

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie  
des Universitätsklinikums Benjamin Franklin  
(Leiter: Prof. Dr. Prof. h.c. C. E. Orfanos)  
am Fachbereich Humanmedizin  
und dem  
Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
(Leiter: Prof. Dr. M. F. G. Schmidt)  
der Freien Universität Berlin

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1  
bei der Ceramid-induzierten Apoptose  
in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT**

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

vorgelegt von  
ARNIM STOOSS  
Tierarzt aus Ulm

Berlin 1999

Journal-Nr. 2316

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt  
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Dr. C. C. Geilen

Tag der Promotion: 31. August 1999

**Für Jana**

## INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1	Apoptose.....	3
1.2	Apoptose in Keratinozyten .....	6
1.3	Signaltransduktion der Apoptose .....	7
1.3.1	Todesrezeptoren .....	8
1.3.2	<i>bcl-2</i> -Familie .....	8
1.3.3	Caspasen.....	10
1.3.3.1	Substrate der Caspasen .....	11
1.3.4	<i>p53</i> .....	12
1.3.5	<i>c-myc</i> .....	12
1.3.6	Ceramid-vermittelter Signalweg .....	13
1.3.6.1	Regulation des intrazellulären Ceramidpools.....	18
1.3.6.2	Rolle von Ceramid in der Haut.....	18
1.3.7	Der Transkriptionsfaktor AP-1.....	19
1.3.7.1	Regulationsmechanismen der AP-1-Aktivität .....	21
1.3.7.2	Biologische Wirkung von AP-1 .....	22
1.3.7.3	Bedeutung von AP-1 in der Epidermis.....	23
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material</b> .....	<b>25</b>
3.1	Geräte .....	25
3.2	Zelllinie .....	26
3.3	Bakterienstämme.....	26
3.4	Chemikalien .....	26
3.5	Plasmide .....	26
3.6	Primer .....	27
3.7	Zellkulturmaterialien.....	27
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>28</b>
4.1	Zellkultur .....	28
4.1.1	Zellkulturmedien.....	28
4.1.2	Kultivieren der Zellen .....	28
4.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	29
4.2	Bestimmung der Proliferation.....	30
4.2.1	Zellzahlbestimmung mit Kristallviolett.....	30
4.3	Bestimmung der Zytotoxizität.....	31
4.4	Messung des apoptotischen Zelltodes mittels eines Sandwich-ELISA.....	32
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	33

4.5.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen .....	34
4.5.2	Anzucht transformierter <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen .....	35
4.5.3	Einfrieren und Auftauen von <i>Escherichia coli</i> Kulturen .....	35
4.5.4	Isolierung von Nukleinsäuren .....	36
4.5.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen .....	36
4.5.4.2	Plasmidpräparation im Großmaßstab.....	37
4.5.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	39
4.5.6	Agarosegel-Elektrophorese.....	39
4.5.7	Auswertung von Agarosegelen .....	40
4.5.8	Transfektion von HaCaT-Zellen.....	41
4.5.9	Messung der Transaktivierungsaktivität des Aktivatorproteins-1 .....	41
4.5.10	Enzymkatalysierte Reaktionen .....	43
4.5.10.1	Restriktion der DNA .....	43
4.5.10.2	Synthese von komplementärer DNA (cDNA).....	44
4.5.10.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	46
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
5.1.1	Effekt von C <sub>2</sub> -Ceramid auf die Proliferation von HaCaT-Zellen .....	49
5.1.2	Effekt von C <sub>2</sub> -Dihydroceramid auf die Proliferation von HaCaT-Zellen.....	51
5.2	Zytotoxizität von C <sub>2</sub> -Ceramid auf HaCaT-Zellen .....	52
5.3	Apoptose-Messungen .....	53
5.4	Etablierung einer Methode zur Bestimmung C <sub>2</sub> -Ceramid-induzierter .....	55
	Genexpressionsänderungen .....	
5.5	Untersuchung der Expression Apoptose-assoziiierter .....	
	Gene auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in HaCaT-Zellen .....	57
5.6	Untersuchung der C <sub>2</sub> -Ceramid-vermittelten Induktion.....	
	des Transkriptionsfaktors AP-1.....	63
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
6.1	Wirkung von C <sub>2</sub> -Ceramid auf Zellwachstum und Apoptose .....	68
6.2.1	Wirkung von C <sub>2</sub> -Ceramid auf Apoptose-assoziierte Gene.....	71
6.2.2	Wirkung von C <sub>2</sub> -Ceramid auf die Expression von AP-1 .....	73
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Summary</b> .....	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>85</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>99</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>100</b>
	<b>Selbständigkeitsversicherung</b> .....	<b>101</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Apoptose

Für die meisten Organismen hat der Zelltod einen lebensrettenden Aspekt und ist mindestens genauso wichtig wie Zellteilung und Wachstum. Man unterscheidet zwei Formen von Zelltod: Apoptose und Nekrose. Der Zelltod durch Apoptose kommt in allen Vielzellern vor und erfüllt physiologische Aufgaben. Es erfolgt eine Eliminierung einzelner Zellen, die (i) keine Funktion haben, (ii) im Überschuß gebildet werden, (iii) sich falsch entwickeln (iv) bereits ihre Lebensspanne beendet haben oder (v) schädlich sind, und (vi) bei der Produktion von toten Zellen für spezifische Funktionen (z.B. Verhornung der Hautzellen und Zellen der Linse) [Ellis et al., 1991a; Fesus et al., 1991]. Auf diese Weise kommt der Apoptose eine wichtige Aufgabe während der Embryogenese bei dem Umbau von Organen durch die Entfernung bestimmter Zellen (Morphogenese) und der Metamorphose [Wyllie et al., 1980] zu. Erst später erkannte man, daß sie auch im reifen Organismus beim Umsatz von normalem Gewebe, bei der Atrophie hormonabhängiger Gewebe, bei der Aufrechterhaltung eines funktionierenden Immunsystems und der Tumorregression eine wichtige Funktion erfüllt.

Während die Apoptose sowohl bei krankhaften als auch bei gesunden Organismen eine Rolle spielen kann, ist die Nekrose immer pathologisch und die Folge von starken und akuten, irreparablen Verletzungen. Hierzu zählen z.B. abrupte Anoxie, plötzliche Knappheit an Nährstoffen wie Glukose oder extreme physiochemikalische Verletzungen (Hitze, Detergenzien, starke Basen etc.) [Hirsch et al., 1997].

### Was bedeutet Apoptose ?

Die Grundlage dieser Erkenntnisse war die Beschreibung einer morphologisch definierten Form des Zelltodes [Kerr et al., 1972], die die Autoren nach dem griechischen Wort für „herabfallen“ in Anlehnung an den herbstlichen Laubabwurf „Apoptose“ nannten. Dieser Vorgang ließ sich durch seinen geordneten Ablauf und die fehlenden entzündlichen Umgebungsreaktionen von der nekrotischen Form des Zellunterganges unterscheiden. Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben eine charakteristische Abfolge der Ereignisse: Schrumpfung des Chromatins entlang der nukleären Membran begleitet von Schrumpfung der Zelle und Entstehung von Protuberanzen an der Plasmamembran (sog. „membrane blebbing“), spezifische internukleosomale Fragmentierung der DNA und schließlich Auflösung der Zelle in einzelne, membranumhüllte Fragmente, die *apoptotic bodies*, mit Phagozytose durch umgebende Makrophagen oder benachbarte Zellen [Kerr et al., 1994; Majno und Joris, 1995]. Geringfügige Veränderungen in der Plasmamembran vollziehen sich bereits bevor es zu einer Ruptur der Plasmamembran kommt. Die Exposition von Phosphatidylserinresten auf der Zelloberfläche (normalerweise an der zytosolischen Seite der Plasmamembran) erlaubt die Erkennung und Eliminierung apoptotischer Zellen durch Makrophagen oder benachbarte Zellen, bevor es zum Verlust der Membranintegrität mit

anschließender Freisetzung von Zellinhalt in den Interzellularraum kommt und vermeidet dadurch entzündliche Reaktionen [Savill, 1996]. Die Mitochondrien zeigen keine größeren ultrastrukturelle Abnormalitäten im Zuge der Apoptose [Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980].

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zu keinem regelmäßigen Abbau, weder von DNA noch von Proteinen, aber infolge einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran zu einer Schwellung des Zytoplasmas (Onkosis) und der mitochondrialen Matrix, welche kurz vor dem Platzen der Zellmembran auftritt [Mehendale, 1994].

Der trotz unterschiedlicher Zellsysteme stereotype Ablauf der Apoptose, der die aktive Beteiligung der Zelle zu erfordern erscheint, legte die Interpretation der Apoptose als „Suizid“ im Gegensatz zum passiven „Unfalltod“ der Nekrose nahe. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zur Nekrose liegt in der bis zur letzten Phase erhaltenen Membranintegrität mit intakter Funktion als Permeabilitätsschranke.

Die wichtigsten Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose hinsichtlich ihrer Morphologie, Biochemie und Physiologie sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

<b>Apoptose</b>	<b>Nekrose</b>
<b>Morphologische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intakte Membran</li> <li>• Zellschrumpfung</li>   <li>• Chromatinkondensation (Pyknose)</li> <li>• <i>apoptotic bodies</i></li> <li>• Erhalt der Organellen</li>   <li>• Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen/Basalmembran</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Membranintegrität</li> <li>• Schwellung des Zytoplasmas (Onkose) Schwellung der Mitochondrien</li>   <li>• Auflockerung des Chromatins</li> <li>• Keine Vesikelformation, komplette Lyse</li> <li>• Zerstörung der Zellstruktur (Organellen schwellen und lysieren)</li>   <li>• Adhäsion zwischen den Zellen und zur Basalmembran bleibt bestehen</li> </ul>
<b>Physikalische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genau regulierter Prozeß von Enzymfunktionen</li> <li>• Energie(ATP)-abhängig</li> <li>• Internukleosomale DNA-Fragmentierung</li> <li>• Prälytische DNA-Fragmentierung (Frühes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Regulation der Ionenhomöostase</li> <li>• Keine Energie erforderlich</li> <li>• DNA-Fragmentierung an zufälliger Stelle (Karyolysis)</li> <li>• Postlytische DNA-Fragmentierung (Spätes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>
<b>Biochemische Merkmale</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gezielte Eliminierung von einzelnen Zellen</li> <li>• Zelltod durch physiologische Stimuli induziert</li> <li>• Phagozytose durch Makrophagen oder benachbarte Zellen ohne Entzündungsreaktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tod von Zellgruppen</li> <li>• Zelltod durch unphysiologische Einflüsse hervorgerufen</li> <li>• Freisetzung lysosomaler Enzyme mit konsekutiver Leukotaxie und Entzündungsreaktion</li> </ul>

**Tab. 1** *Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose*

In der Literatur werden die Begriffe Apoptose und „programmierter Zelltod“ (PCD=*programmed cell death*) oft synonym gebraucht. Die Bezeichnung PCD wird für jede Form des Zelltodes, der ein genetisches Programm durchläuft, benutzt, unabhängig vom Auslösersignal. Apoptose ist der ablaufende Prozeß an sich, der jederzeit durch externe Stimuli eingeleitet werden kann, und bezieht sich in erster Linie auf die Morphologie der sterbenden Zelle [Jacobson et al., 1997]. Die Natur der Stimuli ist dabei Zelltyp-abhängig. In der vorliegenden Arbeit werden beide Begriffe synonym gebraucht.

Wurde noch vor 10 Jahren der Apoptose wenig Beachtung geschenkt, so hat sich dies geändert, als sie mit verschiedenen Autoimmunkrankheiten, degenerativen Erkrankungen, Krebs und der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS in Verbindung gebracht wurde [Carson und Ribeiro, 1993]. In diesem Zusammenhang sind auch in der Tiermedizin inzwischen Krankheiten wie z.B. das Feline erworbene Immundefizienzsyndrom sowie die Keratokonjunktivis sicca und ihre therapeutische Beeinflussung durch Immunsuppressiva beschrieben [Gao et al., 1998; Mortola et al., 1998]. Man hat festgestellt, daß die Balance zwischen Proliferation und Apoptose bei diesen Krankheiten gestört ist und macht sich heutzutage die Erkenntnisse auf diesem Gebiet zunutze, um Therapieformen zu entwickeln, die auf die Behandlung der dysregulierten Apoptose abzielen.

Obwohl über die Apoptose sehr viel geforscht wurde, stellen die bisher veröffentlichten Arbeiten im weitesten Sinne nur Bruchstücke dar, die noch zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden müssen.

Einen großen Beitrag bei der Aufstellung eines theoretischen Grundgerüsts, das für den apoptotischen Prozeß auch in Vertebraten Allgemeingültigkeit besitzt, haben Apoptosestudien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* geleistet. Genetische Analysen während der Entwicklung dieses Wurms machten es möglich, wichtige Ereignisse im Verlauf des programmierten Zelltodes zu identifizieren. Man hat herausgefunden, daß während seiner Embryogenese eine definierte Anzahl von 131 Zellen in Apoptose gehen [Ellis et al., 1991b]. Die Reproduzierbarkeit dieses programmierten Zelltodes genauso wie die mögliche Vorhersage von Teilung und Differenzierung von Zellen machen die starke molekulare Kontrolle von Zelltod und Proliferation deutlich.

Inzwischen wurden drei Gene entdeckt, die entscheidend für den geregelten Ablauf des programmierten Zelltodes bei *Caenorhabditis elegans* sind. Hierzu zählen die Gene *ced* (cell death gene)-3, *ced-4* und *ced-9*. *Ced-3* und *ced-4* wirken pro- und *ced-9* anti-apoptotisch [Fesus, 1993].

Die zunächst entdeckten ICE (Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme)-ähnlichen Proteasen [Yang und Korsmeyer, 1996; Alnemri, 1997] wurden später in Caspasen umbenannt [Alnemri et al., 1996]. Auch die *bcl-2*-Familie wurde, obwohl bereits im Zusammenhang mit dem folliculären Lymphom bekannt, auf diesem Weg dem apoptotischen Zelltod zugeordnet [Cleary et al., 1986].



## 1.2 Apoptose in Keratinozyten

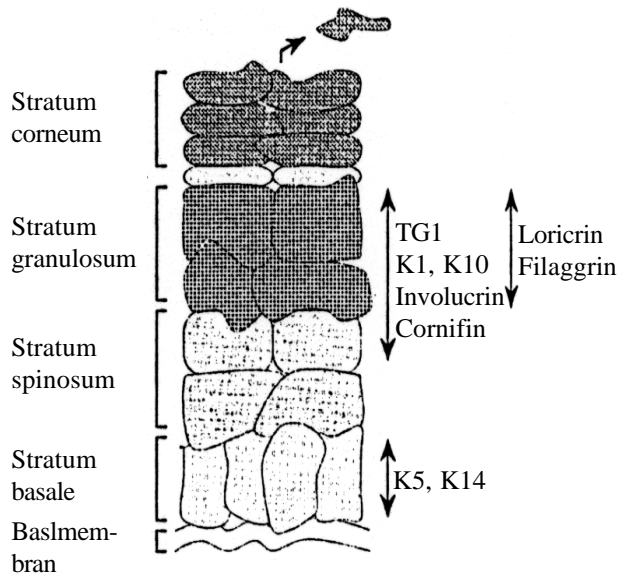
Es gibt verschiedene Hautkrankheiten, wie Lichen ruber planus, systemischer Lupus erythematodes (SLE), Alopecia areata und Psoriasis vulgaris, die ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellwachstum aufweisen. In der Epidermis tritt Apoptose histopathologisch in Form von sogenannten *Civatte bodies*, *dark cells*, *sunburn cells* und *colloid bodies* auf [Haake und Polakowska, 1993]. Die deskriptiven Begriffe wurden benutzt, bevor man diese Erscheinungen mit der Apoptose in Verbindung bringen konnte. *Civatte bodies* wurden eosinophile, basale Keratinozyten genannt, die ein geschrumpftes Aussehen haben, welche charakteristisch für Lichen ruber planus sind. Sonnenbrandzellen sind meistens basale oder suprabasale Keratinozyten, die, verursacht durch UV-Licht, apoptotisch sind. *Colloid bodies*, auch *keratin bodies* genannt, sind apoptotische, von der Basalmembran umgebene Zellfragmente, die aufgrund ihrer rigiden Membranstruktur nicht phagozytiert werden konnten.

Ein basaler Keratinozyt braucht normalerweise ca. vier Wochen bis er die oberste Schicht der Epidermis erreicht (s. Abb. 1). Die letzte Keratinozytenschicht, das *Stratum corneum*, wird durch Schuppung abgetragen, so daß ständig neue Zellen nachkommen können. Das *Stratum corneum* besitzt keine Zellkerne mehr. Die Zellen verlieren auf ihrem Weg in die vorletzte Schicht, im *Stratum granulosum*, ihre Zellkerne. Hierbei sind die Zellen terminal ausdifferenziert. Lange Zeit konnte man sich nicht einigen, ob Keratinozyten Apoptose eingehen oder nicht. Gegenwärtig wird allgemein angenommen, daß die terminale Differenzierung eine weiterentwickelte, komplexere Form der Apoptose ist und die Keratinozyten auf dem Weg der terminalen Differenzierung eine Form des programmierten Zelltodes durchlaufen. Dabei reguliert die Apoptose vergleichbar zu anderen Geweben die Gewebemöostase der sich entwickelnden und erneuernden Haut und wird hauptsächlich in den basalen Hautschichten beobachtet. Dort tritt sie auch infolge einer Zellschädigung auf. In den obersten Schichten dagegen stirbt die Zelle, nachdem sie terminal ausdifferenziert ist und bekommt dadurch schließlich ihre eigentliche Barrierefunktion.

Die Zellen der Epidermis besitzen nur eine für die Apoptose wenig typische Morphologie. Sie bilden viel weniger *apoptotic bodies*, höchstwahrscheinlich deswegen, weil ihre Membranstruktur durch die verhornte Proteinhülle (*cornified envelope*) starrer ist [Raskin, 1997]. McCall und Cohen konnten jedoch an primären Mäusekeratinozyten zeigen, daß die ausgestoßenen Kerne bzw. die Zellen im *Stratum granulosum* deutliche DNA-Fragmentierungen zeigen, die im *Stratum basale* nicht zu detektieren sind [McCall und Cohen, 1991]. Nur in den basalen Keratinozyten der normalen humanen Epidermis, die eine Art Stammzellen darstellen, wird das anti-apoptotische Bcl-2-Protein exprimiert [Bianchi et al., 1994]. Während der terminalen Differenzierung geht die Bcl-2-Expression verloren, d.h. die Zelle wird empfänglicher für apoptotische Signale.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß die terminale Differenzierung der Keratinozyten eine Art Apoptose ist, ist die Expression und Aktivierung der Transglutaminase, welche Proteine zum

*cornified envelope* vernetzt. Es konnte gezeigt werden, daß allein die Überexpression dieses Enzyms die Zellen dazu veranlaßt, eine apoptotische Morphologie zu zeigen [Fesus, 1993].



**Abb. 1 Differenzierung von epidermalen Keratinozyten**

Die Keratinozyten exprimieren bei ihrer Wanderung von den basalen zu den oberflächlichen verhornenden Schichten der Haut verschiedene für das jeweilige Differenzierungsstadium typische Markerproteine. Die Expression der Markerproteine ist dabei auf definierte Abschnitte der Epidermis beschränkt. (TG1, Transglutaminase 1; K1, Keratin 1; K5, K6, K14 entsprechende Keratine)

### 1.3 Signaltransduktion in der Apoptose

Der Untergang von Zellen unter physiologischen Bedingungen ist keine zufällige Kette von Ereignissen, sondern stellt einen geregelten Prozeß unter strikter molekularer Kontrolle dar. Die Aktivierung der am Zelltod beteiligten Mediatoren folgt einem festgelegten Programm und es ist heute allgemein anerkannt, daß dafür eine Kaskade von Genen exprimiert und eine Reihe von katabolischen Enzymen aktiviert werden müssen, damit eine Zelle stirbt. Sowohl die Sensitivität einer Zelle gegenüber einem zelltodinduzierenden Stimulus als auch der Ablauf des Zelltodprogrammes unterliegen einer komplexen genetischen Steuerung, die sich im Laufe der Evolution in einer zell- und gewebetypischen Weise verändert hat. Diese Steuerung erfolgt komplementär zum entgegengesetzten Prozeß der Proliferation, wobei eine Reihe von Genen an der Regulation beider Vorgänge beteiligt sind.

Durch das immer stärker werdende Engagement in der Apoptoseforschung der letzten Jahre wird der Versuch, ein einheitliches Bild über die Ausführung und Regulation von Apoptose zu erstellen, nicht einfacher. Teil des Problems dabei ist, daß sehr viele unterschiedliche Faktoren (z.B. Onkoproteine, Tumorsuppressorproteine, Wachstumsfaktoren, etc.) fähig sind, Apoptose zu induzieren, die gleichen Faktoren jedoch Apoptose scheinbar auch supprimieren können.

Die Apoptose kann schematisch in die Initiationsphase, die Effektorphase und die Exekutionsphase eingeteilt werden [Kroemer et al., 1997]. In jeder dieser Phasen werden ganz bestimmte Proteine aktiviert bzw. deaktiviert. Wird ein bestimmter Punkt der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle überschritten, ist die Apoptose nicht mehr rückgängig zu machen. Dieser Punkt liegt, obwohl bis zu einem gewissen Grad zelltypisch, meistens in der Effektorphase. Innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen ist die Initiationsphase, auch

*private pathway* genannt, die variabelste Phase, gefolgt von der Effektorphase. Letztere läuft am Zelltyp-unabhängigsten ab. Eine Reihe von Studien belegen, daß Ceramid in einer oder mehreren Phasen der Apoptose eine wichtige Funktion einnimmt.

Im Folgenden soll auf einige Moleküle und Gene bzw. Genprodukte eingegangen werden, die bei der molekularen Regulation der Apoptose eine zentrale Rolle spielen und im Rahmen dieser Arbeit von Relevanz sind.

### 1.3.1 Todesrezeptoren

Viele zelluläre Antworten wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose werden durch extrazelluläre Signale (Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Umweltstress etc.) über spezielle Zelloberflächenrezeptoren vermittelt.

