luberto und Hannun, 1999). So wurde eine über einen breiten pH-Bereich von pH 7-10 aktive Ceramidase in Rattenhirn gefunden, die somit nicht eindeutig in eine der beiden Klassen einzuordnen war (El Bawab *et al.*, 1999). Möglicherweise könnte die Substratspezifität der Isoformen in bezug auf sehr kurz- oder langkettige (C<sub>2</sub>-oder C<sub>16</sub>-) Ceramide in Zukunft bei der Unterscheidung nützlich sein.

### 1.6.2. Ceramidase-Inhibitoren

*N*-Oleoylethanolamin wurde als gut wirksamer Inhibitor der sauren Ceramidase beschrieben, Saposin D wurde als Inhibitor der alkalischen Isoform und Aktivator der sauren Isoform charakterisiert (Sugita *et al.*, 1975; Azuma *et al.*, 1994). Unlängst wurde der Einfluß zweier neuartiger Substanzen auf das Zellwachstum und den Ceramid-Stoffwechsel in der humanen promyelocytischen Leukämie-Zelllinie HL-60 untersucht (Bielawska *et al.*, 1996). Die beiden synthetischen Analoga (1S,2R)-*D*-erythro-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol (*D*-e-MAPP) und das Enantiomer (1R,2S)-*L*-erythro-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol (*L*-e-MAPP) leiten sich vom *N*-acylierten Phenylaminopropanol ab. Dabei zeigte *D*-e-MAPP eine konzentrations- und zeitabhängige Wachstumshemmung der Zellen, die sich als Verbleiben der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus darstellte, wie man dies auch als Folge von exogen eingesetztem Ceramid beobachtete. Das Stereoisomer (Enantiomer) *L*-e-MAPP zeigte keinen derartigen Effekt. Weil *D*-e-MAPP eine stereochemisch gegensätzliche Konfiguration zu (natürlichem) *D*-e-Ceramid aufweist und nicht zur Aktivierung der Ceramid-aktivierten Protein-Phosphatase (CAPP) führt, vermutete man, dass es sich bei dieser Substanzgruppe nicht um direkte Ceramid-Analoga handelt, sondern eine indirekte Wirkung auf der Modulation des endogenen Ceramid-Pools basieren könnte. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten einen konzentrations- und zeitabhängigen intrazellulären Ceramid-Anstieg durch *D*-e-MAPP. Letzterer wurde als Folge der signifikanten Hemmung der alkalischen Ceramidase (pH 9,0) durch *D*-e-MAPP nachgewiesen, die minimale Hemmung der sauren Ceramidase (pH 4,5) schien somit für die Ceramid-vermittelte Wachstumshemmung in HL-60 Zellen von untergeordneter Bedeutung zu sein. *L*-e-MAPP war ohne Einfluß auf beide Ceramidase-Isoformen, metabolische Studien zeigten im Gegensatz zu dem kaum verstoffwechselten *D*-e-MAPP den Abbau von *L*-e-MAPP mittels alkalischer Ceramidase.

Kürzlich konnte die apoptotische Wirkung sowohl von Ceramid-Analoga als auch eines neueren Ceramidase-Inhibitoren *D*-NMAPPD (B13) in metastatischen Colon-Karzinomen nachgewiesen werden, wobei intrazellulärer Ceramidanstieg von Cytochrom *c*-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung gefolgt wurde (Selzner *et al.*, 2001).