Ein relativ gut beschriebener Signalweg ist der, der über das Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor I/Fas-System eingeleitet wird [Nagata, 1997]. Fas-Rezeptor (Apo-1/CD95) und TNF-Rezeptor I werden auch Todesrezeptoren genannt, weil sie einen direkten Zugang zur Apoptose-Maschinerie (Caspasen-Kaskade) haben [Ashkenazi und Dixit, 1998]. Diese Rezeptoren gehören mit einigen weiteren Rezeptoren (auf die hier nicht eingegangen wird) zur Tumornekrosefaktor-Superfamilie, die über ihre Cystein-reiche extrazelluläre Domäne und die homologe zytoplasmatische Domäne, die auch „Todesdomäne“ (*death domain*) genannt wird, definiert werden [Fraser und Evan, 1996]. Sie heißt deswegen Todesdomäne, weil ihre Deletion zum Verlust der Induktion der Apoptose führt. Die oben genannten Rezeptoren werden nach Aktivierung durch ihre homotrimeren Liganden TNF $\alpha$  bzw. Fas Liganden oligomerisiert und können so Adapterproteine an die Todesdomäne ihres zytoplasmatischen Anteils binden. Die Adapterproteine binden u.a. Initiations-Caspasen und bewirken dadurch deren Aktivierung und die Signalweiterleitung vom Rezeptor in die Zelle. Die Bildung von Ceramid im sogenannten Sphingomyelin-Zyklus ist wahrscheinlich stromabwärts der Adapterproteine und stromaufwärts der Effektor-Caspasen lokalisiert. [Chinnaiyan et al., 1996]. Während bei TNF-Rezeptor I die Beteiligung von Ceramid als *Second Messenger* in der Signalweiterleitung als gesichert gilt, wird diese bei Fas zunehmend in Frage gestellt [Nagata, 1997; Sillence und Allan, 1997; Hsu et al., 1998]. Eine schematische Übersicht über die Signalwege wie sie im Rahmen der Apoptose über einen Rezeptor verlaufen, ist am Beispiel des TNF-Rezeptors in Abb. 5 dargestellt.

### 1.3.2 Bcl-2-Familie

Das *bcl-2*-Gen wurde als Onkogen 1985 durch genetische Analysen der chromosomalen Translokation, die charakteristisch für humane folliculäre Lymphome ist, entdeckt und ein

Jahr später kloniert [Cleary et al., 1986]. Das Besondere an diesem Onkogen ist, daß seine Fehlregulation nicht zu einem gesteigerten Zellwachstum führt, sondern den Zelltod unterdrückt und somit das Überleben der Zelle fördert [Yang und Korsmeyer, 1996]. Innerhalb der Zelle ist Bcl-2 an der zytosolischen Seite der äußeren mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und an der Kernmembran lokalisiert. Wahrscheinlich ist es für die Membranintegrität durch Modulation des Ein- und Austritts von kleinen Molekülen und Proteinen verantwortlich [Yang und Korsmeyer, 1996]. Später wurden viele Gene bzw. Proteine gefunden, die große Ähnlichkeiten zu Bcl-2 zeigen. Man faßte sie als Bcl-2-Familie zusammen. Die einzelnen Mitglieder, die man bisher in Säugetieren und in *C. elegans* identifiziert hat, sind in Tabelle 2 aufgelistet [Newton und Strasser, 1998]. Die strukturelle Gemeinsamkeit besteht darin, daß alle Mitglieder mindestens eine der vier konservierten Motive, die unter dem Namen Bcl-2 Homologie-Domäne (BH1, BH2, BH3 und BH4) bekannt sind, besitzen. Im Zusammenhang mit der Apoptose werden die Proteine in zwei Untergruppen eingeteilt. Eine Gruppe fördert die Apoptose, die andere wirkt dieser entgegen. Allgemein kann man sagen, daß die anti-apoptotisch wirkenden Proteine mindestens die BH1 und BH2 Domäne besitzen. Die BH3 Domäne ist unerlässlich für die Funktion der pro-apoptotischen Proteine. Die Proteine der Bcl-2-Familie gehen bevorzugt Dimere ein, deren Bildung über die Domänen BH1-BH3 geschieht [Kroemer, 1997]. Es können sowohl Homo- als auch Heterodimere untereinander gebildet werden, wobei die Gewichtung auf Letzteren liegt und die Art der Dimerbildung über ihre letztendliche Funktion entscheidet. Ein favorisiertes Modell, das die Funktion der Heterodimere voraussagt, ist das Gleichgewichts-(Rheostat)-Modell [Yang und Korsmeyer, 1996]. Hierbei ist das Verhältnis von Apoptose-Promotoren und -Inhibitoren in einer Zelllinie entscheidend für die Art der Umsetzung des an die Zelle kommenden Signals. Liegen in der gegebenen Zelle zum Beispiel mehr Bcl-2-Proteine (anti-apoptotisch) als Bax-Proteine (pro-apoptotisch) vor, so werden Heterodimere zwischen Bcl-2 und Bax gebildet und der Zelltod wird unterdrückt. Umgekehrt, wenn mehr Bax vorhanden ist, werden Bax Homodimere gebildet, die die Zelle für apoptotische Stimuli empfänglich machen [Gajewski und Thompson, 1996]. Ein weiteres Modell besagt, daß Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> Heterodimere Apoptose inhibieren, weil sie die Assoziation von Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) mit Procaspase-9 oder Procaspase-3, Cytochrom C und ATP verhindern und so die Aktivierung der jeweiligen Procaspase blockieren [Zou et al., 1997]. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß in Gegenwart von Bcl-2 kein Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird [Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997]. Dieses Modell wurde aufgestellt, nachdem kürzlich die dreidimensionale Struktur von Bcl-x<sub>L</sub> aufgeklärt wurde [Minn et al., 1997]. Die Struktur besitzt große Ähnlichkeit zu bakteriellen Toxinen wie Diphterietoxin und Colicin, die bekanntermaßen Poren in Membranen formen können. Tatsächlich konnte in *in vitro* Experimenten die Fähigkeit von Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Bax Poren in artifiziellen Lipid-Doppelschichten zu bilden, gezeigt werden [Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997]. Es

wird oft beschrieben, daß es während der Apoptose zum Abfall der mitochondrialen Membranspannung kommt und daß dadurch die äußere Mitochondrienmembran porös und durchlässig für Proteine wird [Petit et al., 1996; Kroemer et al., 1997]. Daraus folgernd kann man sagen, daß Bcl-2 wahrscheinlich als eine Art Kanal/Pore den Ein- und Ausstrom von Ionen oder kleinen Molekülen so reguliert, daß die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran erhalten bleibt und Cytochrom C nicht austreten kann [Yang et al., 1997]. Ein weiterer Regulationsmechanismus für die Proteine der Bcl-2-Familie ist die posttranslationale Modifikation wie Phosphorylierung, die für Bcl-2 und Bad bekannt ist, aber nur für Bad gut beschrieben ist [Gajewski und Thompson, 1996].

Bcl-2 kann die Zelle vor dem Zelltod schützen, der durch unterschiedliche Stimuli wie TNF $\alpha$ , ROS (*reactive oxygen species*),  $\gamma$ -UV-Strahlung, Hitzeschock, p53, c-myc, Calcium und Chemotherapeutika induziert wird. Die Frage bleibt zu beantworten, welcher der gemeinsame Nenner dieser unterschiedlichen Signale ist. Für viele der aufgezählten Stimuli ist bekannt, daß sie den Sphingomyelin-Zyklus aktivieren. In einigen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, daß der über Ceramid-vermittelte Zelltod durch Bcl-2 blockiert wird [Zhang et al., 1996; Wieder et al., 1997]. Die Bildung bzw. Akkumulation von Ceramid wird dabei nicht verhindert, d.h. Bcl-2 fungiert in der Signalkaskade unterhalb von Ceramid.

**Tab. 2** *Bcl-2 Familie (in Säugetieren u. C. elegans)*

Pro-apoptotisch	Anti-apoptotisch
Bax	Bcl-2
Bak	Bcl-x <sub>L</sub>
Bad	Bcl-w
Bcl-X <sub>S</sub>	Mcl-1
Bid	A1
Bik	
Harakiri	
Ced-3 (C. elegans)	Ced-9 (C. elegans)

### 1.3.3 Caspasen

Caspasen sind Cystein-Proteasen, da sie einen Cystein-Rest in ihrem aktiven Zentrum enthalten, und schneiden spezifisch hinter einem Aspartat-Rest. So steht „C-“ im Namen Caspase für eine Cystein-Protease, „-asp“ weist auf die Spaltung nach einem Aspartat-Rest hin, und „-ase“ beschreibt die Enzymfunktion [Alnemri et al., 1996]. Caspasen sind auch unter dem Namen ICE-ähnliche Proteasen bekannt [Miller et al., 1997]. Mittlerweile gibt es mindestens 13 verschiedene Mitglieder, die je nach dem Zeitpunkt ihrer Erstbeschreibung durchnummeriert wurden. Entdeckt wurden diese Proteasen aufgrund von Homologiestudien zu ced-3, der Protease, die in *C. elegans* eine wichtige Rolle spielt. Die erste Protease, die entdeckt wurde, ist das Interleukin 1 $\beta$ -konvertierende Enzym, das Prointerleukin 1 $\beta$  in seine

aktive Form spaltet. Deswegen wird es Caspase-1 genannt [Thornberry und Lazebnik, 1998]. Sie spielt jedoch bei der Apoptose nur eine untergeordnete Rolle.

Alle Caspasen haben eine große Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität [Cohen, 1997]. Sie werden als Proenzyme (30 bis 50 kDa) gebildet, die die drei Domänen N-terminale Prodomäne, kleine (10 kDa) und große (20 kDa) Untereinheit besitzen. Während ihrer Aktivierung wird die Prodomäne entfernt und zwischen der kleinen und großen Untereinheit geschnitten [Nicholson und Thornberry, 1997]. Diese lagern sich dann aneinander und bilden ein Heterodimer, wobei darauffolgend zwei Heterodimere ein Tetramer formen. Man unterscheidet zwischen Initiator- und Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen sind nach Anlagerung an die Todesdomäne eines Rezeptors mit Hilfe von Adapterproteinen in der Lage, sich selbst zu spalten. Die autokatalytisch aktivierten Caspasen spalten im weiteren Verlauf des apoptotischen Prozesses die Effektor-Caspasen in ihre aktive Form. Die wichtigsten Effektor-Caspasen sind die Caspasen 3, 6 und 7.

### 1.3.3.1 Substrate der Caspasen

Im Verlauf der Apoptose werden verschiedene Proteine gespalten, die dazu beitragen, daß die sterbende Zelle die typische apoptotische Morphologie zeigt. Das Zytoskelett wird reorganisiert, die DNA-Replikation und die Reparatur fällt aus, die nukleäre Struktur wird zerstört, RNA-Spleißen wird unterbrochen und die Zelle wird schließlich für Phagozyten markiert. Von den unzähligen Substraten werden unten nur einige wichtige erwähnt. Alle bekannten Substrate können jedoch das Auflösen der Zellen nicht gut erklären.

Ein wichtiges Substrat für die Caspasen ist der *Inhibitor der Caspasen-aktivierten-Desoxyribonuklease* (ICAD) [Sakahira et al., 1998], der nach seiner Spaltung durch Caspase-3 die Caspasen-aktivierte-Desoxyribonuklease (CAD) [Enari et al., 1998] freisetzt. CAD schneidet die DNA internukleosomal in 200 bp-Fragmente. Der ICAD/CAD-Komplex ist zytosolisch lokalisiert und wurde bisher aus Mauszellen isoliert. ICAD besitzt eine große Homologie zu dem humanen Protein DFF (*DNA fragmentation factor*), der aus zwei Untereinheiten besteht (45 und 40 kDa), wobei die 45 kDa-Untereinheit [Liu et al., 1997] eine Caspase-3-spezifische Spaltsequenz besitzt und nach seiner Spaltung zur Aktivierung der Endonuklease (40 kDa-Untereinheit) führt [Wyllie, 1998]. Der genaue Mechanismus ist hier noch nicht vollständig geklärt.

Bcl-2-Proteine sind ebenfalls Substrate für Caspasen. Durch Spaltung verlieren sie nicht nur ihre anti-apoptotische Funktion, sondern fördern sogar die Apoptose durch ihr Spaltprodukt [Thornberry und Lazebnik, 1998]. Eines der typischen Merkmale der Apoptose ist die Auflösung des Kerns und die Chromatinkondensation. Letzteres wird durch die Spaltung von *Lamin* erreicht, das eine rigide Polymerstruktur unterhalb der nukleären Membran bildet und für die Chromatinorganisation verantwortlich ist.

Ein gut beschriebenes Substrat ist die *Poly(ADP)ribose-Polymerase* (PARP), die in DNA-Reparaturprozesse involviert ist [Cohen, 1997] und während der Apoptose von der Caspase-3 gespalten wird. Die Detektion des Spaltproduktes über Westernblot wird oft angewandt, um Apoptose nachzuweisen. Weiterhin werden mehrere Proteine gespalten, die das Zytoskelett regulieren. Dazu gehören die Proteine *Gelsolin* (reguliert die Aktinfilamente) [Kothakota et al., 1997], *focal adhesion kinase* (FAK; veranlaßt die Zelle, sich von ihrer Umgebung zu lösen) und *p21-activated-kinase* (PAK2).

#### 1.3.4 p53

*p53*, oft als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, wird nach Schädigung der DNA, aber auch durch andere Noxen, die nicht zwangsläufig DNA-Schäden zur Folge haben, aktiviert. Es sind zwei zelluläre Antworten infolge der Aktivierung von *p53* beschrieben: 1. Zellzyklusstop, 2. Apoptose.

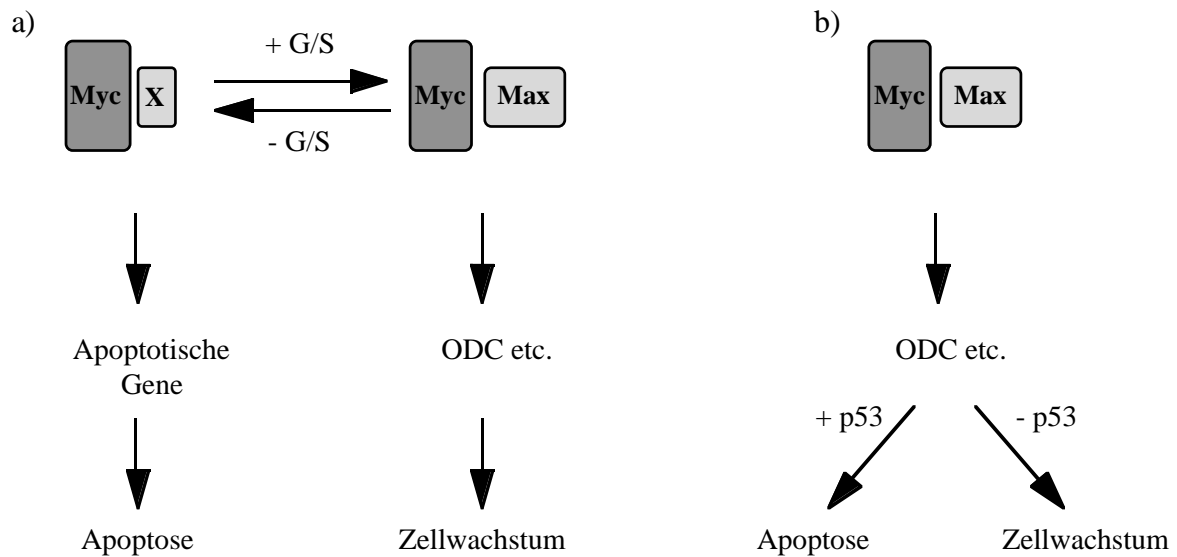
Bei DNA-Schäden fungiert *p53* als Kontrollpunkt und löst einen Zellzyklusstop in der G1-Phase aus, damit Reparaturmechanismen eingreifen können. Ist der Schaden zu groß, geht die Zelle unweigerlich in die Apoptose. Während viele gesicherte Hinweise dafür sprechen, daß der Wachstumsstop durch *p53* über die Induktion einer Cyklin-abhängigen Proteinkinase abläuft, ist der Mechanismus, der die Apoptose einleitet, weitgehend unklar, zumal *p53* scheinbar an der Induktion von einigen, aber nicht allen Formen von Apoptose beteiligt ist. Einige Befunde deuten darauf hin, daß *p53* als Transkriptionsfaktor weitere Apoptose-assoziierte Gene und Proteine wie z.B. das anti-apoptotische *bcl-2* und seinen Antagonisten *bax* [Miyashita et al., 1994] sowie das Oberflächenprotein Fas [Owen-Schaub et al., 1995] reguliert.

*p53* wird als Tumor-Suppressor-Gen bereits in der Gentherapie, bei der Induktion von Apoptose in Tumoren eingesetzt [Merkle et al., 1998; Badie et al., 1999].

#### 1.3.5 c-myc

*c-myc* gehört zu einer Familie von Proto-Onkogenen, die DNA-bindende Proteine mit bHLH-LZip (*basic-helix-loop-helix and leucin zipper*)-Motiv kodieren. Die Daten der letzten Jahre über *c-myc* sind genauso widersprüchlich wie seine Wirkung. Ihm wird sowohl eine Rolle in der Proliferation als auch bei der Apoptose zugeschrieben. Ein Grund dafür ist wohl, daß es in Verbindung mit seinem Partner Max als Heterodimer den eigentlichen Transkriptionsfaktor bildet und in dieser Form sowohl aktivierend als auch reprimierend auf Promotoren diverser Gene wirken kann. Auch die Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen wie dem die Transkription initiiierenden Faktor TFII-I, *p53* und dem bei der zellulären Transformation erhöhten Enzym Ornithindecaboxylase (ODC) vergrößern die Vielfalt der möglichen

Wirkungsmechanismen von c-Myc. Zwei der heute favorisierten Wirkungsmechanismen sind in Abb. 2 a) + b) dargestellt [Ryan und Birnie, 1996].



**Abb. 2** *Mögliche Mechanismen der Myc-induzierten Apoptose*

(a) Signalweg, der zwei Gruppen von Myc-regulierten Genen einbezieht; eine Gruppe reguliert das Zellwachstum und die andere reguliert die Apoptose. (b) Signalweg, der eine Gruppe Myc-regulierter Gene ansteuert, in der die Entscheidung über Zellwachstum oder Apoptose durch p53 vermittelt wird. G/S: growth-/survival-factors; X: unbekanntes Protein; ODC: Ornithindecaboxylase.

In den neuesten Arbeiten wird beschrieben, daß bei Entzug von Wachstumsfaktoren in Fibroblasten c-Myc die Zelle für die Fas-vermittelte Apoptose sensibilisiert [Hueber et al., 1997].

Bezüglich des Ceramids konnte gezeigt werden, daß Ceramid über die Ceramid-aktivierbare Proteinphosphatase zur Suppression des *c-myc*-Gens und so zur Zellwachstumshemmung führt [Wolff et al., 1994].

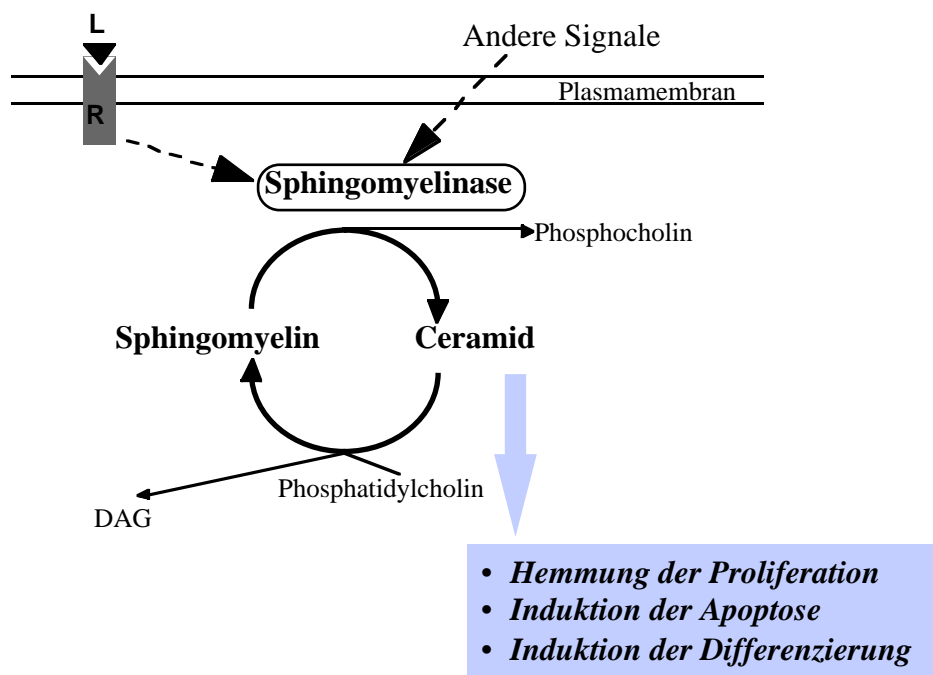
### 1.3.6 Ceramid-vermittelter Signalweg

Dem Wirkungsmechanismus und der Biosynthese von Ceramid wurde erst neuerdings große Aufmerksamkeit entgegengebracht als seine Rolle als Effektormolekül in der Apoptose immer deutlicher wurde. Der Ceramid-vermittelte Signalweg ist deswegen ein relativ junges Forschungsfeld.

In der Zelle entsteht Ceramid (*N*-Acylsphingosin) entweder über die *de novo*-Biosynthese oder über die Hydrolyse des Sphingolipids Sphingomyelin. Sphingomyelin befindet sich in der eukaryotischen Zellmembran und macht ca. 2-5 % der Membranlipide aus. Daß Sphingomyelin nicht nur ein Strukturbestandteil der Membran ist, sondern in einen

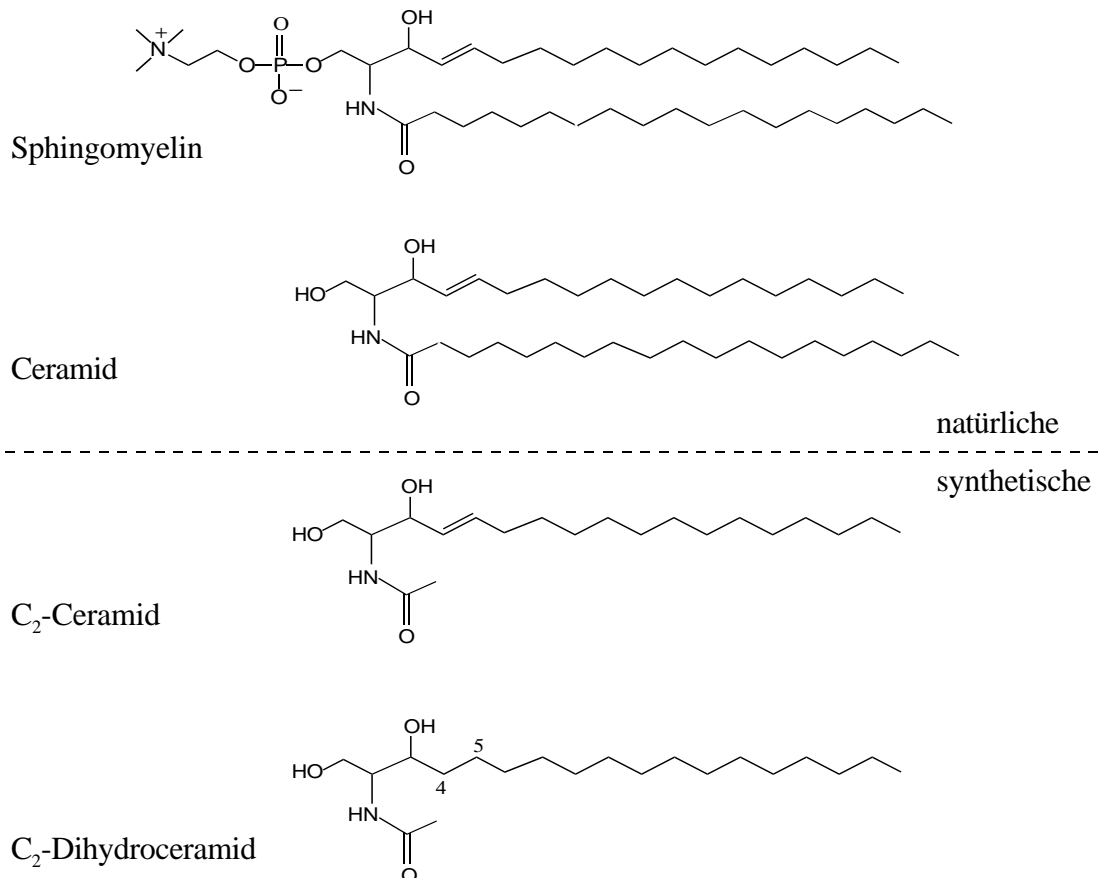


neuartigen Signaltransduktionsmechanismus involviert ist, wurde angenommen, als 1986 die Arbeitsgruppe von Hannun zeigte, daß Sphingolipide die Proteinkinase C (PKC) hemmen können [Hannun et al., 1986]. Intensive Forschung auf dem Gebiet führten zum Modell des sogenannten Sphingomyelin-Zyklus (s. Abb. 3): Agonisten wie z. B.  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  aktivieren eine Sphingomyelinase, die in der Lage ist, Sphingomyelin an der Phosphocholinkopfgruppe zu hydrolysieren und somit Ceramid freizusetzen. Ceramid moduliert die Aktivität von spezifischen Proteasen und Phosphatasen, die schließlich die typische biologische Antwort einer Zelle bestimmen. Zu diesen gehören die Hemmung des Zellwachstums, Förderung der Zelldifferenzierung, Apoptose und Zellalterung [Venable et al., 1995]. Die Bedeutung von Ceramid in diesem Sphingomyelin-Zyklus als *Second Messenger* [Hannun, 1994; Hannun und Obeid, 1995] und Auslöser der zellulären Antwort (Proliferationshemmung, Induktion der Differenzierung, Apoptose), gilt aufgrund vieler Untersuchungen mit Hilfe strukturell verwandter Moleküle, wie Dihydroceramid ( $C_2$ -Dihydroceramid) und den zellpermeablen Ceramid-Analoga *N*-Acetylsphingosin ( $C_2$ -Ceramid) und *N*-Hexanoylsphingosin ( $C_6$ -Ceramid), als gesichert [Bielawska et al., 1993]. Bis auf das Dihydroceramid, das sich vom Ceramid durch das Fehlen der trans-Doppelbindung zwischen den C-Atomen 4 und 5 unterscheidet (s. Abb. 4) und deswegen biologisch inaktiv ist, bewirken diese exogen zugegebenen Ceramide vergleichbare Effekte wie das über die Agonisten-stimulierte Sphingomyelin-Hydrolyse entstandene Ceramid. Eine schematische Übersicht über die molekulare Grundlage des Sphingomyelin-Zyklus und die Strukturformel von Sphingomyelin, endogenem Ceramid sowie den in den Versuchen verwendeten Ceramid-Analoga  $C_2$ -Ceramid und  $C_2$ -Dihydroceramid geben die Abb. 3 + 4 wieder.



**Abb. 3** *Der Sphingomyelin-Zyklus*

L, Ligand; R, Rezeptor; DAG, Diacylglycerol.



**Abb. 4** *Natürliche und synthetische Sphingolipide*

Bisher wurden als direkte Angriffsziele von Ceramid folgende Moleküle identifiziert:

- a) Die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase (CAPP), erstmalig beschrieben von der Arbeitsgruppe um Hannun [Dobrowsky und Hannun, 1992], gehört zur Familie der Serin/Threonin-Proteinphosphatase 2A (PP2A). Sie wird spezifisch von Ceramid stimuliert. Andere Sphingolipid-Abkömmlinge bewirken keine Veränderung der Enzymaktivität [Dobrowsky et al., 1993]. Die CAPP ist meistens in die biologische Antwort, die zur Hemmung des Zellwachstums und zur Apoptose führt, involviert. Die Hemmung des Zellwachstums geschieht über die Suppression des *c-myc*-Gens [Wolff et al., 1994].
- b) Die Ceramid-aktivierte Proteinkinase (CAPK) gehört zu den Prolin-gerichteten Serin/Threonin-Proteinkinasen. Sie ist ein strikt membrangebundenens 97-kDa Protein [Liu et al., 1994] und unterscheidet sich dadurch von den MAP-Kinasen, die eine ähnliche Konsensussequenz haben, aber zytosolisch lokalisiert sind [Davis, 1993]. Kürzlich

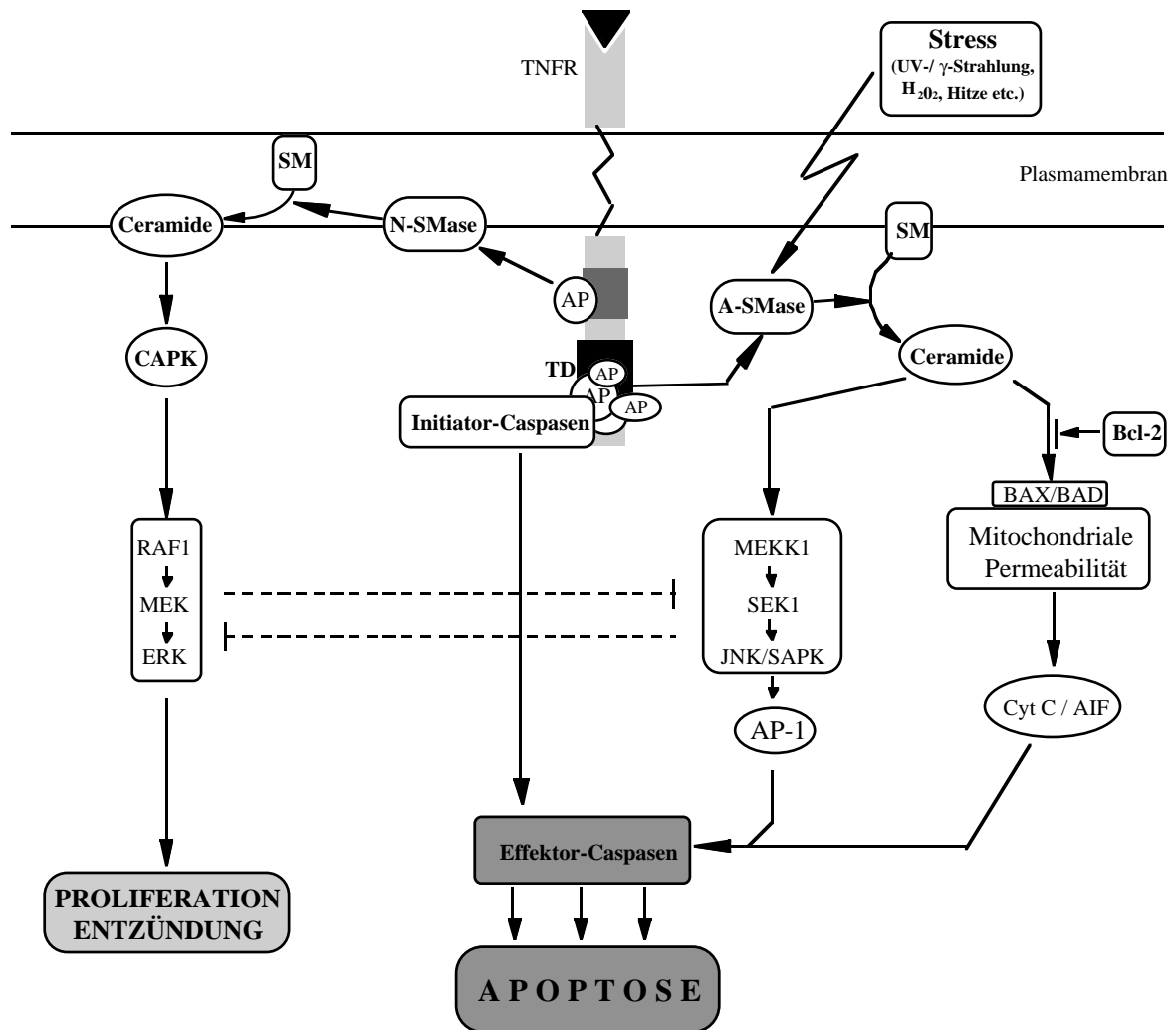
veröffentlichten Untersuchungen zufolge ist CAPK, Kinase-Suppressor von Ras (KSR=*kinase suppressor of Ras*) [Zhang et al., 1997]. Gut beschrieben ist ihre Aktivierung durch  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , bakterielle Sphingomyelinasen und durch Ceramid-Analoga. Der von CAPK genutzte Signalweg führt über  $\text{TNF}\alpha$  zu Proliferation und Entzündung.

c) Die Phospholipase D wird durch Ceramid gehemmt [Jones und Murray, 1995]. Es wird angenommen, daß PLD wichtig für den Vesikeltransport ist [Nickel und Wieland, 1997]. Es ist auch bekannt, daß Ceramid den Vesikeltransport unterbindet [Hannun, 1997] und möglicherweise dies unter anderem über die Hemmung der PLD geschieht. In HaCaT-Zellen wurde gezeigt, daß die Ceramid-induzierte Apoptose mit einer erniedrigten Phospholipase D-Aktivität einhergeht [Iwasaki-Bessho et al., 1998].

d) Auch die Proteinkinasen C werden von Ceramid moduliert. Proteinkinase C $\zeta$  (zeta) wird durch Ceramid zur Autophosphorylierung stimuliert [Müller et al., 1995]. Im weiteren Verlauf führt PKC $\zeta$  zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B, wobei der genaue Ablauf der Reaktion noch unbekannt ist. Proteinkinase  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  werden von Ceramid von der Membran zum Zytosol transloziert und dadurch inaktiviert. Diese Inaktivierung ist wichtig für die Einleitung der Apoptose durch Ceramid. Bei Hemmung dieser Translokation wird die Apoptose blockiert [Sawai et al., 1997]. Die Translokation von PKC korreliert ebenfalls mit einer Zunahme der Differenzierung von humanen Keratinozyten [Jones und Sharpe, 1994].

Weitere indirekte Zielmoleküle von Ceramid sind das Retinoblastom-Genprodukt (Rb), c-Myc und NF- $\kappa$ B [Ballou et al., 1996].

In Abb. 5 wird die Einbindung des Sphingomyelin-Zyklus (SM-Zyklus), einige der bisher besprochenen sowie anderer wichtiger Moleküle in die Signaltransduktionskette der Apoptose schematisch dargestellt.



**Abb. 5** *Möglicher Mechanismus für Stress- und Rezeptor-induzierte Apoptose via Sphingomyelin-Zyklus*

Der Abbau von Sphingomyelin wird von neutralen und sauren Sphingomyelinasen (SMase) katalysiert. Dabei münden sowohl Umweltstress als auch TNF-/Fas-Rezeptoren in den SM-Zyklus als stromabwärts liegendes Effektorsystem. Während die Aktivierung der neutralen SMase (N-SMase) über die Ceramid-aktivierbare Proteinkinase (CAPK) zur Aktivierung der ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)-Kaskade und zu proinflammatorischen zellulären Antwort führt, ist die Aktivierung der sauren SMase (A-SMase) mit der Aktivierung der JNK/SAPK (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen/Stress-aktivierte Proteinkinasen) mit sich anschließender Apoptose gekoppelt. ERK- und JNK/SAPK-Kaskade stehen in Konkurrenz miteinander und inhibieren sich gegenseitig. Umweltstress aktiviert die A-SMase direkt über die Plasmamembran. Im Gegensatz dazu aktiviert das vom Rezeptor ausgehende Signal sowohl die A-SMase über seine Todesdomäne (TD) bzw. die daran gebundenen Adapterproteine (AP), als auch die N-SMase über eine weitere proximal gelegene Rezeptorregion. Der Rezeptor ist über die Anlagerung von Initiator-Caspasen in der Lage, die Apoptose-Maschinerie direkt in Gang zu setzen. Bcl-2 ist einer der anti-apoptotischen Protagonisten, der die durch Cytochrom C (Cyt C) und *apoptosis-inducing-factor* (AIF)-Freisetzung aus den Mitochondrien ausgelöste Apoptose verhindern kann. Die Aktivierung der Effektor-Caspasen ist irreversibel und führt schließlich zur Spaltung von Proteinen und DNA.

### 1.3.6.1 Regulation des intrazellulären Ceramidpools

Der Sphingomyelin-Zyklus wird über extrazelluläre Signalmoleküle angeschaltet und führt über bisher weitgehend unbekannt Wege zur Aktivierung von Sphingomyelinasen, die die Phosphodiesterbindung des Sphingomyelins spalten und Ceramid und Phosphocholin freisetzen [Liu et al., 1997]. Sie werden nach ihrem pH-Optimum in 2 Klassen von Isoformen eingeteilt:

1. saure Sphingomyelinasen (A-SMase): pH-Optimum = 4,5-5
2. neutrale Sphingomyelinasen (N-SMase): pH-Optimum = 7,4

In Abhängigkeit von der Zelllinie und dem extrazellulären Stimulus, lassen sich diese beiden Klassen unterschiedlichen Signalwegen mit unterschiedlichen zellulären Antworten zuordnen. Die saure Sphingomyelinase scheint jedoch für die Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels in Verbindung mit Apoptose als zelluläre Antwort entscheidend zu sein.

Dies belegen zwei genetische Modelle mit einer A-SMase-Defizienz. Lymphoblasten von Patienten mit Niemann-Pick'scher Krankheit (NPD), einer vererbten A-SMase-Defizienz, und von transgenen A-SMase-*knock-out* Mäusen manifestieren eine defekte apoptotische zelluläre Antwort. Im Gegensatz zu normalen Lymphoblasten waren NPD-Lymphoblasten nicht in der Lage nach Stimulation mit  $\gamma$ -Strahlung Ceramid zu bilden und in Apoptose zu gehen [Santana et al., 1996].

Weitere bekannte Wege, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Ceramidspiegels führen, sind die verminderte Sphingomyelin-Synthese, der verminderte Ceramid-Abbau und die erhöhte Ceramid-*de novo*-Synthese.

### 1.3.6.2 Rolle von Ceramid in der Haut

In der Epidermis kommt Ceramid in großen Mengen im Extrazellularraum vor. Natürliches Ceramid ist hydrophob, so daß seine Rolle in der Haut darin besteht, Feuchtigkeit zurückzuhalten und die Permeabilitätsbarriere aufrechtzuerhalten, was wichtig für den Schutz gegenüber der Außenwelt ist. Hierfür sprechen auch Untersuchungen von Holleran und Mitarbeitern, die zeigen, daß die Aktivität des Schlüsselenzyms der Sphingolipid-Biosynthese, die Serin-Palmitoyltransferase in der Epidermis viel höher ist als in anderen Geweben [Holleran et al., 1991a]. Nach Störung der epidermalen Permeabilitätsbarriere steigt die Synthese der Sphingolipide [Holleran et al., 1991b]. Ceramid ist in mehreren Schichten zwischen den Korneozyten eingelagert. Auf dem Weg der terminalen Differenzierung wird Ceramid in Massen produziert und in den *Odland bodies* (Keratinosomen) nach außen abgegeben. Seit der Beschreibung des Sphingomyelin-Zyklus, in dem Ceramid ein *Second Messenger* ist, wird die Rolle des Ceramids in der Epidermis neben der Permeabilitätsbarriere auch als Signalmolekül, das Einfluß auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge hat, in Betracht gezogen. Es wurde bereits in RPMI-Medium

gezeigt, daß sowohl *N*-Acetylsphingosin als auch langkettiges exogen zugegebenes Ceramid das Zellwachstum von humanen Keratinozyten hemmt, deren Differenzierung fördert und Apoptose auslösen kann [Geilen et al., 1996; Pillai et al., 1996; Bektas et al., 1998].

### 1.3.7 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Extrazelluläre Signale in Form von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (z.B. EGF,  $\text{TNF}\alpha$ ) binden an ihre spezifischen Rezeptoren der Zelloberfläche und setzen dadurch eine koordinierte Kaskade der Signalweiterleitung in den Zellkern in Gang. In dieser Kaskade dienen Transkriptionsfaktoren als terminale Empfänger und regulieren durch Modulation der Genexpression komplexe biologische Antworten.

AP-1 (Aktivatorprotein-1) ist ein kollektiver Terminus für dimerische Transkriptionsfaktoren, die sich aus Jun-, Fos- oder ATF (*activating transcription factor*)-Proteinen zusammensetzen. Diese Untereinheiten binden an eine gemeinsame, spezifische DNA-Sequenz, die AP-1-Bindungsstelle.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde ursprünglich in Kernextrakten von HeLa-Zellen identifiziert, wo er an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz in der Promotorregion des humanen Metallothioneingens  $\text{II}_A$  bindet. Kurz danach wurde herausgefunden, daß auch verschiedene andere virale und zelluläre Gene (z.B. humane Kollagenase, MTIIa, SV40, Stromelysin, Interleukin-2 und Polyoma) diese Erkennungssequenz haben. Die genannten Gene werden durch Phorbolester wie TPA-(12-*O*-teradecanoylphorbol-13-acetat) aktiviert und deswegen wird die spezifische Erkennungssequenz in ihrer Promotorregion auch als TRE (TPA *response element*) bezeichnet [Angel et al., 1987]. Zur Vereinfachung wird aber im Folgenden anstelle von TRE die Bezeichnung AP-1-Bindungsstelle (AP-1-BS) verwendet. Der Vergleich von verschiedenen AP-1-BS führte zur Ableitung einer palindromischen Konsensussequenz, die durch AP-1 erkannt wird: 5'-TGA G/C TCA-3' [Angel et al., 1987].

Aus den AP-1-Präparationen der Kernextrakte isolierte man mehrere verschiedene Polypeptide, die sich als Genprodukte den Proto-Onkogenfamilien *jun* und *fos* zuordnen lassen. Die Mitglieder der einzelnen Familien, die man bisher in Zellen von Säugetieren identifiziert hat, sind in Tabelle 3 aufgelistet [Rossi et al., 1998].

**Tab. 3 Mitglieder der jun- und fos-Familie (Säugetiere)**

<i>jun</i> -Familie	<i>fos</i> -Familie
<i>c-jun</i>	<i>c-fos</i>
<i>junB</i>	<i>fosB</i>
<i>junD</i>	<i>fra-1</i>
	<i>fra-2</i>

Abgesehen von TPA, kann AP-1 als Antwort auf eine Reihe von Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Tumorpromotoren, Karzinogenen, gesteigerter Expression von anderen Onkogenen, aber auch durch Stress aktiviert werden und die Genexpression von AP-1-abhängigen Genen verändern.

Die Dimerbildung von AP-1 ist die Voraussetzung für das Binden an die AP-1-BS und die Aktivierung von Genen (c-Fos alleine kann nicht binden und löst deshalb keine Transkription aus). Dabei können Jun-Proteine sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden (z.B. c-Jun : c-Fos), während Fos-Proteine nur Heterodimere bilden, dabei aber mit jedem beliebigen Jun-Protein dimerisieren können. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß Heterodimere aufgrund ihrer höheren Thermostabilität eine größere AP-1-Aktivität haben als Homodimere [Smeal et al., 1989]. Gleichzeitig ist die AP-1-Aktivität, d.h. die Fähigkeit die basale Transkriptionsmaschinerie zu transaktivieren, bei der Vielfalt der möglichen Kombinationen an Heterodimeren, zumindest *in vitro*, z.T. sehr unterschiedlich [Ryseck und Bravo, 1991].

Die Dimerisierung zwischen Jun- und Fos-Proteinen erfolgt hauptsächlich in den sogenannten „Leucin-Zipper“-Regionen (Kouzarides T.,1988). Der „Leucin-Zipper“ ist ein strukturelles Motiv, das eine ausgedehnte  $\alpha$ -Helix bildet, in der jede 7. Aminosäure ein Leucin oder eine andere hydrophobe Aminosäure ist. Diese Anordnung bewirkt die Dimerbildung in Form von „coiled-coils“. Daneben können noch weitere hydrophobe Leucinreste und Salzbrücken zusätzlich Dimere stabilisieren [Zerial et al., 1989].

Neben der „Leucin-Zipper“-Region haben alle Fos- und Jun-Proteine eine weitere hochkonservierte Region: die „basische Region“. Sie befindet sich stromaufwärts der „Leucin-Zipper“-Region, ist gekennzeichnet durch eine große Anhäufung von positiv geladenen Resten und entscheidend für die Bindung an die AP-1-BS [Vogt und Bos, 1990]. Die beiden beschriebenen Regionen bzw. Domänen führten zu der Bezeichnung bZIP (basische Leucin-Zipper-Proteine) -Proteine.