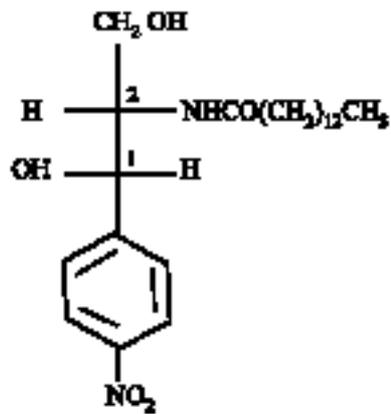
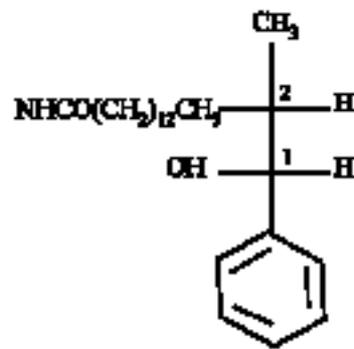
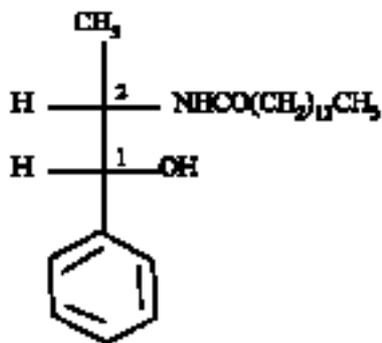
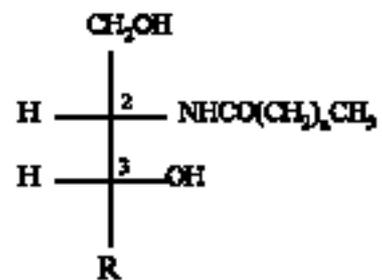
## 1.7. Fragestellung der Arbeit

Für viele gutartige als auch bösartige (Haut-)Erkrankungen scheint eine außer Kontrolle geratene Steuerung von Apoptose und Proliferation pathogenetisch bedeutsam zu sein. In diesem Gleichgewicht zwischen Wachstum einerseits und Zelluntergang andererseits nimmt das Signalmolekül Ceramid wie bereits erläutert eine Schlüsselrolle ein. Inhalt jüngster Untersuchungen ist es, nach Eingriffsmöglichkeiten in den Ceramid-Stoffwechsel und der am Stoffwechsel beteiligten Enzyme zu suchen, um somit Behandlungsoptionen in der Therapie von z.B. hyperproliferativen oder bösartigen Erkrankungen zu finden.

Ziel dieser Arbeit in diesem Zusammenhang ist es, die Wirkung von D -und L-e-MAPP, sowie eines neueren synthetisierten Analogons B13 (D-NMAPPD) auf das Wachstum und das Apoptose-Verhalten der humanen immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie HaCaT zu untersuchen. Dabei soll geklärt werden, ob sich die kürzlich erworbenen Erkenntnisse bezüglich Vorkommens und spezifischer Hemmbarkeit verschiedener Ceramidase-Formen in diesem Zelltyp im Vergleich zu HL-60 Zellen übertragen lassen. Ferner soll die Abhängigkeit der biologischen Aktivität dieser Substanzen von ihrer Stereospezifität bestimmt werden.

Es wird weiterhin versucht, den Zusammenhang zwischen möglicher Ceramidase-Inhibition, quantitativem Ceramid-Nachweis und biologischer Antwort (Proliferationshemmung, Induktion des programmierten Zelltodes) herzustellen. Somit wäre vielleicht neben synthetischen, kurzkettigen Ceramiden und Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga (wie Tacalcitol und Calcipotriol) eine andere Substanzklasse existent, mittels der sich neue topische Behandlungsalternativen in der Dermatologie eröffnen könnten.

Die Struktur beider Substanzen und eines neueren Phenylaminoalkohols zeigt Abb.6.

**B 13 [(1R,2R)-D-NMAPPD]****(1S,2R) D-e-MAPP****(1R,2S) L-e-MAPP****D-e-Ceramid****Abb.6. Chemische Struktur der Phenylaminopropanol-Abkömmlinge.**

Fischer-Projektion von D-e-MAPP, L-e-MAPP (D- bzw. L-*erythro*-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol und B13 [D-*threo*-2-(*N*-Myristoylamino)-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol] sind. Zur vergleichenden Betrachtung ist auch D-e-Ceramid dargestellt.