Für die Transaktivierungsaktivität von AP-1 ist die Transaktivierungsdomäne als dritte hochkonservierte Region zuständig. Bei c-Jun liegt sie in der N-terminalen Hälfte und besteht aus drei kurzen Regionen, die aus Gruppen von negativ geladenen Aminosäuren zusammengesetzt sind [Angel et al., 1989]. Bei Fos-Proteinen wurde ebenfalls eine

Transaktivierungsdomäne nachgewiesen; sie ist allerdings noch nicht näher charakterisiert bzw. kartiert.

### 1.3.7.1 Regulationsmechanismen der AP-1-Aktivität

Es sind mehrere Mechanismen beschrieben, die die AP-1-Aktivität regulieren:

#### 1. *Unterschiedliche Transkription von jun- und fos-Genen*

Je nach Art des Stimulus werden die einzelnen Mitglieder der Jun- und Fos-Familie mehr oder weniger exprimiert und beteiligen sich somit in unterschiedlichem Ausmaß an der Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten von Jun- und Fos-Proteinen haben auch unterschiedliche Fähigkeiten, AP-1-abhängige Gene zu transaktivieren. JunB und JunD-Homodimere z.B. sind schwache Transaktivatoren, während die Bildung von Heterodimeren von c-Fos mit einem beliebigen Jun-Protein einen potenten Transaktivator ergibt.

Von wesentlicher Bedeutung ist, daß die Aktivierung des Promotors von *c-jun* innerhalb einer Signaltransduktionskette durch eine positive Autoregulation vermittelt wird. Im Gegensatz dazu wird die Induktion von *c-fos* durch das eigene Genprodukt inhibiert und ist durch weitere spezifische DNA-Erkennungssequenzen (cis-Elemente) von anderen Transkriptionsfaktoren wie SRF (*serum-responding factor*) [Treisman, 1992], STAT (*signal-transducer and activator of transcription*) [Darnell et al., 1994], CREB (*cAMP response element binding protein*) und ATF [Sheng et al., 1991] abhängig.

#### 2. *Posttranslationale Modifikation bestehender AP-1-Komplexe*

Eine der bekanntesten Arten, um Proteinaktivität zu modulieren, ist die Phosphorylierung.

Sowohl bei c-Jun als auch bei c-Fos sind Phosphorylierungsstellen in enger Nähe zu der „basischen Region“ gefunden worden. Dabei führt die Phosphorylierung von c-Jun *in vitro* durch Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) zu einem dramatischen Verlust seiner DNA-Bindeaktivität [Boyle et al., 1991].

Durch Phosphorylierung kann ebenfalls die Stabilität eines Proteins und damit seine tatsächlich vorhandene Menge beeinflusst werden. Im Fall von c-Jun reduziert die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen an seiner aminoterminalen Aktivierungsdomäne durch Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen (MAPK) die Ubiquitinierung und vermindert somit seinen Abbau [Musti et al., 1997]. Die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen) an den Serinen 63 und 73 hat ebenfalls einen stabilisierenden Effekt und erhöht zudem die Transaktivierungsaktivität [Smeal et al., 1994].



### 3. Wechselwirkung mit anderen Zellproteinen

Protein-Protein-Wechselwirkungen haben große Bedeutung für die Kontrolle der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Die Jun-Proteine standen diesbezüglich bisher im Mittelpunkt der Forschung.

Es wurde gezeigt, daß Jun-Kinasen als Untergruppe der MAP-Kinasen mit einem Teil der aminoterminalen Aktivierungsdomäne von c-Jun interagieren können [Derijard et al., 1994]. Die nukleären Rezeptoren für Retinoide oder Glucocorticoide können mit AP-1 in der Weise wechselwirken, daß sie entweder seine Bindung an die DNA verhindern oder mittels Transrepression die Transaktivierungsaktivität des gebundenen Transkriptionsfaktors inhibieren [Nagpal et al., 1995]. Darüber hinaus sind transkriptionelle Koaktivatoren beschrieben, die mit c-Jun interagieren können wie z.B. CBP (*CREP-binding protein*) [Arias et al., 1994] und JAB1 (*Jun activation domain binding protein*) [Claret et al., 1996]. Die TPA-induzierte Transaktivierungsaktivität von AP-1 kann durch das Interferon-induzierbare Protein p202 inhibiert werden [Min et al., 1996].

#### 1.3.7.2 Biologische Wirkung von AP-1

In der Literatur wird AP-1 mit folgenden zellulären Antworten in Verbindung gebracht :

1. Proliferation (Transformation)
2. Differenzierung
3. Apoptose
4. Entzündung

Im allgemeinen wird die terminale Differenzierung von Keratinozyten begleitet von einer Hemmung der zellulären Proliferation. Trotz dieses Gegensatzes wurde bisher die biologische Wirkung von AP-1 bei der Induktion sowohl von Proliferation als auch der Differenzierung und der Apoptose in verschiedenen Zelllinien beschrieben. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Wirkungsweisen ist u.a. die Aktivierung von unterschiedlichen Gruppen an Zielgenen durch AP-1 [Karin et al., 1997].

Die Rolle von AP-1 bei der Proliferation und Transformation wurde sehr früh erkannt, als man *jun*- und *fos*-Gene zunächst als genetisch veränderte Onkogene entdeckte, die aus Primärtumoren oder RNA-Tumorviren isoliert wurden [Bishop, 1987].

Die Bedeutung von AP-1 in der Differenzierung wurde bereits in vielen Zellsystemen nachgewiesen. Es konnte u.a. gezeigt werden, daß die Behandlung von nicht differenzierten F9-Zellen mit Retinsäure, die nachweislich AP-1-Aktivität induziert, zur Differenzierung dieser Zellen in einen primitiven epithelialen Zelltypus führt. Diese Differenzierung ist charakterisiert durch die Expression zahlreicher Markergene [Kitabayashi et al., 1992], die ihrerseits in ihrem Promotor AP-1-Bindungsstellen tragen [Oshima et al., 1990].

Hinsichtlich der Beteiligung an der Apoptose beschreibt eine Veröffentlichung die Notwendigkeit von AP-1 für die Ceramid-induzierte Apoptose in HL-60-Zellen [Sawai et al., 1995].

### 1.3.7.3 Bedeutung von AP-1 in der Epidermis

Epidermale Keratinozyten machen den Hauptanteil der Zellen aus, die die Epidermis bilden und sind verantwortlich für den Aufbau einer protektiven Barriere [Green und Watt, 1982].

Im Verlauf der Differenzierung wird aus einem relativ undifferenzierten Keratinozyt ein Korneozyt. Der Prozess der Differenzierung ist sehr komplex und hängt von einem kontrollierten genetischen Programm ab. Im Laufe der Wanderung von den basalen Schichten in die oberflächlichen verhornenden Schichten der Haut exprimieren Keratinozyten unterschiedliche Proteine bzw. Differenzierungsmarker (s. Abb. 1).

AP-1-Transkriptionsfaktoren wurden bereits mit mehreren Genen in Keratinozyten in Verbindung gebracht. Tabelle 4 zeigt, warum gerade AP-1 bei der Differenzierung von Keratinozyten so interessant ist [Eckert und Welter, 1996]. Tatsächlich reguliert AP-1 über die AP-1-BS die Transkription eines Großteils der Differenzierungsmarker der Haut und spielt damit eine große Rolle in der epidermalen Differenzierung und Genexpression. Alle bisher bekannten AP-1-Faktoren werden in der Epidermis exprimiert [Welter und Eckert, 1995].

**Tab. 4** *AP-1 reguliert die Expression von Differenzierungsmarkern der Haut*

Protein	<i>In vivo</i> Expression	Bindungsstelle	Spezies	Referenz
Keratin 18	einfache Epithelien	AP-1-BS, Intron 1	Mensch/Maus	[Oshima et al., 1990]
Keratin 8	einfache Epithelien	AP-1-BS, 3'-Ende	Maus	[Tamai et al., 1991]
Keratin 5	Stratum basale	AP-1-BS, 5'-Ende	Rind	[Casatorres et al., 1994]
Keratin 1	Stratum granulosum	AP-1-BS, 3'-Ende	Mensch	[Lu et al., 1994]
Transglutaminase 1	Stratum spinosum/ granulosum	AP-1-BS, 5'-Ende	Mensch	[Yamada et al., 1994]
Loricrin	Stratum granulosum	AP-1-BS, 5'-Ende	Maus	[DiSepio et al., 1995]
Involucrin	Stratum spinosum/ granulosum	AP-1-BS, 5'-Ende	Mensch	[Welter und Eckert, 1995]

## 2 Ziel der Arbeit

In Voruntersuchungen an primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen wurde die Existenz des erst kürzlich beschriebenen Sphingomyelin-Zyklus nachgewiesen, in dem Ceramid eine wichtige Funktion als Lipid-*Second-Messenger* hat [Geilen et al., 1996].

In der vorliegenden Arbeit soll die biologische Wirkung eines intrazellulären Ceramidanstiegs, der über Zugabe von C<sub>2</sub>-Ceramid erreicht wird, in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT in serumfreiem Medium (KGM) hinsichtlich Proliferation und Apoptose untersucht werden. Dazu werden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen C<sub>2</sub>-Ceramid inkubiert und das Proliferationsverhalten mit Hilfe eines Proliferationstests und die Apoptose über die Quantifizierung der DNA-Fragmentierung mit Hilfe eines Sandwich-ELISA untersucht. Um den Konzentrationsbereich zu finden, in dem C<sub>2</sub>-Ceramid biologisch aktiv ist, ohne dabei die Zellviabilität einzuschränken, werden die Zellkulturüberstände darüber hinaus einem LDH-Assay unterzogen.

Als Kontrolle dient das biologisch inaktive Ceramid-Analogon C<sub>2</sub>-Dihydroceramid.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, in C<sub>2</sub>-Ceramid-stimulierten HaCaT-Zellen die Expression auf Ebene der Boten-RNA die folgende Auswahl Apoptose-assoziiierter Gene zu untersuchen: *bax*, *bcl-2*, *caspase 3*, *c-myc*, *p53*, *c-jun* und *c-fos*.

Die Gene *bax* und *bcl-2* sind beide auf mitochondrialer Ebene aktiv. Das *caspase 3-Gen* kodiert eine Protease, die als Mitglied der eigentlichen Apoptose-Maschinerie die Exekution der Zelle vollzieht. Die Gene *c-myc* und *p53* sind beide in die Kontrolle des Zellzyklus involviert. Die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 werden durch die Gene *c-jun* und *c-fos* kodiert.

Die Liste der Induktoren des Sphingomyelin-Zyklus und der Aktivatoren der JNK/SAPK weisen eine starke Übereinstimmung auf. JNK/SAPK aktivieren den Transkriptionsfaktor AP-1. Dieser ist sowohl an der Differenzierung von epidermalen Keratinozyten als auch an der Signalweiterleitung der Apoptose verschiedener anderer Zelllinien beteiligt. Bisher ist in humanen Keratinozyten noch kein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von AP-1 und Ceramid bei der Induktion von Apoptose nachgewiesen worden. Deshalb soll die Ceramid-vermittelte Aktivierung von AP-1 auf funktioneller Ebene mit Hilfe eines Transaktivierungsassays untersucht werden.

### 3 MATERIALIEN

#### 3.1 Geräte

Brutschrank, begasbar	BB16, Heraeus (Osterode, D)
Elektrophorese-Apparatur	GNA 200, Pharmacia Biotech (Uppsala, S) WideMiniSub <sup>TM</sup> Cell, Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
ELISA-Photometer	Modell 550 Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Geldokumentationskamera	Polaroid (Offenbach, D)
Kleinbrutschrank	B15, Heraeus (Osterode, D)
Magnetrührer	MR 2000, Heidolph (Kehlheim, D) Monotherm, Faust (Köln, D)
Meßwaagen	Präzisionswaage Kern 474, Gottl. Kern & Sohn, (Albstadt, D) Typ 2662, Sartorius (Göttingen, D)
Mikroskop	Diavert, Leitz (Wetzlar, D) BX60F5, Olympus (Tokyo, J)
Mikrowellengerät	Privileg 8017, Quelle (Fürth, D)
Mixer	Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg, D) Vortex IKA VF2, Jahnke und Kunkel (Staufen i.Br., D)
Netzteile	EPS 300, Pharmacia Biotech (Uppsala, S) Modell 1000/500, Bio-Rad (Richmond; CA, USA)
pH-Meter	pH 526, WTW (Weilheim i.OB, D)
Sterilbank	BSB 4A Gelaire Flow Laboratories (Opera, I)
Thermocycler	Multicycler PTC 200, Biozym (Oldendorf i. Hess, D) Mastercycler 5330, Eppendorf, (Hamburg, D)
Ultraschallbad	Sonorex RK 52, Bandelin (Berlin, D)
UV-Durchlichtgerät	NU-72, Konrad-Benda (Wiesloch, D)
UV-Vis Photometer	Ultrospec 1000, Pharmacia (Uppsala, S)
Wasserbad	1.002 GFL (Burgwedel, D)
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus (Osterode, D) Biofuge fresco, Heraeus (Osterode, D) Labofuge 400e, Heraeus (Osterode, D) Varifuge RF, Heraeus (Osterode, D) Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann Instruments (Glenrothes, GB)

### 3.2 Zelllinien

Für die Versuche wurde die spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie HaCaT [Boukamp et al., 1988] kultiviert, welche uns freundlicherweise von Prof. Dr. N. E. Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

Für die Kontrollexperimente wurde die humane Lymphozytenzelllinie HL-60 verwendet [Collins et al., 1977].

### 3.3 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der benutzten Plasmide wurde der *E. coli*-Sicherheitstamm DH5 $\alpha$  verwendet. Dieser Stamm wurde bei der Firma Life Technologies (Eggenstein, D) als 'Subcloning Efficiency *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competent cells' bezogen.

### 3.4 Chemikalien

Salze und Puffersubstanzen wurden von Merck (Darmstadt, D), Sigma (München, D) oder Roth (Karlsruhe, D) bestellt. Lösemittel und Lösungen wurden in analytischer Qualität von den Firmen J.T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (München, D) bezogen. Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

Agarose	Life Technologies (Eggenstein, D)
C <sub>2</sub> -Ceramid	Alexis (Grünberg, D)
C <sub>2</sub> -Dihydroceramid	Biomol (Hamburg, D)
DNA-Marker ( $\phi$ x174 / HaeIII-Fragmente)	Life Technologies (Eggenstein, D)
Ethidiumbromid	Amresco (Solon, Ohio, USA)
Kristallviolett	ICN (Eschwege, D)

### 3.5 Plasmide

Das Plasmid pCH110 wurde von der Firma Pharmacia (Freiburg, D) bezogen. Die Plasmide pBLCAT2/5xAP1 und pBLCAT2 wurde freundlicherweise von Dr. C. Carlberg (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt (s. Plasmidkarten 5.6.1.)

### 3.6 Primer

Folgende aufgelistete Primer wurden von der Firma Tib Molbiol (Berlin) synthetisiert:

Primer	Sequenz (5' → 3')
3'-Primer Bax	TTC TTC CAG ATG GTG AGC GAG
5'-Primer Bax	CGA GTG GCA GCT GAC ATG TTT
3'-Primer bcl-2	TGG CTC AGA TAG GCA CCC AG
5'-Primer bcl-2	ACG GTG GTG GAG GAG CTC TT
3'-Primer c-fos	GCC AAC TTC ATT CCC ACG GT
5'-Primer c-fos	TCG GGG TAG GTG AAG ACG AA
3'-Primer c-Jun	TGC TCA TCT GTC ACG TTC TTG G
5'-Primer c-Jun	TGC AAA GAT GGA AAC GAC CTT C
3'-Primer c-myc	ACT CCG GGA TCT GGT CAC GC
5'-Primer c-myc	GCT CCA CCT CCA GCT TGT AC
3'-Primer P53	CTC ATT CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA GCG
5'-Primer P53	CTG AGG TTG GCT CTG ACT GTA CCA CCA TCC
3'-Primer RiboS9	GAG ACA ATC CAG CAG CCC AGG AGG GAC A
5'-Primer RiboS9	GAT GAG AAG GAC CCA CGG CGT CTG TTC G

### 3.7 Zellkulturmaterialien

Sterile Einmalartikel stammten von folgenden Unternehmen :

Kulturflaschen und -schalen, Zentrifugenröhrchen	Nunc (Wiesbaden, D)
Pipetten	Costar (Cambridge, MA, USA)
Sterilfilter	Schleicher und Schuell (Dassel, D)
KBM ( <i>Keratinocyte Basal Medium</i> )-Flüssigmedium KGM ( <i>Keratinocyte Growth Medium</i> )-Flüssigmedium	Clonetics (San Diego, CA, USA)
RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )- Flüssigmedium PBS ( <i>Phosphat Buffered Saline</i> ) FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> ), Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin Trypsin	Seromed-Biochrom (Berlin, D)
Insulin-Transferrin-Selen 100X	Firma Life Technologies (Eggenstein, D)

## **4      METHODEN**

### **4.1    Zellkultur**

#### **4.1.1  Zellkulturmedien**

Für die Anzucht und die Kultivierung der HaCaT-Zellen werden folgende Medien und Lösungen benötigt.

- phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
- Trypsin-Lösung (0,3 % in PBS)  
Die Lösung wird in Aliquots von 10 ml bei - 20 °C aufbewahrt.
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medium/10 % FCS):
  - 500 ml RPMI,
  - 50 ml fötales Kälberserum,
  - 5 ml Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (10.000 E Penicillin/ml und 10.000 mg/ml Streptomycin-Stammlösung),
  - 5 ml 200 mM L-Glutamin
- KGM-Medium [Boyce und Ham, 1983]
  - 500 ml KBM,
  - 0,5 ml 100 ng/ml hEGF,
  - 0,5 ml 5 mg/ml Insulin,
  - 0,5 ml 0,5 mg/ml Hydrokortison,
  - 0,5 ml 50 mg/ml Gentamycinsulfat,
  - 50 µg/ml Amphotericin-B,
  - 2 ml 7,5 mg/ml Rinderhypophysenextrakt

Fertigangesezte Medien werden bei 4 °C aufbewahrt.

#### **4.1.2  Kultivieren der Zellen**

HaCaT-Zellen sind adhärenent wachsende Zellen. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von  $A = 75 \text{ cm}^2$  in 12 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS im Brutschrank bei 37 °C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre, die 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luft enthielt, als Monolayer kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen nach einmaligem

Waschen mit 6 ml sterilem PBS mit neuem Medium versehen, um sowohl tote Zellen als auch saure Stoffwechselprodukte zu entfernen.

Zur Passage wurden die maximal 60 % konfluent gewachsenen Zellen zuerst mit 6 ml PBS gewaschen und anschließend für fünf bis zehn Minuten mit 5 ml Trypsin-Lösung bei 37 °C inkubiert. Aufgrund des Verlustes von Zell-Zell-Kontakten haben die Zellen begonnen sich abzurunden und verloren schließlich den Halt zum Boden. Die Trypsinlösung sollte nicht länger als 10 min auf den Zellen sein, da sie zellschädigend wirken kann. Nach Ablösung der Zellen wurden sie von der Kulturflasche abgespült und in ein mit 10 ml RPMI-Medium gefülltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Durch den hohen Proteinanteil des FCS wird ein Fortschreiten der Proteolyse durch Trypsin verhindert. Die Zellen wurden bei 200 x g (1.000 Upm, Labofuge 400e) für 5 min sedimentiert und in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Um für einen Versuchsansatz eine definierte Zellzahl pro Kulturschale zu erhalten, wurden die Zellen mit Hilfe eines Hämozytometers gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml Medium auf die neuen Flaschen mit jeweils insgesamt 12 ml Medium verteilt. Diese Zellzahl war so berechnet, daß die Zellen nach einer Woche etwa 60 % Konfluenz erreichten und bei dieser Zelldichte erneut passagiert wurden. Vor jedem Versuch wurden die Zellen zur Adaptation über Nacht von RPMI auf das serumfreie Medium KGM gesetzt und unmittelbar vor Versuchsbeginn noch einmal mit PBS gewaschen.

#### **4.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

HaCaT-Zellen aus einer Kulturflasche wurden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 20 ml Medium überführt und durch Zentrifugation mit 200 x g (1.000 Upm, Labofuge 400e) für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Sediment wurde in 1 ml FCS, dem 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt wurde, aufgenommen und in ein 2 ml "NUNC-Gefäß" mit Schraubverschluß überführt. Das DMSO verhindert die Kristallbildung innerhalb der Zellen während des Einfrierens. Das Einfrieren sollte langsam vorangehen, um Schäden durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden. Deshalb wurden die Röhrchen in Zellstoff eingewickelt und zunächst bei -80 °C für zwei Tage gelagert. Sie konnten so bis zu sechs Monate aufbewahrt werden oder anschließend im flüssigem Stickstofftank unbegrenzt bei -196 °C gelagert werden.

Während das Einfrieren langsam erfolgt, muß das Auftauen der Zellen schnell geschehen. Dazu wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 20 ml 37 °C warmes Medium gegeben und durch Zentrifugieren mit 200 x g (1.000 Upm, Labofuge 400e) für 5 min sedimentiert, in 24 ml Medium aufgenommen und dann je nach Bedarf auf zwei Kulturflaschen ( $A = 75 \text{ cm}^2$ ) verteilt. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Entfernung der nicht angewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.



## 4.2 Bestimmung der Proliferation

Um eine eindeutige Aussage über das Wachstumsverhalten von Zellen zu treffen, können verschiedene Methoden angewendet werden. Hierzu gehören die Messung des Einbaus von radioaktivem [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA, Bestimmung des Zellzyklusstadiums mit Hilfe von FACS-Analysen, Enzymaktivitätsmessungen und einfacherweise die Bestimmung der Zellzahl mit der nachfolgend beschriebenen Kristallviolett-Methode [Gillies et al., 1986].

### 4.2.1 Zellzahlbestimmung mit Kristallviolett

Kristallviolett ist ein Farbstoff, der an die DNA bindet, ungeachtet dessen, ob die Zelle lebt oder nicht. Bei adhären wachsenden Zellen wie Keratinozyten lösen sich die toten Zellen von der Kulturschale ab und gehen in den Kulturüberstand. Es sollten mit dieser Methode nur die lebenden, adhären Zellen erfaßt werden, daher wurde zunächst der Kulturüberstand abgesaugt und verworfen.

Benötigte Lösungen:

- PBS
- 0,1 % Glutardialdehyd in PBS
- 0,1 % Kristallviolett in PBS
- 0,2 % Triton-X-100 in PBS

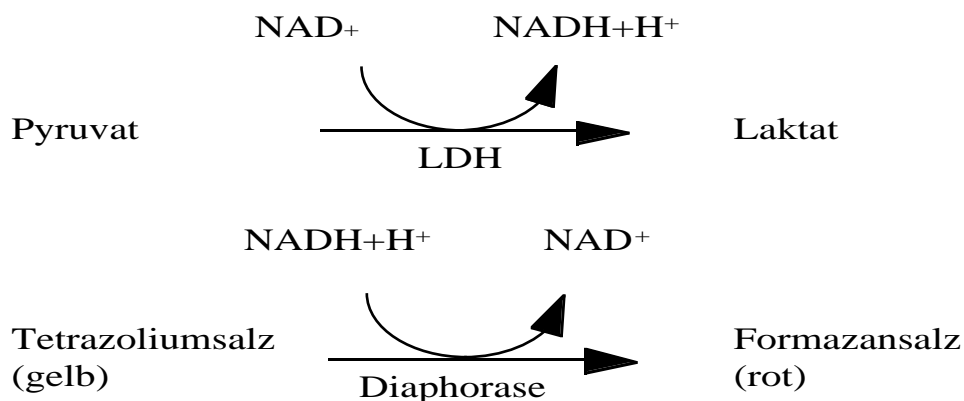
Durchführung:

HaCaT-Zellen wurden in 24-Loch Zellkulturschalen ( $d = 15 \text{ mm}$ ,  $A = 1,9 \text{ cm}^2$ ) ausgesät, die dann über Nacht adhären. Nach der Adaptation in serumfreiem Medium wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50 % mit den zu untersuchenden Agenzien behandelt. Der Inkubationszeit von 24 h oder 48 h folgte das Waschen der Zellen mit PBS und die Fixierung mit je 500  $\mu\text{l}$  0,1 % Glutardialdehyd für 30 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler. Das Glutardialdehyd wurde anschließend abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit je 500  $\mu\text{l}$  0,1 % Kristallviolett gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT (Schüttler) wurden unspezifische Färbungen ausgewaschen, indem die Kulturschale für ca. 10-15 min in deionisiertes Wasser gelegt wurde. Der an DNA gebundene Farbstoff wurde mit je 200  $\mu\text{l}$  0,2 % Triton X-100 aus den Zellen herausgelöst. Nach ca. 1 h bei RT, wenn der Farbstoff aus den Zellen vollständig herausgelöst worden war (eventuell unter Mikroskop kontrollieren), wurden je 100  $\mu\text{l}$  in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 570 nm im ELISA-Photometer bestimmt. Aus den Extinktionswerten wurde die Wachstumsinhibition bzw. -stimulation in % der Kontrolle berechnet.

### 4.3 Messung der Zytotoxizität

Klassisch wird der unspezifische Zelltod, auch Nekrose genannt, über Plasmamembranschäden nachgewiesen. Wirkt eine Substanz zytotoxisch auf Zellen, schwillt die Zelle an und platzt. Der Zellinhalt gelangt *in vitro* in den Zellkulturüberstand. Es gibt verschiedene Methoden, um die Zytotoxizität einer Substanz zu bestimmen, u.a. über Aufnahme oder Ausschluß von bestimmten Farbstoffen wie Trypanblau, Eosin und Propidiumiodid. Eine weitere Methode ist die Messung von zytoplasmatisch bzw. in der Plasmamembran lokalisierten Enzymen (Laktatdehydrogenase, alkalische Phosphatase), die nach Schäden an der Plasmamembran aus der Zelle heraustreten.

Mit der Messung der Freisetzung zytosolischer Laktatdehydrogenase (LDH) läßt sich die Lyse von Zellen sehr gut quantifizieren. Die Methode beruht auf der Messung der LDH-Aktivität, die von geschädigten Zellen aus dem Zytosol in den Zellkulturüberstand abgegeben wird. Mit Hilfe des käuflichen Kits von der Firma Boehringer Mannheim wird LDH-Aktivität in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen. Im ersten Schritt katalysiert LDH die Oxidation von Pyruvat zu Laktat, wobei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Im zweiten Schritt überträgt die Diaphorase  $\text{H}/\text{H}^+$  auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium) (gelb), welches dann zu Formazan (rot) reduziert wird, das im ELISA-Photometer gemessen werden kann. Der Zellkulturüberstand kann bei 4 °C für ein paar Tage aufbewahrt werden, ohne daß die Aktivität der LDH abnimmt. Der Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand ist proportional zu der Anzahl der toten bzw. geschädigten Zellen.



Benötigte Reagenzien (keine näheren Angaben des Herstellers):

Lösung 1: Katalysator

Lösung 2 : Farbstoff

Arbeitslösung für 30 Proben :

Lösung 1: 75 µl

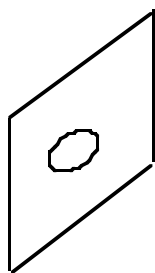
Lösung 2: 3,45 ml.

Durchführung:

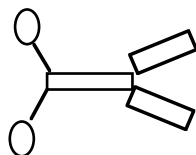
Nach der Behandlung der Zellen in 24-Loch Zellkulturschalen ( $d = 15 \text{ mm}$ ,  $A = 1,9 \text{ cm}^2$ ) mit der zu untersuchenden Substanz wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten 100 µl Zellüberstand entnommen, zentrifugiert und in eine Mikrotiterplatte (MTP) gegeben. Als Reaktionsgemisch (kurz vorher ansetzen) wurden Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:45 gemischt und in 100 µl-Portionen auf die Überstände gegeben. Die MTP wurde unter Abdunkelung bei RT bis zu 30 min inkubiert. Die Absorption des Farbstoffes wurde bei 490 nm gemessen.

#### 4.4 Messung des apoptotischen Zelltodes mittels eines Sandwich-ELISA

Der in einer Zelle eingeleitete Prozeß der Apoptose kann über verschiedene Methoden gemessen werden. Eine der aussagekräftigsten Methoden zur Erfassung der Apoptose ist die Bestimmung der DNA-Fragmentierung, die einen irreversiblen Schritt darstellt. Die am Ende der Apoptose-Signalkaskade aktivierte Endonuklease schneidet die DNA an den für das Enzym zugänglichen Linkerregionen der Nukleosomen. Es entstehen Nukleosomen oder Oligonukleosomen, deren DNA ein Vielfaches von ca. 200 Basenpaaren darstellt. Der Assay wurde als Kit der Firma Boehringer Mannheim, D bezogen. Er wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, die mit Streptavidin beschichtet ist. Nach Zugabe des Zellysats wurde eine Lösung zugegeben, die ein Gemisch aus anti-Histon-Biotin-Antikörper und anti-DNA-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase (POD) enthält, so daß ein sogenannter Sandwich-Komplex (siehe Abb.) gebildet wird. Nackte DNA oder einzelne Histone können die Bildung des Sandwichkomplexes nicht hervorrufen. Die Zugabe des Substrats bewirkt, daß eine grüne Farbe entsteht, welche im ELISA-Photometer gemessen werden kann. Je mehr lösliche Nukleosomen im Zellysats vorhanden sind, desto stärker ist die Farbreaktion.



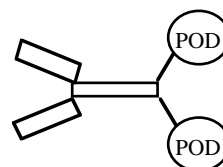
Streptavidin-  
beschichtete MTP



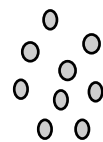
Anti-Histon-  
Biotin-AK



Nukleosom



Anti-DNA-  
Peroxidase-AK



Substrat

Benötigte Lösungen:

- 0,3 % Trypsinlösung
- anti-Histon-Antikörper gekoppelt mit Biotin
- anti-DNA-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase
- Inkubationspuffer
- Lysispuffer
- Positivkontrolle (im Kit enthalten)
- Substratlösung (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat])
  
- Konjugatlösung für 30 Proben:
  - 120 µl anti-Histon-Antikörper
  - 120 µl anti-DNA-Antikörper
  - 2160 µl Inkubationspuffer

Durchführung:

HaCaT-Zellen wurden in 24-Loch Zellkulturschalen ( $d = 15 \text{ mm}$ ,  $A = 1,9 \text{ cm}^2$ ) in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kulturschalen bei  $200 \times g$  5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 500 µl Lysispuffer pro Loch zu den adhären Zellen zugegeben und 30 min bei RT unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden mindestens  $200 \times g$  für 10 min zentrifugiert, um in den Proben enthaltene Zelltrümmer zu sedimentieren. Danach wurden je 20 µl der Überstände und 80 µl der Konjugatlösung auf die vorbeschichtete Mikrotiterplatte gegeben und für 2 h bei RT unter mäßigem Schütteln inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde ausgekippt und die Löcher mit je 200 µl Inkubationspuffer dreimal gewaschen. 100 µl Substratlösung werden in die einzelnen Löcher pipettiert und die Mikrotiterplatte abgedeckt, da die Substratlösung lichtempfindlich ist. Nach ca. 10-15 min wird die Platte im ELISA-Photometer bei 405 nm gemessen.

#### 4.5 Molekularbiologische Methoden

Die Arbeit mit Bakterien und Nukleinsäuren erfordert eine keimarme Umgebung. Alle verwendeten Glasgeräte wurden für 4 h bei  $190 \text{ °C}$  erhitzt. Einwegmaterial und Medien wurden für 20 min bei  $121 \text{ °C}$  und 1,2 bar autoklaviert. Lösungen, die nicht hoch erhitzbar sind, wurden steril filtriert.

Allgemein benötigte Medien und Lösungen :

*L-Broth Medium*

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Hefe-Extrakt	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

*Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)*

Ampicillin	1 g
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

steril filtrieren und Aliquots bei -20 °C aufbewahren.

*TE-Puffer pH 8*

Tris	1,21 g	10 mM
EDTA	0,29 g	1 mM
HCl	ad pH 8,0	
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	

*70 % Ethanol*

Ethanol	70 ml
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

#### **4.5.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Zellen**

Für die Transformation wurden 50  $\mu$ l kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen auf Eis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit je 5  $\mu$ l der zu transformierenden DNA aus Kapitel 4.5.4.2 vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Mit einem Hitzeschock von 20 sec bei 37 °C erfolgte die Aufnahme der DNA. Anschließend wurden die Zellen für 2 min wieder auf Eis inkubiert. Hiernach wurden 950  $\mu$ l L-Broth Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden für 5 sec mit 2.000 x g (5.000 Upm,

Biofuge fresco) abzentrifugiert, mit 100 µl L-Broth Medium versetzt und wie unter Kapitel 4.5.2 beschrieben angezüchtet.

#### 4.5.2 Anzucht transformierter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Zellen

Benötigte Lösungen :

##### *L-Broth/Ampicillin Agar*

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Hefe Extrakt	5 g
Agar Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml
Ampicillin-Stammlösung	1.000 µl

erst ab etwa 60 °C zugegeben, ergibt etwa 20-30 Platten

Einzelkolonien von *E. coli* Bakterien wurden durch Ausstreichen der aus 4.5.1 aufgenommenen Zellen auf L-Broth Agar in Petrischalen mit einem Drigalskispatel nach Inkubation von ca. 16 h bei 37 °C erhalten. Die Agarplatten können bei 4 °C maximal 4 Wochen aufgehoben werden.

Die Vermehrung der Bakterien erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie in 4 ml L-Broth Medium inkl. 50 µg/ml Ampicillin für ca. 16 h bei 37 °C unter Schütteln. Für die Anzucht in größeren Volumina werden 400 ml L-Broth Medium mit 50 µg/ml Ampicillin mit der Vorkultur versetzt und für weitere 16 h bei 37 °C unter Schütteln im Luftschüttler mit 150 Upm - 250 Upm inkubiert. Die benutzten Gefäße sollten etwa das Dreifache des eingesetzten Volumens aufnehmen können, um eine ausreichende Belüftung der Kulturen zu gewährleisten.

#### 4.5.3 Einfrieren und Auftauen von *Escherichia coli* Kulturen

Für das Einfrieren wurden 700 µl einer dicht gewachsenen Kultur auf vorgelegte 300 µl Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren.

Die Glycerinkultur wurde schnell bei 37 °C aufgetaut und in 40 ml L-Broth mit 50 µg/ml Ampicillin wie in Kapitel 4.5.2 angezüchtet.

#### 4.5.4 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Nukleinsäuren erfolgte mit Kits der Firma Qiagen (Hilden, D). Diese basieren auf der Eigenschaft, dass Nukleinsäuren unter bestimmten Ionenbedingungen in alkoholischer Lösung an Silikatkügelchen binden [Vogelstein und Gillespie, 1979], während Proteine und Kohlenhydrate abgewaschen werden können. Die verwendeten Puffer sind Bestandteile der Kits und in den meisten Fällen fehlt eine nähere Beschreibung ihrer Zusammensetzung.

##### 4.5.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus HaCaT-Zellen

Ribonukleasen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die im allgemeinen keine Kofaktoren für ihre Aktivität brauchen, weswegen sie sehr schwer zu inaktivieren sind. Spuren von RNasen reichen aus, um RNA zu zerstören. RNasen können nur mit sehr starken Reduktionsmitteln wie Diethylpyrokarbonat (DEPC),  $\beta$ -Mercaptoethanol oder starker Hitze (220°C) inaktiviert werden. Alle benutzten Rührfische, Glas- und sonstige thermostabilen Materialien müssen vor dem Versuch von potentieller RNase-Kontamination befreit werden. Hierfür können sie bei 220 °C für ca. 16 h in den Trockenschrank gelegt werden. Geräte wie Gelkammer oder pH-Meter-Stab wurden vor der Benutzung mit DEPC-vorbehandeltem bidest. Wasser gespült. Alle Puffer wurden mit DEPC-Wasser hergestellt. Hierfür wurden in einem RNase-freien Gefäß bidest. Wasser mit 0,05 % DEPC versetzt und über Nacht gerührt. Im Anschluß daran wurde das Wasser autoklaviert, um DEPC zu entfernen. DEPC zerfällt zu Ethanol und Wasser.

Während der Arbeit mit RNA müssen jederzeit Handschuhe getragen werden.

Nach unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten wird Gesamt-RNA aus den HaCaT-Zellen mit dem käuflichen Kit der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

Durchführung:

Die in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen behandelten Zellen wurden wie unter Kapitel 4.1.2 beschrieben geerntet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt und das Sediment in 600  $\mu$ l RLT Puffer (für  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen) aufgenommen. Nach Mischen auf dem Vortex wurde das Lysat auf eine QIAshredder Zentrifugationssäule gegeben und für 2 min bei RT mit 13.000 x g (13.000 Upm, Biofuge fresco) homogenisiert. Das Homogenat kann so bei -70 °C eingefroren werden oder wurde mit 600  $\mu$ l 70 % Ethanol versetzt und durch hoch- und runterziehen in der Pipette gemischt. In Aliquots wurde es auf eine RNeasy mini Zentrifugationssäule gegeben, 15 sec mit 8.000 x g zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die nun an die Säule gebundene RNA wurde mit 700  $\mu$ l RW1 Puffer gewaschen, in ein

neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl RPE gewaschen. Mit weiteren 500 µl RPE Puffer wurde 2 min mit 13.000 x g zentrifugiert, um das im Puffer enthaltene Ethanol vollständig zu entfernen. Die Elution der RNA erfolgte mit zweimal 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß durch Zentrifugieren für 1 min mit 8.000 x g (10.300 Upm, Biofuge fresco). Das Eluat wird bei -20 °C aufbewahrt.

#### 4.5.4.2 Plasmidpräparation im Großmaßstab

Die alkalische Lyse nach BIRNBOIM and DOLY (1979) nutzt das unterschiedliche Verhalten von linearer DNA gegenüber zirkulär geschlossenen Plasmid-Molekülen bei Denaturierung mit Alkali und anschließender schneller Neutralisation in Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration [Birnboim und Doly, 1979]. Lineare Moleküle, vor allem zerbrochene, chromosomale DNA bildet während der Neutralisation ein partiell renaturiertes großes Netzwerk und fällt aus. Zirkuläre Plasmidmoleküle renaturieren dagegen vollständig und bleiben so in Lösung. Chromosomale DNA, ein Großteil der zellulären RNA sowie die mit Natriumdodecylsulfat komplexierten Proteine werden gefällt.

Diese Methode nutzt eine mit an Silikat verestertem Diethylaminethanol (DEAE), einem Anionenaustauscher, gepackte Säule für die weitere Aufreinigung der DNA. Die Elution erfolgt ohne Zentrifugation durch Schwerkraft.

Die Isolation der Plasmide erfolgte mit den im käuflichen Kit von der Firma Qiagen enthaltenen Lösungen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

##### *P1 Puffer*

Tris	6,06 g
EDTA	2,92 g
HCl	ad pH 8,0
Ribonuclease A (EC 3.1.27.5.)	100 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml
bei 4 °C aufbewahren	

##### *P2 Puffer*

NaOH	8 g
10 % SDS	100 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml



*P3 Puffer*

Kaliumacetat	294,5 g
Essigsäure	ad pH 5,5
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

*QBT Puffer*

NaCl	43,83 g
MOPS	10,46 g
Triton X-100	1,5 ml
NaOH	ad pH 7,0
2-Propanol	150 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

*QC Puffer*

NaCl	58,44 g
MOPS	10,46 g
NaOH	ad pH 7,0
2-Propanol	ad 150 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

*QF Puffer*

NaCl	73,05 g
TRIS	6,06 g
HCl	ad pH 8,5
2-Propanol	ad 150 ml
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

Je 250 ml einer Großkultur (s. 4.5.2) wurden für 15 min bei 4 °C mit 6.000 x g (6.000 Upm, Varifuge RF) zentrifugiert, mit 10 ml eiskaltem P1 Puffer durch hoch- und runterziehen in einer Pipette resuspendiert und in einen 50 ml Zentrifugenbecher überführt. Nach der Zugabe von 10 ml eiskaltem P2 Puffer wurde durch mehrmaliges, saches Umdrehen gemischt und zur Lysis 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wurden 10 ml eiskalter P3 Puffer zugegeben und kräftig gemischt. Für die Fällung wurde das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 4 °C mit 20.000 x g (13.000 Upm, Beckmann J2-21) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für weitere 15 min wie vorher beschrieben zentrifugiert. Währenddessen erfolgte das Equilibrieren je einer Säule (QIAGEN-tip 500) mit 10 ml QBT Puffer. Auf die equilibrierte Säule wurde der Überstand aus der

zweiten Zentrifugation dekantiert und durchlaufen gelassen. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC Puffer gewaschen. Die Plasmid DNA wurde mit 15 ml QF Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml 2-Propanol (ad 50 %, 6,6 M) versetzt, gemischt und 30 min bei 4 °C mit 15.000 Upm, Beckmann J2-21) zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 5 ml 70 % Ethanol durch Zentrifugation für 10 min wie zuvor gewaschen und nach Trocknen an der Luft für 5-10 min mit 500 µl TE aufgenommen.

#### 4.5.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von wässrigen Nukleinsäuren kann durch Messung der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption ( $A_{260}$ ) von 1,00 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml kurzer, einzelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Mißt man zusätzlich die Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ), läßt sich über den Quotienten  $Q_{Ns} = A_{260}/A_{280}$  auf den ungefähren Grad der Verunreinigung mit Protein schließen. Reine DNA Präparationen besitzen einen Quotienten von  $Q_{Ns} = 1,8$ , während der Quotient für reine RNA Präparationen einen Wert von  $Q_{Ns} = 2,0$  besitzt. Kontaminationen mit Protein oder anderen aromatischen Substanzen verursachen durch ihre Absorption bei 280 nm einen niedrigeren Wert des Quotienten.

#### 4.5.6 Agarosegel-Elektrophorese

Benötigte Lösungen

*TAE Puffer (10 x)*

Tris	48,44 g
Natriumacetat	4,1 g
EDTA	5,85 g
Essigsäure	ad pH 7,8
H <sub>2</sub> O	ad 2.000 ml

*DNA Probenpuffer*

50 % Ficoll 400	5 ml
200 µL Bromphenolblau (2,5 %)	200 µl
TAE Puffer (10 x)	500 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

Die Elektrophorese von DNA in Agarosegelen erfolgte horizontal in TAE.

Es wurden zwei Agarosegele verwendet: 200 mm x 200 mm, entsprechend einem Gelvolumen von 200 ml, sowie 100 mm x 65 mm, entsprechend einem Gelvolumen von 100 ml.

Gelvolumen	100 ml		200 ml	
Agarose	1 %	2 %	1 %	2 %
	1 g	2 g	2 g	4 g

Gele mit einer Agarosenkonzentrationen von 1 % wurden zur Auftrennung von Plasmiden und 2 % für Fragmente kleiner 800 Basenpaare (bp) verwendet. Die gewünschte Menge Agarose wurde eingewogen, mit H<sub>2</sub>O auf 180 g bzw. 90 g aufgefüllt und je nach Volumen und Agarosekonzentrationen 1 min bis 10 min im Mikrowellenherd bei 600 W aufgeköcht. Die Lösung wurde mit H<sub>2</sub>O wieder auf 190 g bzw. 90 g gebracht, mit 10 ml bzw. 20 ml 10 x TAE Puffer und 10 µl bzw. 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zur Anfärbung der DNA versetzt und nach Abkühlen auf etwa 60 °C in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in der Apparatur mit TAE Puffer überschichtet und der Probenaschenkamm entfernt.

Die Proben wurden mit einem Zehntel ihres Volumens mit DNA Probenpuffer versetzt und durch Unterschichten in die Taschen geladen.

Die Elektrophorese wurde mit etwa 100 V und 150 mA durchgeführt, bis das Bromphenolblau maximal 2/3 der Gellänge gewandert war. Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele auf einem UV-Durchlichtgerät mit Hilfe einer Videodokumentation aufgenommen.

#### 4.5.7 Auswertung von Agarosegelen

Die Auswertung ethidiumbromidgefärbter Agarosegele erfolgte nach Aufnahme durch eine Videodokumentation (Polaroid, Offenbach, D) unter konstanten Bedingungen (Blende = 2,5 Belichtungszeit = 200 ms) unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm. Die Auswertung der digitalisierten Bilddaten erfolgte mit Hilfe der Multi-Analyst-Software (Bio-Rad, München, D). Dabei sollte das Gel zügig aufgenommen werden, da das UV-Licht die interkalierenden Ethidiumbromidmoleküle (von der DNA) ablöst und die Färbung nach einigen Minuten deutlich abnimmt.

#### 4.5.8 Transfektion von HaCaT-Zellen

Die Transfektion von HaCaT-Zellen erfolgte mit dem Lipofektionskit FuGene 6 der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, D). Das von der Firma nicht näher beschriebene lipophile Agens wird zur Komplexierung der DNA eingesetzt, die sich so an die Zellmembran anlagert und vor DNasen geschützt ist. Die lipophile Hülle ermöglicht der DNA den Eintritt durch die Zellmembran in das Zytosol. Die Kernmembran löst sich erst während einer Zellteilung auf. Ist die DNA nach einer Zellteilung in den Zellkern gelangt, kann eine transiente Expression stattfinden, d.h. die kodierten Gene werden exprimiert, ohne daß das Plasmid vermehrt oder weitergegeben wird.

Etwa 50 % konfluente HaCaT-Zellen in 6-Loch Zellkulturschalen ( $d = 35 \text{ mm}$ ,  $A = 9,6 \text{ cm}^2$ ) wurden vor der Transfektion mit neuem, serumfreiem Medium (KGM) versetzt. Für jedes Loch wurden  $3 \mu\text{l}$  der ethanolischen Fugene 6 Lösung und  $97 \mu\text{l}$  KGM Medium vorbereitend zusammengegeben und für 5 min inkubiert.

In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden  $1 \mu\text{g}$  oder  $2 \mu\text{g}$  Plasmid vorgelegt. Hierzu wurden je  $100 \mu\text{l}$  der vorbereiteten Fugene 6 Lösung pipettiert. Diese Mischung wurde auf ein Loch mit Zellen in der 6-Loch Zellkulturschale pipettiert. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Zu diesem oder einem späteren Zeitpunkt wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien so behandelt, daß die Gewinnung der Zellysate für den Transaktivierungsassay 48 h nach der Transfektion erfolgte.

#### 4.5.9 Messung der Transaktivierungsaktivität des Aktivatorproteins-1

DNA-Konstrukte, bei denen eine Promotorsequenz mit einem Gen rekombiniert wurde, das ein leicht detektierbares Protein kodiert (Reportergen), werden zur Transfektion von Säugetierzellen verwendet, um Aussagen über die von diesem Promotor gesteuerte Genexpression zu bekommen. Transkriptionelle Regulationsmechanismen können also durch ein Reportersystem analysiert werden.

Hier wurde das bakterielle Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase Typ I (CAT) als Reporter gen verwendet, das kein eukaryotisches Äquivalent hat. In den vorliegenden Transfektionsexperimenten mit transienter Transfektion wurde zur Bestimmung der Transaktivierungsaktivität des Aktivatorproteins-1 (AP-1) pBLCAT2/5xAP1 [Luckow und Schütz, 1987] als Plasmid verwendet. In diesem Plasmid steht das CAT-Gen unter Kontrolle eines tk-Minimalpromotors, dem 5 AP1-Bindungsstellen (Core-Sequenz TGACTCA) vorangestellt sind. Die in den Zellextrakten von transient transfizierten Zellen gemessene Menge an CAT-Enzym korreliert dabei positiv mit der Transkriptionsaktivität der regulatorischen Sequenzen.

Das *Escherichia coli* lacZ Gen kodiert die  $\beta$ -Galaktosidase und ist in einer Reihe von Transfektionsstudien [Luckow und Schütz, 1987; Maniatis et al., 1989] als interner Standard

(Referenzplasmid) benutzt worden. Zur Überwachung der Transfektionseffizienz und Normalisierung der CAT-Mengen wurden daher die Zellen mit 1 µg pCH110 (Pharmacia, Freiburg, D) als Referenzplasmid cotransfiziert, das ein durch einen SV40 Promotor reguliertes funktionelles lacZ Gen enthält.

Für die Bestimmung der Mengen an CAT-Enzym wurde ein CAT-ELISA (Boehringer Mannheim, D) verwendet, der eine Alternative mit vergleichbarer Sensitivität zu den herkömmlichen CAT-Assays darstellt, bei denen mit radioaktiven Isotopen gearbeitet werden muß. Zur Quantifizierung der  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) wurde ein  $\beta$ -Gal-ELISA (Boehringer Mannheim, D) benutzt, der im Gegensatz zu kolorimetrischen Assays ausschließlich das bakterielle Enzym, nicht aber die analoge lysosomale  $\beta$ -Galactosidase detektiert.

Beide Tests basieren auf dem Sandwich-ELISA Prinzip. Die Assays werden in je einer Mikrotiterplatte (MTP) durchgeführt, die mit gegen CAT oder  $\beta$ -Gal gerichtete Antikörpern beschichtet sind. Nach Lysis der transfizierten Zellen wurden Aliquots der zu untersuchenden Zellextrakte, die das CAT- und das  $\beta$ -Gal-Enzym enthalten, zu den MTP gegeben. Danach wurde ein gegen CAT bzw.  $\beta$ -Gal gerichteter, mit Digoxigenin markierter Antikörper zugefügt. Im folgenden Schritt bindete ein gegen das Digoxigenin gerichteter und mit Peroxidase konjugierter Antikörper an das Digoxigenin. Das nun zugefügte Substrat ABTS<sup>®</sup> führte zu einer durch die Peroxidase katalysierten Farbreaktion. Das grün gefärbte Reaktionsprodukt kann im ELISA-Photometer quantifiziert werden, wobei die gemessene Absorption direkt mit der in dem Zellextrakt enthaltenen CAT- bzw.  $\beta$ -Gal-Menge korreliert.

#### Durchführung:

HaCaT-Zellen wurden in 6-Loch Zellkulturschalen ( $d = 35$  mm,  $A = 9,6$  cm<sup>2</sup>) in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch in 2 ml RPMI/10 % FCS ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium bei einer Konfluenz der Zellen von 40-50 % nach Waschen mit 0,5 ml PBS pro Loch durch 2 ml KGM ersetzt. Die Transfektion erfolgte wie in Kapitel 4.5.8 beschrieben mit 2 µg pBLCAT 2 und 1 µg pCH110. 24 h später wurden die Zellen mit 0,5 ml PBS pro Loch gewaschen und mit 2 ml frischem KGM versetzt. Die nachfolgenden Behandlungszeitpunkte mit C<sub>2</sub>-Ceramid bzw. mit anderen Agenzien wurden so gewählt, daß der Zeitraum zwischen Transfektion der Zellen und ihrer Lyse immer 48 h betrug. Die Herstellung der Zellysate erfolgte mit dem im CAT-ELISA-Kit enthaltenen Lysispuffer. Die Zellen wurden mit 500 µl des 1x Lysispuffers pro Loch lysiert und die MTP des CAT- und  $\beta$ -Gal-ELISAs mit je 200 µl Lysat versetzt.

Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers mit den in den ELISA-Kits mitgelieferten Lösungen.

#### 4.5.10 Enzymkatalysierte Reaktionen

Enzyme für die Molekularbiologie werden oft in einem Puffer geliefert, der 50 % Glycerol enthält. Die meisten dieser Enzyme werden durch Glycerol in Konzentrationen größer als 5 % gehemmt oder in ihrer Spezifität beeinflusst. Sie sind auch eher wärmeempfindlich und müssen daher bei -20 °C aufbewahrt werden, zur Zugabe auf Eis gehalten werden und beim Pipettieren so kurz als möglich in der sich schnell erwärmenden Spitze gehalten werden. Dies ist bei der Planung der Reaktionsansätze zu beachten.

##### 4.5.10.1 Restriktion der DNA

Benötigte Lösungen

###### *Stop Lösung*

EDTA	0,29 g
Natriumdodecylsulfat	0,10 g
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

###### *Stop/Lade Lösung*

DNA Probenpuffer (s. Kapitel 4.5.6)	5 ml
Stop Lösung	5 ml

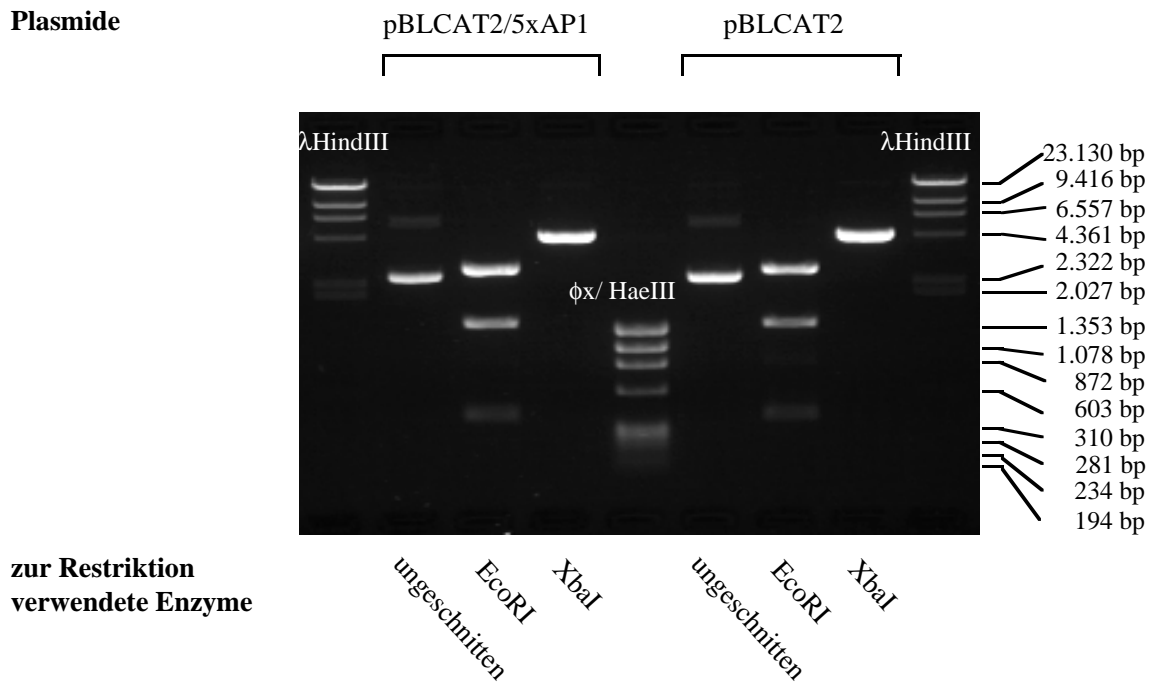
Ein Ansatz ist wie folgt zusammengesetzt, wobei nach Möglichkeit Mastermixe einzelner Komponenten benutzt werden.

10 U/µl Enzym	2 µl
10x Puffer	2 µl
DNA	0,5 µg
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Konzentration an DNA sollte etwa 0,1 µg/µl bis 0,2 µg/µl betragen. Für präparative Zwecke wurden je Ansatz Volumina bis 100 µl verwendet, größere Ansätze wurden entsprechend aliquotiert. Das Schneiden von Restriktionsendonukleasen erfolgte für 1 h bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stop/Lade bzw. 1/4 des Ansatzvolumens und Inkubation für 5 min bei 65 °C beendet. Die Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (s. 4.5.6).

In Abb. 6 ist beispielhaft das Bild eines Agarosegels, das mit Restriktionsprodukten der in den Transaktivierungsassays verwendeten Plasmide pBLCAT2/5xAP1 und pBLCAT2

beladen wurde, abgebildet. (Die erwarteten Fragmentlängen waren EcoRI-Verdau: ~1760bp, ~2702bp; XbaI-Verdau: ~4500 bp.)



**Abb. 6**      *Restriktionsverdau von pBLCAT2/5xAP1 und pBLCAT2*

#### 4.5.10.2      **Synthese von komplementärer DNA (cDNA)**

Die Synthese von cDNA erfolgt mit dem käuflichen Kit "SuperScript™ Preamplification System" der Firma Gibco BRL (Eggenstein, D) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Polymerase, die den zur RNA komplementären Erststrang synthetisiert, ist SuperScript II Ribonuklease H<sup>-</sup> (RNase H<sup>-</sup>) Reverse Transkriptase. Es handelt sich um eine gentechnisch hergestellte Reverse Transkriptase, die so verändert worden ist, daß die RNase H<sup>-</sup>-Aktivität nicht mehr vorhanden ist. Als Primer wurden ein Gemisch von Hexameren (Random Primer) mit zufälligen Sequenzen verwendet.

## Benötigte Reagenzien:

- 50 ng/µl Random Hexamere
- 10 x PCR-Puffer
- 25 mM Magnesiumchlorid
- 0,1 M Dithiothreitol (DTT)
- 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 200 Units/µl SuperScript II RT
- 2 Units/µl *E. coli* RNase H

## Durchführung:

Zur Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer wurden zuerst 1,6 µg RNA und 100 ng randomisierte Hexanukleotide in 12 µl H<sub>2</sub>O für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Folgender Reaktionsmix wurde angesetzt:

<i>Reaktionsmix</i>	<i>je Ansatz</i>	<i>Konzentration im Ansatz</i>
PCR-Puffer (10 x)	2 µl	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	2,5 mM
dNTP mix (je 10 mM)	1 µl	je 0,5 mM
0,1 M 1,4-Dithiothreitol DTT	2 µl	10 mM

Je 7 µl des Reaktionsmix wurden zu einer RNA-Probe gegeben, vorsichtig gemischt und bei 25 °C 5 min inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl 200 U/µl Superscript™ Reverse Transkriptase und Inkubation für 10 min bei RT wurde die Reaktion gestartet. Nach Mischen durch vorsichtiges Antippen wurde für 50 min bei 42 °C inkubiert und danach die Reaktion beendet, indem die Proben für 15 min auf 70 °C erhitzt wurden. Anschließend wurden die Proben zunächst auf Eis gestellt, um dann nach kurzer Zentrifugation und Zugabe von je 1 µl 2 U/µl RNase H<sup>-</sup> für 20 min bei 37 °C inkubiert zu werden. Dieser Schritt führt zur Entfernung von komplementärer RNA. Die cDNA wurde danach im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt. Wird diese cDNA als Matrize für PCR-Reaktionen verwendet, kann man 5 µl oder 10 µl einsetzen statt 1 µl im unverdünnten Fall. Dieses Vorgehen reduziert die Fehler durch Pipettierschritte von 1 µl-Mengen enorm.

Um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA bei der RNA-Isolierung zu entdecken, wurde bei jeder cDNA-Herstellung eine Probe angefertigt, der keine Reverse Transkriptase hinzugefügt, sonst aber identisch behandelt wurde.



#### 4.5.10.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Amplifikation von DNA *in vitro* aus geringsten Mengen genetischen Materials wurde 1985 von Kary Mullis [Saiki et al., 1985] beschrieben. Seitdem wird die Polymerasekettenreaktion besonders in der biologischen Grundlagenforschung, der medizinischen Diagnostik, der Humangenetik und Genomanalyse sowie der Gerichtsmedizin angewandt. Als Ausgangsmaterial dient Doppel-/Einzelstrang-DNA. Durch Erwärmen wird der Doppelstrang denaturiert und mit zwei kurzen Oligonukleotiden als Primer der DNA-Synthese, die die gesuchte Sequenz begrenzen, hybridisiert. Eine thermostabile Polymerase (Taq-Polymerase) verlängert anschließend die Primer. Der 5'-Primer sollte komplementär zum Plus-Strang und der 3'-Primer zum Minus-Strang sein. Die Reaktionen eines Zyklus, Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*) und DNA-Polymerisation laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Theoretisch wird die Anzahl der entstehenden DNA-Moleküle in jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt und somit steigt die neusynthetisierte DNA-Menge zunächst exponentiell. Dabei liefern die neu gebildeten DNA-Abschnitte im darauffolgenden Zyklus die Vorlagen für den Bau neuer Stränge (Kettenreaktion). Die exponentielle Phase geht aber praktisch nach einer unterschiedlich hohen Anzahl von Zyklen in eine Plateauphase über, in der die spezifische Amplifizierung zum Stillstand kommt. Nach ca. 20-35 Zyklen wird das Reaktionsprodukt über die Größe der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente analysiert. Alle PCR-Reaktionen dieser Arbeit wurden in einem Volumen von 50 µl in dem MultiCycler PTC-200 der Firma Biozym (Hess. Oldendorf, D) in Reaktionsgefäßen (0,6 ml) der Firma Eppendorf (Hamburg, D) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden getrennte Pipettensätze benutzt. Ein Pipettensatz wurde in einem gesondert dafür eingerichteten Raum nur für das Pipettieren von Primern, Puffer, H<sub>2</sub>O, und Taq-Polymerase verwendet. Nach Wechseln des Raumes wurde mit einer weiteren Pipette und Pipettenspitzen, die Aerosolfilter enthielten, Matrizen-DNA in den Reaktionsansatz gegeben. Bei der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) werden für die PCR-Amplifizierung cDNA-Moleküle als Matrizen-DNA verwendet. Um die verwendeten Lösungen auf Kontaminationen zu überprüfen, wurde für jedes Primer-Paar ein Reaktionsansatz pipettiert, der anstelle von cDNA H<sub>2</sub>O enthielt.

Ein Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen :

	<i>f. c.</i>	[ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O		22,25
10 x PCR Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)	50 mM	5
10 oder 20 $\mu$ M 5'-Primer	1 oder 2,0 $\mu$ M	5
10 oder 20 $\mu$ M 3'-Primer	1 oder 2,0 $\mu$ M	5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,5
10 mM dNTPs (je Nukleotid 10 mM)	0,2 mM	1
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1,25 U/50 $\mu$ l	0,25
Matrizen DNA (1:10 verdünnt)		10

Für eine Amplifizierung wurden die Schritte Hitzedenaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*) und DNA-Synthese zyklisch wiederholt.

Ein typisches PCR-Programm ist :

1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C	2 Zyklen
1 min 92 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C	20-37 Zyklen; die Verringerung der Denaturierungstemperatur auf 92 °C verlängert die Lebensdauer der Taq-DNA-Polymerase erheblich
1 min 94 °C, 10 min 72 °C	1 Zyklus; dieser Zyklus dient der Vervollständigung bereits begonnener DNA-Synthesen ( <i>final extension</i> ).
Abkühlen auf 4 °C	

Das hier dargestellte Zyklusprofil ist nur ein Beispiel. Für jedes in dieser Arbeit verwendete Primer-Paar wurden die Bedingungen optimiert, um eine größtmögliche Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion zu erreichen. Dabei hat es sich gezeigt, daß es nicht notwendig war, die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, die Primer-Konzentration oder die Nukleotid-Konzentration zu variieren. Variiert wurde meistens lediglich die *annealing*-Bedingungen (Temperatur/oder Zeit) sowie die Anzahl der Zyklen. Bei den *c-fos*-Primern wurde eine sogenannte „two-step-PCR“ durchgeführt. Hier wurde der Denaturierungsschritt von einem kombinierten *annealing*- und Syntheseschritt gefolgt. Dies bot sich dann an, wenn die *annealing*-

Temperatur über 63 °C lag. Die optimierten Bedingungen für die verwendeten Primerpaare sind in Kapitel 5.5 aufgeführt.

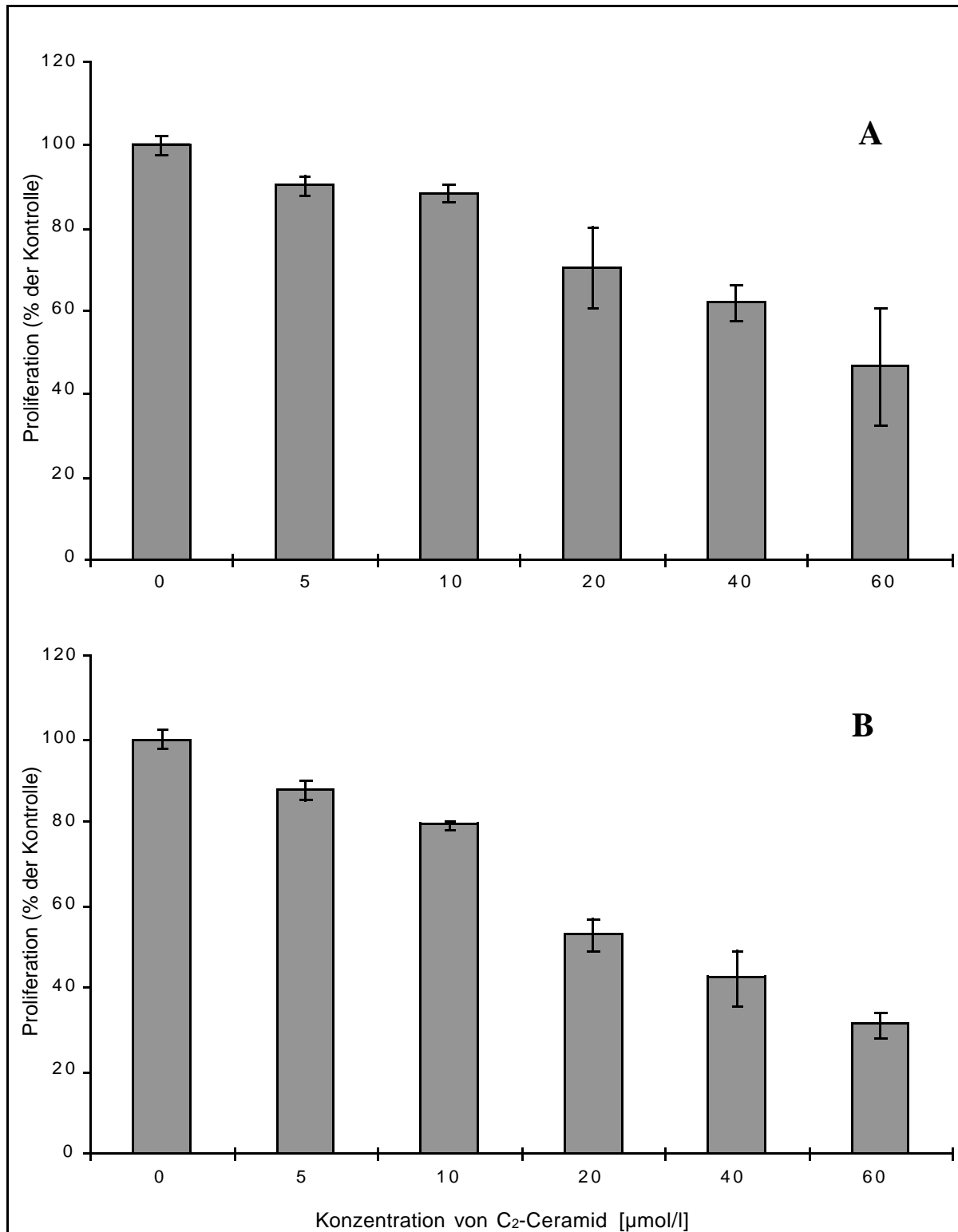
Im Anschluß an die PCR wurden in der Regel 9 µl des Reaktionsansatzes mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Dabei wurden 125 ng des Längenmarkers  $\phi$ x/HaeIII in eine separate Geltasche aufgetragen, um die Fragmentlänge der PCR-Amplifikate beurteilen zu können.

Die bei der Auswertung der Agarosegele bzw. Bandenintensitäten der untersuchten Apoptose-assoziierten Gene gewonnenen Densitometriedaten werden „normalisiert“, indem sie jeweils mit denen des Haushaltsgens *ribo S9* in das Verhältnis gesetzt werden. Dann werden die Werte der mit C<sub>2</sub>-Ceramid stimulierten Proben auf die zugehörigen Ethanolkontrollen bezogen, um die Genexpression als Induktionsfaktor auszudrücken (s. Tab 6).

## **5 ERGEBNISSE**

### **5.1.1 Effekt von C<sub>2</sub>-Ceramid auf die Proliferation von HaCaT-Zellen**

Um das Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen unter dem Einfluß von C<sub>2</sub>-Ceramid in serumfreiem Medium zu untersuchen, wurden in Teilung befindliche, also nicht konfluent gewachsene Zellen über 24 h bzw. 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von C<sub>2</sub>-Ceramid inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels der Kristallviolett-Methode quantifiziert (s. 4.2.1). Hierbei zeigte sich wie in Abb. 7 A + B dargestellt, daß C<sub>2</sub>-Ceramid bei beiden Inkubationszeiten einen konzentrationsabhängigen antiproliferativen Effekt ausübt. Schon in Konzentrationen von 5 µmol/l zeigte sich eine leichte Einschränkung des Proliferationsverhaltens von 10 % nach 24 h bzw. 12 % nach 48 h. Bei einer Konzentration von 20 µmol/l war die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle bereits um etwa 47 % nach 48 h reduziert. Die höchste in der vorliegenden Arbeit verwendete Konzentration von 60 µmol/l führte nach 48 h zu einer Hemmung der Zellproliferation in Höhe von 59 % der Kontrolle.



**Abb. 7** *Konzentrations- und zeitabhängiger Effekt von C<sub>2</sub>-Ceramid auf das Wachstum von HaCaT-Zellen.*

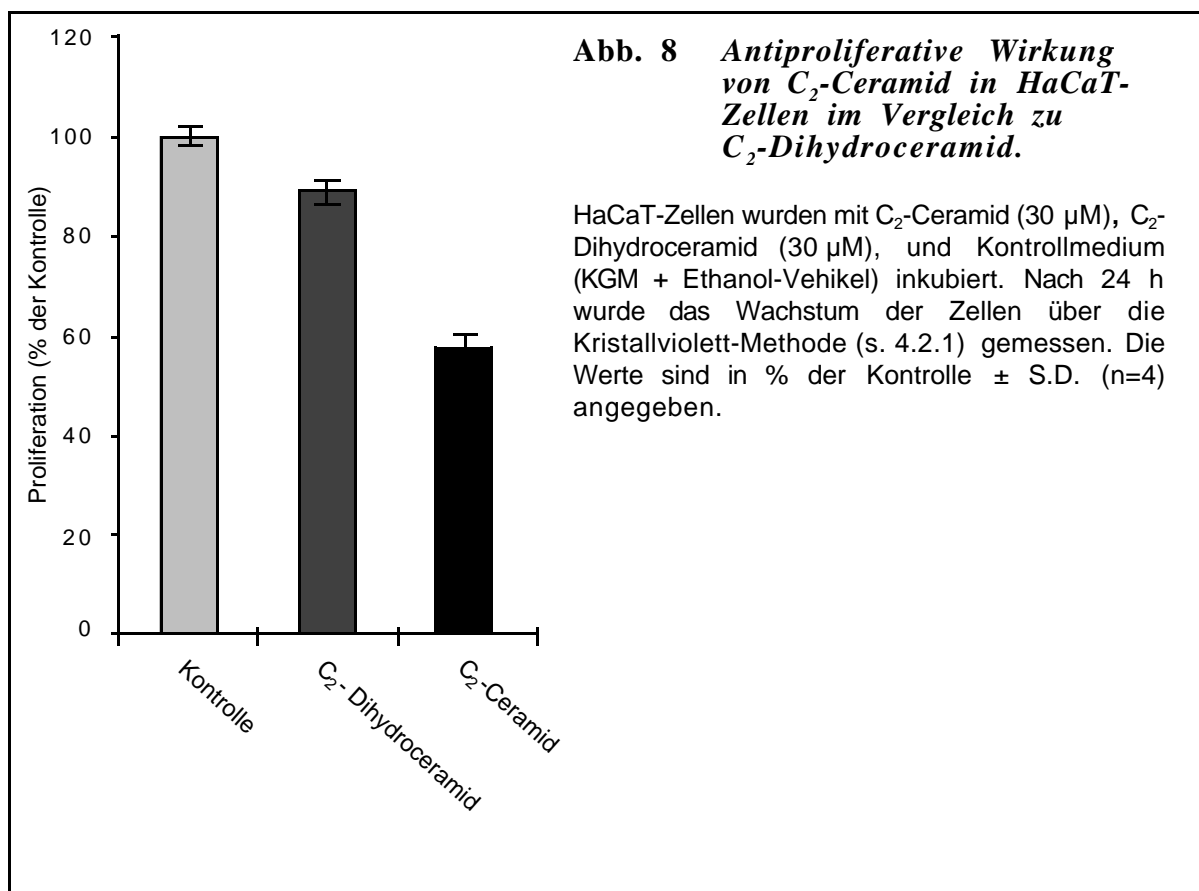
HaCaT-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von C<sub>2</sub>-Ceramid behandelt. Nach 24 h (A) bzw. nach 48 h (B) wurde das Wachstum der Zellen über die Kristallviolett-Methode (s. 4.2.1) bestimmt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen und werden als % der Kontrolle ± S.D. (n=4) angegeben.

### 5.1.2 Effekt von C<sub>2</sub>-Dihydroceramid auf die Proliferation von HaCaT-Zellen

Bielawska et al. haben das Ceramid-Analogon Dihydroceramid als sinnvolle Negativkontrolle beschrieben, wenn es um den Nachweis der spezifischen biologischen Wirksamkeit von Ceramid-Analoga geht [Bielawska et al., 1993].

Es galt nun die spezifische biologische Wirksamkeit von C<sub>2</sub>-Ceramid herauszustellen, indem es in einer Proliferationsmessung dem biologisch inaktiven Ceramid-Analogon C<sub>2</sub>-Dihydroceramid in der nicht zytotoxischen Konzentration von 30 µmol/l gegenübergestellt wurde. C<sub>2</sub>-Dihydroceramid fehlt die für die biologische Funktion wichtige trans-Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 4 und 5 im Sphingosinrückgrat des Ceramids (s. 1.3.6).

Für die Messung der Proliferation wurde die schon beschriebene Kristallviolett-Methode durchgeführt. Abb. 8 zeigt, daß bei äquimolarer Konzentration von C<sub>2</sub>-Ceramid und C<sub>2</sub>-Dihydroceramid die Proliferationsrate bereits nach 24 h deutlich (um 43 %) reduziert war. Im Gegensatz dazu war Dihydroceramid in nur geringem Maße (um 11 %) in der Lage, die Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle zu hemmen. C<sub>2</sub>-Ceramid hat einen deutlich stärkeren antiproliferativen Effekt als das C<sub>2</sub>-Dihydroceramid. Allerdings erwies sich das als Negativkontrolle vorgesehene C<sub>2</sub>-Dihydroceramid selbst als geringgradig antiproliferativ im Vergleich zu den Kontrollen.

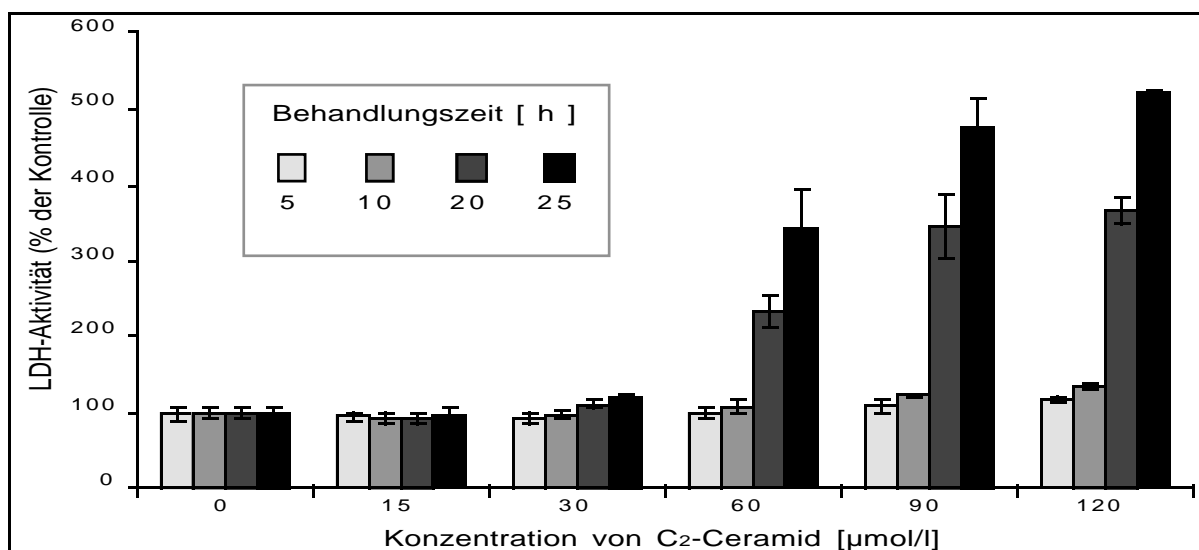


## 5.2 Zytotoxizität von C<sub>2</sub>-Ceramid auf HaCaT-Zellen

In einem nächsten Schritt war es notwendig herauszufinden, ob und bis zu welcher Konzentration die gemessene antiproliferative Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid nicht auf unspezifischen Effekten wie z.B. Detergenzeffekten beruht. Die hierzu durchgeführten LDH-Assays sollten helfen, den Konzentrationsbereich herauszufinden, der antiproliferativ wirksam ist, die Viabilität von HaCaT-Zellen aber nur unwesentlich bzw. nicht einschränkt. Bei Zellen, deren Plasmamembran z.B. infolge eines Agens in zytotoxischen Konzentrationen geschädigt wird, gelangt zytosolische Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellkulturüberstand und kann dort im Rahmen eines LDH-Assay nach einer kolorimetrischen Reaktion im ELISA-Photometer quantifiziert werden. Die Menge an gemessener LDH, die im folgenden Versuch als relative LDH-Aktivität angegeben wird, ist proportional zum zytotoxischen Potential des betreffenden Agens und damit auch zur Reduktion der Viabilität.

Es zeigte sich, wie in Abb. 9 dargestellt, daß C<sub>2</sub>-Ceramid in Konzentrationen bis zu 30 µmol/l nach 10 h keinen und nach 20 h bzw. 25 h nur sehr schwachen relativen Anstieg der LDH-Aktivität verursacht. Höhere Konzentrationen an C<sub>2</sub>-Ceramid vermögen erst ab einer Inkubationszeit von 20 h die LDH-Aktivität deutlich gegenüber der Kontrolle zu erhöhen. Das als Positivkontrolle in einer Konzentration von 0,2 % (v/v) verwendete Detergenz Triton (nicht abgebildet) steigerte die LDH-Aktivität im Kulturüberstand bereits nach 5 min um etwa 400 % im Vergleich zur Kontrolle.

C<sub>2</sub>-Ceramid beeinflusst die Viabilität von HaCaT-Zellen in Konzentrationen bis zu 30 µmol/l nach einer 25 h Inkubation kaum. Deutliche zytotoxische Effekte wurden jedoch in Konzentration ab 60 µmol/l C<sub>2</sub>-Ceramid ab einer Behandlungsdauer von 20 h gemessen.

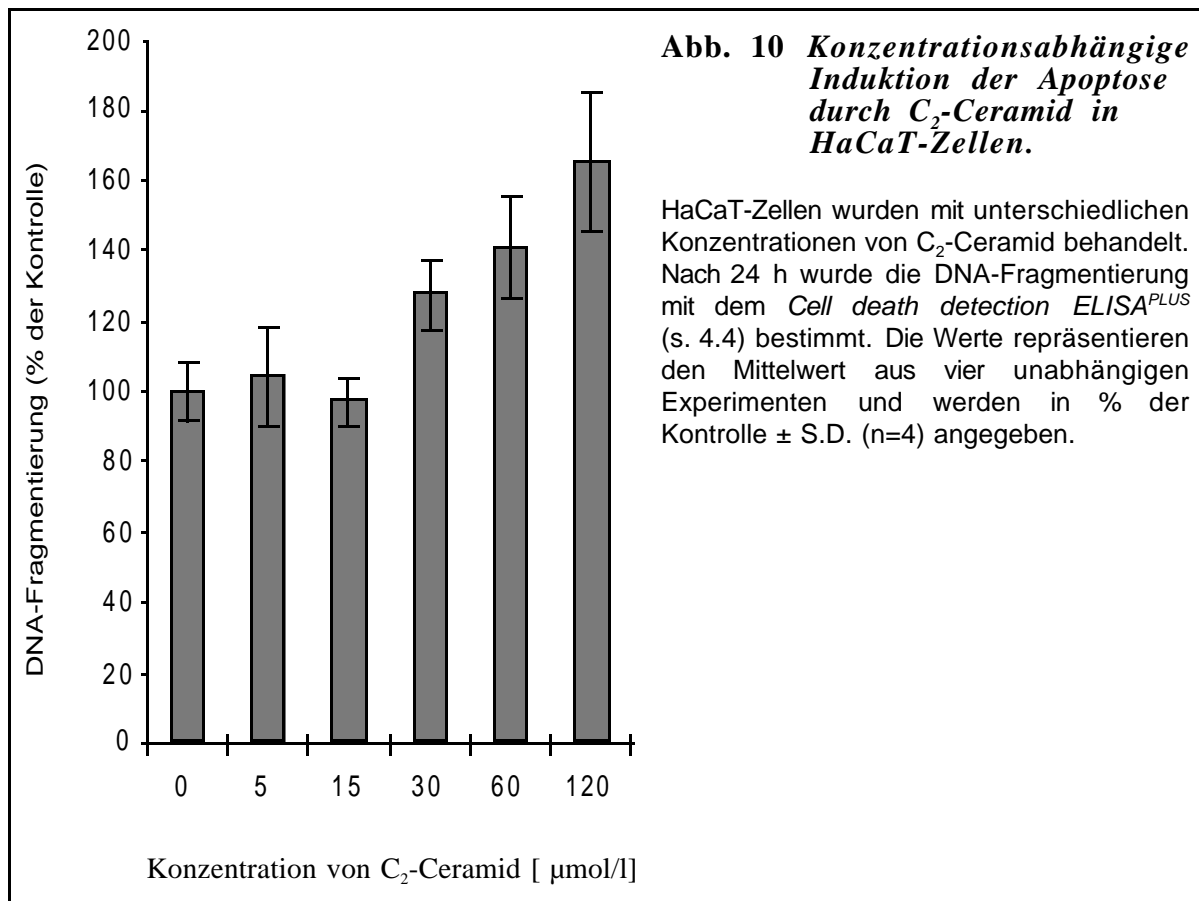


**Abb. 9** Messung der Zytotoxizität von C<sub>2</sub>-Ceramid auf HaCaT-Zellen.

HaCaT-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von C<sub>2</sub>-Ceramid behandelt. Nach 5 h, 10 h, 15 h und 24 h wurde im Zellkulturüberstand die Aktivität der Laktatdehydrogenase (s. 4.3) gemessen. Die Werte repräsentieren Vierfach-Werte und werden als % der Kontrolle ± S.D. (n=4) angegeben.

### 5.3 Apoptose-Messungen

Der Nachweis, ob  $C_2$ -Ceramid einen Einfluß auf die Apoptose hat, wurde mittels eines Test-Kits bestimmt, welcher zytoplasmatische Histon-assoziierte DNA-Fragmente (Nukleosomen) auf der Basis eines Sandwich-ELISA detektiert. Für die Versuche wurden HaCaT-Zellen nach einer 24 h Adaptationsphase in KGM 6 h mit ansteigenden Konzentrationen an  $C_2$ -Ceramid behandelt. Anschließend wurden Lysate für den ELISA hergestellt, in denen die Anreicherung von kurzkettigen Nukleosomen gemessen werden sollte. Die Ergebnisse der Untersuchungen in Abb. 10 zeigen eine erhöhte DNA-Fragmentierung ( $127 \pm 10\%$ ) im Vergleich zur Kontrolle ab einer  $C_2$ -Ceramid-Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$ . Bei zunehmenden Konzentrationen an  $C_2$ -Ceramid erhöhte sich auch die nachgewiesene Menge an DNA-Fragmenten. Neben einer antiproliferativen besitzt  $C_2$ -Ceramid somit auch eine apoptotische Wirkung ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{mol/l}$  in HaCaT-Zellen.

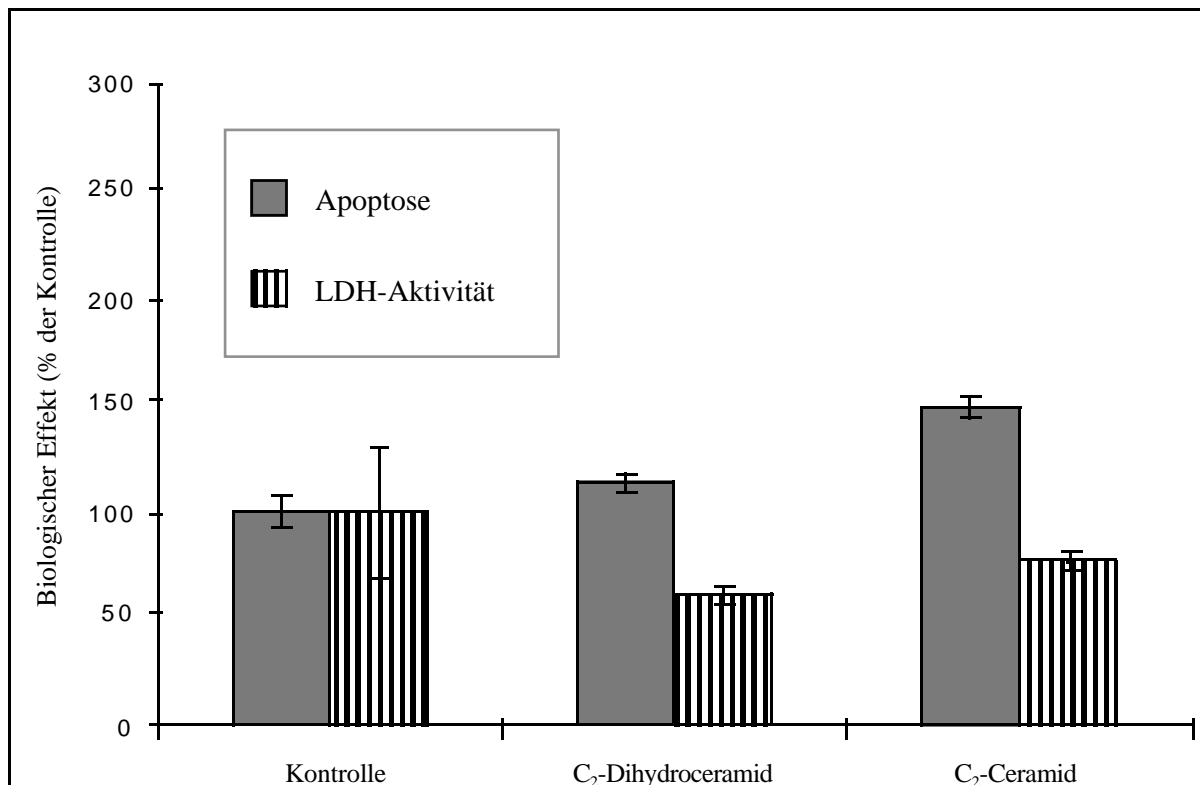


Im Folgenden wurden die beiden Ceramid-Analoga  $C_2$ -Ceramid und  $C_2$ -Dihydroceramid auch hinsichtlich ihres Potentials Apoptose auszulösen untersucht und verglichen. Aufbau und Bedingungen des Versuchs waren mit den in der Legende zu Abb. 10 beschriebenen identisch. Es wurde jedoch vor der Herstellung des Zelllysate bei allen Proben  $20 \mu\text{l}$  Medium aus dem Kulturüberstand pro Loch einer Zellkulturschale entnommen, um sie einer



Bestimmung der LDH-Aktivität mit Hilfe des LDH-Assay zu unterziehen. Die HaCaT-Zellen wurden 6 h mit  $C_2$ -Ceramid ( $30 \mu\text{mol/l}$ ) und  $C_2$ -Dihydroceramid ( $30 \mu\text{mol/l}$ )

Die Resultate in Abb. 11 lassen weder bei  $C_2$ -Ceramid noch bei  $C_2$ -Dihydroceramid behandelten Zellen eine erhöhte LDH-Aktivität gegenüber der mit Kontrollmedium behandelten Zellen erkennen. Allerdings unterscheidet sich die Apoptoserate bei  $C_2$ -Ceramid-behandelten Zellen mit ( $149 \pm 20 \%$ ) deutlich von der von  $C_2$ -Dihydroceramid ( $113 \pm 5 \%$ ). Während bei  $C_2$ -Ceramid eine deutliche Erhöhung der DNA-Fragmentierung festgestellt werden konnte, war die Apoptoserate bei den mit  $C_2$ -Dihydroceramid behandelten Zellen nur schwach erhöht.



**Abb. 11** *Zytotoxizität und Apoptose-Induktion von  $C_2$ -Ceramid im Vergleich zu  $C_2$ -Dihydroceramid.*

HaCaT-Zellen wurden mit  $30 \mu\text{M}$   $C_2$ -Ceramid,  $30 \mu\text{M}$   $C_2$ -Dihydroceramid und der Ethanolkontrolle (Kontrolle) inkubiert. Nach 24 h wurde die LDH-Aktivität im Zellüberstand (s. 4.3) und die DNA-Fragmentierung (s. 4.4) gemessen. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten und werden in % der Kontrolle  $\pm$  S.D. ( $n=4$ ) angegeben.

#### 5.4 Etablierung einer Methode zur Bestimmung C<sub>2</sub>-Ceramid-induzierter Genexpressionsänderungen

Der Nachweis von Genexpressionsänderungen kann mit verschiedenen Methoden geführt werden. In vorliegender Arbeit wurde die Transkription der zu untersuchenden Gene auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR untersucht.

Für den Nachweis Ceramid-induzierter Genexpression auf Ebene der mRNA mit Hilfe der RT-PCR erschien es wichtig, daß es mit dieser Methode möglich sein sollte, nicht nur grobe qualitative, sondern auch graduelle semiquantitative Aussagen über die Expressionänderungen eines Gens zu machen.

Dazu wurde in einem ersten Schritt versucht, schon beschriebene Experimente, die sich der RT-PCR als Methode zum Nachweis von Genexpressionsänderungen bedienten, nachzuvollziehen. Sawai et al. 1996 erfüllten in ihrem Experiment diesbezüglich vier für die vorliegende Arbeit wichtige Kriterien:

1. serumfreies arbeiten
2. semiquantitative Messung von Genexpression auf mRNA-Ebene
3. Stimulation von immortalisierten Zellen mit C<sub>2</sub>-Ceramid
4. Messung von Genexpressionsänderungen des Apoptose-assoziierten Gens *c-jun*.

In dieser Arbeit [Sawai et al., 1997] wurde u.a. nachgewiesen, daß C<sub>2</sub>-Ceramid in einer Konzentration von 5 µmol/l mRNA *c-jun* in HL-60 induziert. Nach 1 h erreichte die *c-jun*-Expression den 15 fachen Wert im Vergleich zur Kontrolle. Zu späteren Zeitpunkten sank die *c-jun*-Expression wieder.

Die Bestätigung dieser Ergebnisse sollte nicht zuletzt der Etablierung der RT-PCR für die vorliegende Arbeit dienen.

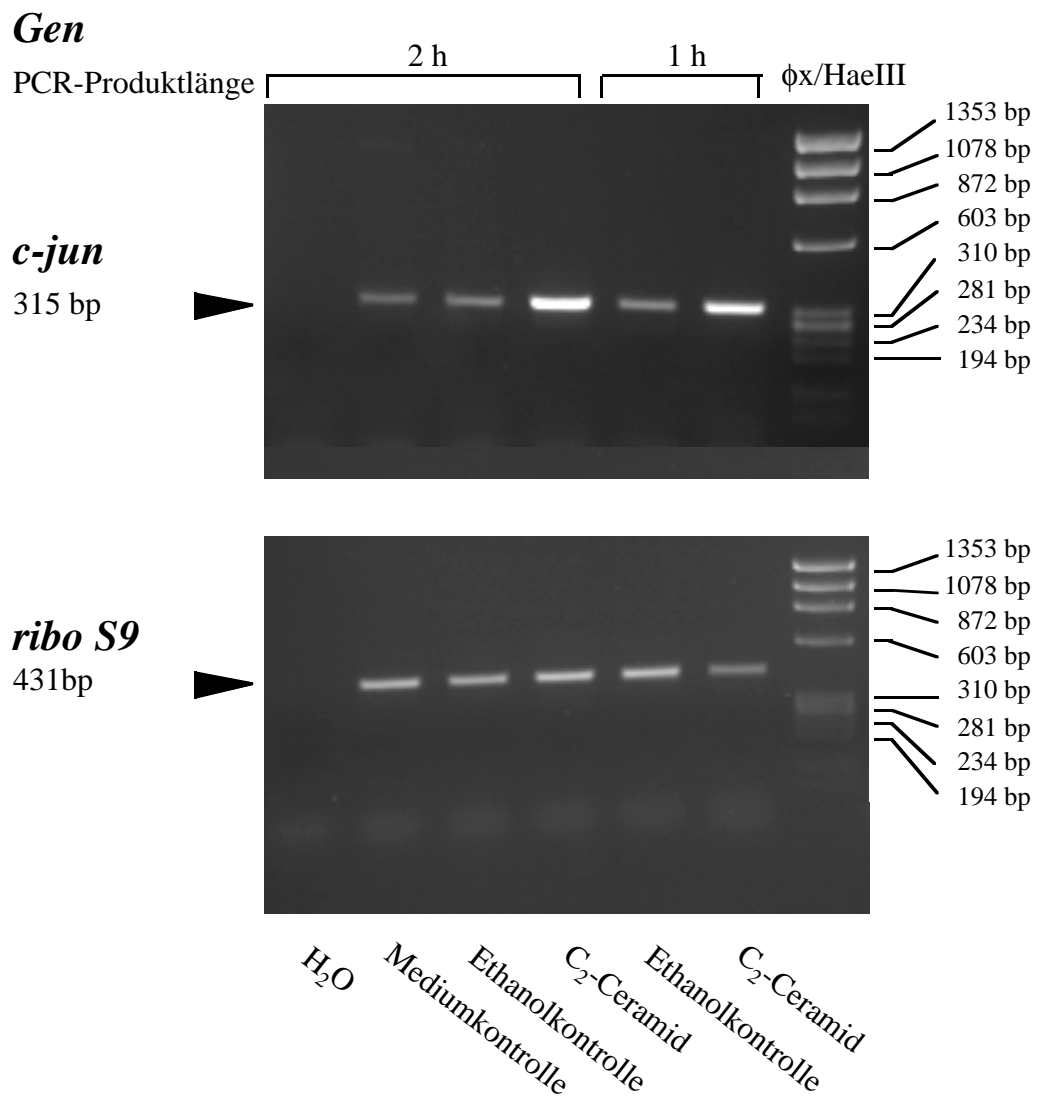
HL-60 Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in einer Konzentration von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml in serumfreies Medium ausgesät und über Nacht daran adaptiert. Danach erfolgte die Inkubation mit C<sub>2</sub>-Ceramid (5 µmol/l) und den Kontrollsubstanzen für 1 h bzw. 2 h mit sich anschließender Extraktion der Gesamt-RNA und cDNA-Synthese. Für die nachfolgende PCR wurde 1 µl unverdünnte cDNA als DNA-Matrize eingesetzt.

Jeweils 9 µl PCR-Produkt wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, über die Ethidiumbromid-Interkalation auf dem UV-Durchlichttisch sichtbar gemacht und durch eine Videodokumentation aufgenommen und digitalisiert. Die digitalisierten Signale wurden mit der Multi-Analyst Software (Bio-Rad, München, D) analysiert. Die gemessenen Werte von *c-jun* wurden mit denen des Haushaltsgens *ribo S9* (codiert für ein Protein der kleinen Ribosomenuntereinheit) normalisiert.

In Abb. 12 sind die Agarosegele der durchgeführten Experimente mit HL-60-Zellen abgebildet.

Die videodensitometrische Auswertung ergab nach 1 h etwa einen 14 fachen und nach 2 h einen 9 fachen Wert für *c-jun* im Vergleich zu den jeweiligen Ethanolkontrollen. Es war im

Vergleich dazu nach 2 h nur ein geringer Unterschied zwischen der Ethanol- und der Mediumkontrolle zu sehen.



**Abb. 12** *C<sub>2</sub>-Ceramid induziert in HL-60-Zellen das Apoptose-assoziierte Gen *c-jun* (RT-PCR).*

HL-60-Zellen wurden über Nacht an serumfreies Medium adaptiert und anschließend mit C<sub>2</sub>-Ceramid (5  $\mu$ mol/l) und den Kontrollen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bzw. 2 h wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen extrahiert und cDNA synthetisiert. Je 1  $\mu$ l cDNA diente als Matrize für eine PCR. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter dem UV-Durchlichttisch durch Ethidiumbromid-Interkalation sichtbar gemacht und mittels Videodensitometrie aufgenommen und ausgewertet.

## 5.5 Untersuchung der Expression Apoptose-assoziiierter Gene auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR in HaCaT-Zellen

Um die Transkription Apoptose-assoziiierter Gene in Keratinozyten nach Stimulation mit C<sub>2</sub>-Ceramid zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von A = 75 cm<sup>2</sup> in 12 ml RPMI-Medium ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % auf das serumfreie Keratinozytenmedium KGM gesetzt. Die Zellen wurden an dieses neue Medium 24 h adaptiert. Nach der Adaptationszeit erfolgte die Inkubation für 2 h, 6 h und 24 h mit C<sub>2</sub>-Ceramid (30 µmol/l) oder Ethanol. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA einer cDNA-Synthese unterzogen und die gewonnene cDNA als Matrize (jeweils 10 µl 1:10 verdünnter cDNA) in der sich anschließenden PCR unter den für das jeweilige Primerpaar optimierten Bedingungen (s. Tab. 5) eingesetzt.

Bei der Auswahl der Primer wurden unter anderem folgende Parameter beachtet, um eine spezifische Bindung der Primer an die cDNA und eine optimale Amplifizierung zu gewährleisten:

5'- und 3'-Primer wurden soweit möglich so ausgewählt, daß zwischen ihren Positionen Spleißstellen liegen, sie also in verschiedenen Exons lokalisiert sind. Hierdurch wird bewirkt, daß durch Amplifizierung kontaminierender genomischer DNA Amplifikate entstehen, die nicht der Länge amplifizierter cDNA entsprechen. Die Amplifikate eventuell amplifizierter genomischer DNA sind um die Länge der Intron-Sequenzen größer als die der amplifizierten cDNA. Eine Unterscheidung ist somit über den Längenvergleich der Amplifikate möglich. Dieses Verfahren ist sinnvoll, weil genomische DNA manchmal als Kontamination in einer RNA-Präparation enthalten ist, und fand für alle Gene außer *c-jun* Anwendung. Letzteres besitzt keine Introns und somit auch keine Spleißstellen.

Außerdem wurde bei der Auswahl der Primer mit Hilfe des Softwareprogramms Mac Molly™ versucht, die Hybridisierungstemperaturen (*annealing*-Temperatur) eines Primerpaares gleich zu halten und die Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie z.B. Primerdimere und eine 3'-Selbstkomplementarität zu vermeiden. In Vorversuchen wurde mit cDNA von HaCaT-Zellen für jedes Primerpaar die optimale Zykluszahl bestimmt, um zu gewährleisten, daß die Mengen an gewonnenen PCR-Produkten in dem Bereich der PCR-Reaktion entstehen, wo die Produktmenge exponentiell wächst.

Die optimierten Bedingungen für die verwendeten Primerpaare sind folgender Tabelle 5 zu entnehmen.

Untersuchtes Gen PCR-Primerpaar	erwartete Fragmentlänge	optimierte PCR-Bedingungen			
		Denaturierungstemperatur Denaturierungszeit	<i>annealing</i> -Temperatur <i>annealing</i> -Zeit	Extensionstemperatur Extensionszeit	Zyklusanzahl
<i>c-jun</i> 3'/5' <i>c-jun</i>	315 bp	92 °C 1 min	55 °C 1 min	72 °C 1 min	32
<i>c-fos</i> 3'/5' <i>c-fos</i>	869 bp	92 °C 45 sec	69 °C 1 min		28
<i>c-myc</i> 3'/5' <i>c-myc</i>	639 bp	92 °C 1 min	62 °C 1 min	72 °C 1 min	25
<i>bcl-2</i> 3'/5' <i>bcl-2</i>	320 bp	92 °C 1 min	65 °C 45 sec	72 °C 30 sec	37
<i>bax</i> 3'/5' <i>bax</i>	290 bp	92 °C 1 min	60 °C 45 sec	72 °C 30 sec	29
<i>capase 3</i> 3'/5' <i>capase 3</i>	410 bp	92 °C 1 min	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	27
<i>p53</i> 3'/5' <i>p53</i>	371 bp	92 °C 1 min	60 °C 45 sec	72 °C 2 min	25
<i>ribo S9</i> 3'/5' <i>ribo S9</i>	431 bp	92 °C 1 min	60 °C 1 min	72 °C 2 min	22

**Tab. 5 Optimierte PCR-Bedingungen für die Primer der untersuchten Apoptose-assoziierten Gene.**

Von Bedeutung erscheint, daß die angegebenen Bedingungen nicht in jedem Fall auf andere Cycler übertragbar sind. So müssen im Einzelfall Temperaturen, Zeiten oder die Anzahl der Zyklen bei Verwendung anderer Thermo-Cycler als dem PTC 200 der Firma Biozym verändert werden. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob die durch das Gerät angegebenen Temperaturen sich auf den Block oder auf die tatsächliche in der Probe vorherrschende Temperatur beziehen. Bei den hier angegebenen Bedingungen bezog sich das Gerät auf die Temperatur der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß unter Berücksichtigung von Probenvolumen und Gefäßwanddicke.

Bei allen Programmen betrug die Denaturierungstemperatur in den ersten zwei einleitenden Zyklen 94 °C, um eine effizientere Denaturierung der cDNA am Anfang der PCR zu gewährleisten. In den darauf folgenden Zyklen wurde die Denaturierungstemperatur um 2 °C auf 92 °C herabgesetzt. Auf diese Weise wurde die Lebensdauer der Taq-Polymerase erheblich verlängert.

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe von 2 %igen, ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen durch Sichtbarmachung der Banden auf dem UV-Durchlichttisch. Auf diese Weise konnten die Agarosegele mit Hilfe einer Videodokumentation aufgenommen und digitalisiert werden. In den Abb. 13a-h sind beispielhaft einige Gele abgebildet. Für die Auswertung wurden zwei unabhängige Experimente mit jeweils 3 fach Werten durchgeführt. Eine Bande, die der erwarteten Produktlänge entspricht, ist ein Nachweis für die Expression der entsprechenden mRNA. Der Wert der Bandenintensität nach Normalisierung mit *ribo S9* korreliert mit der mRNA-Menge des jeweiligen Gens. Die Ergebnisse aller Experimente wurden ausgewertet und sind in Tabelle 6 zusammenfassend dargestellt.

**Gen**

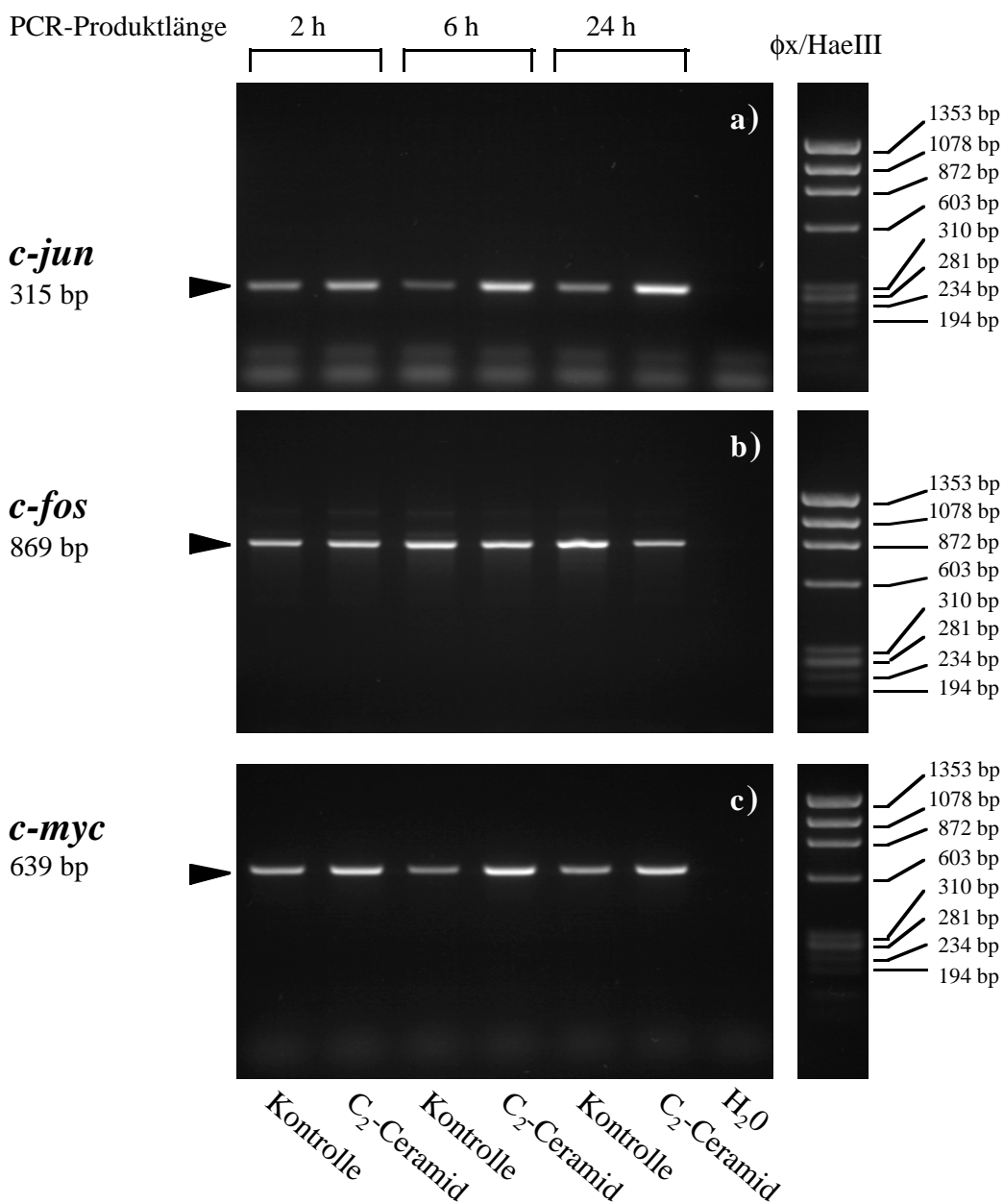


Abb. 13a-c

**Gen**

PCR-Produktlänge

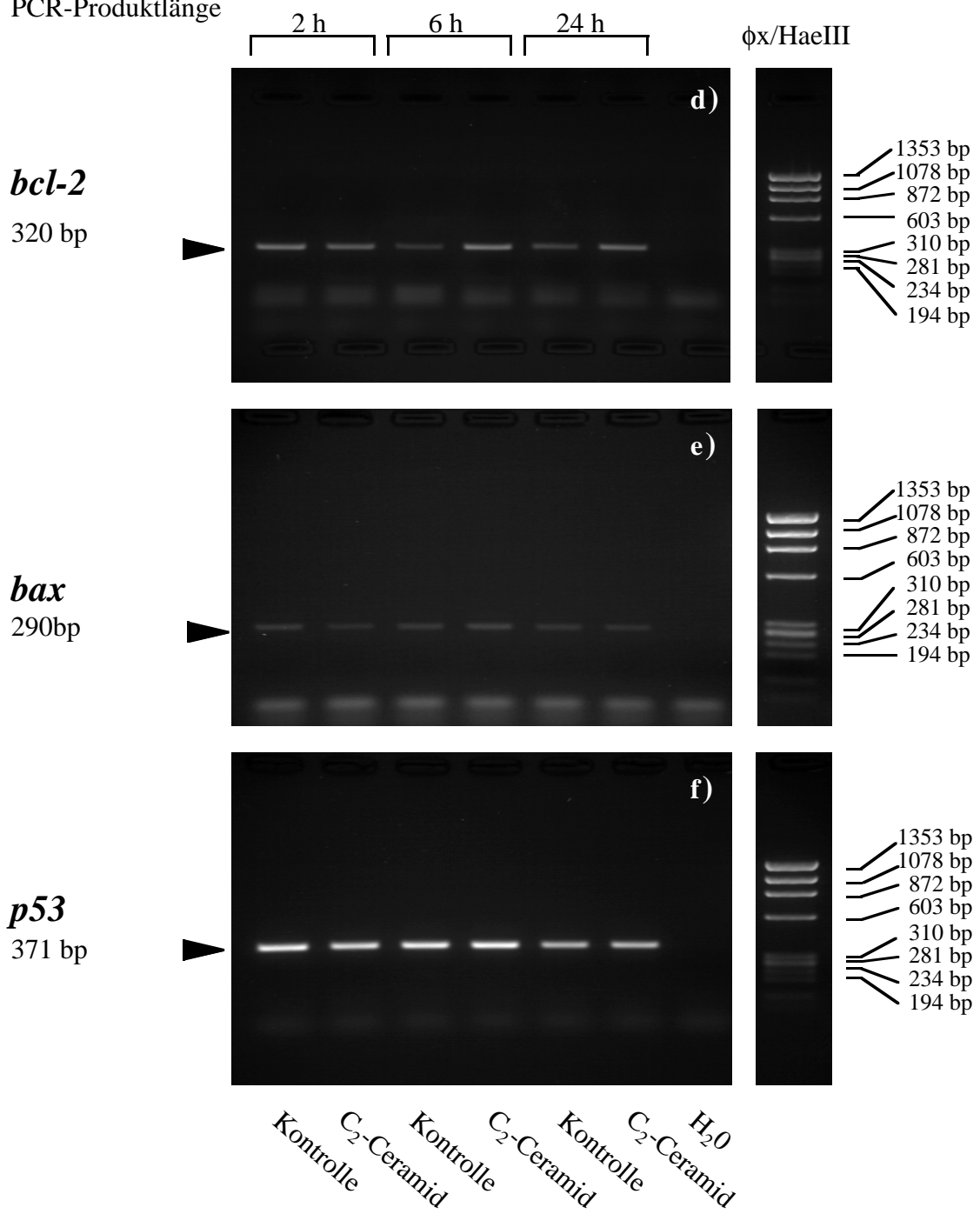
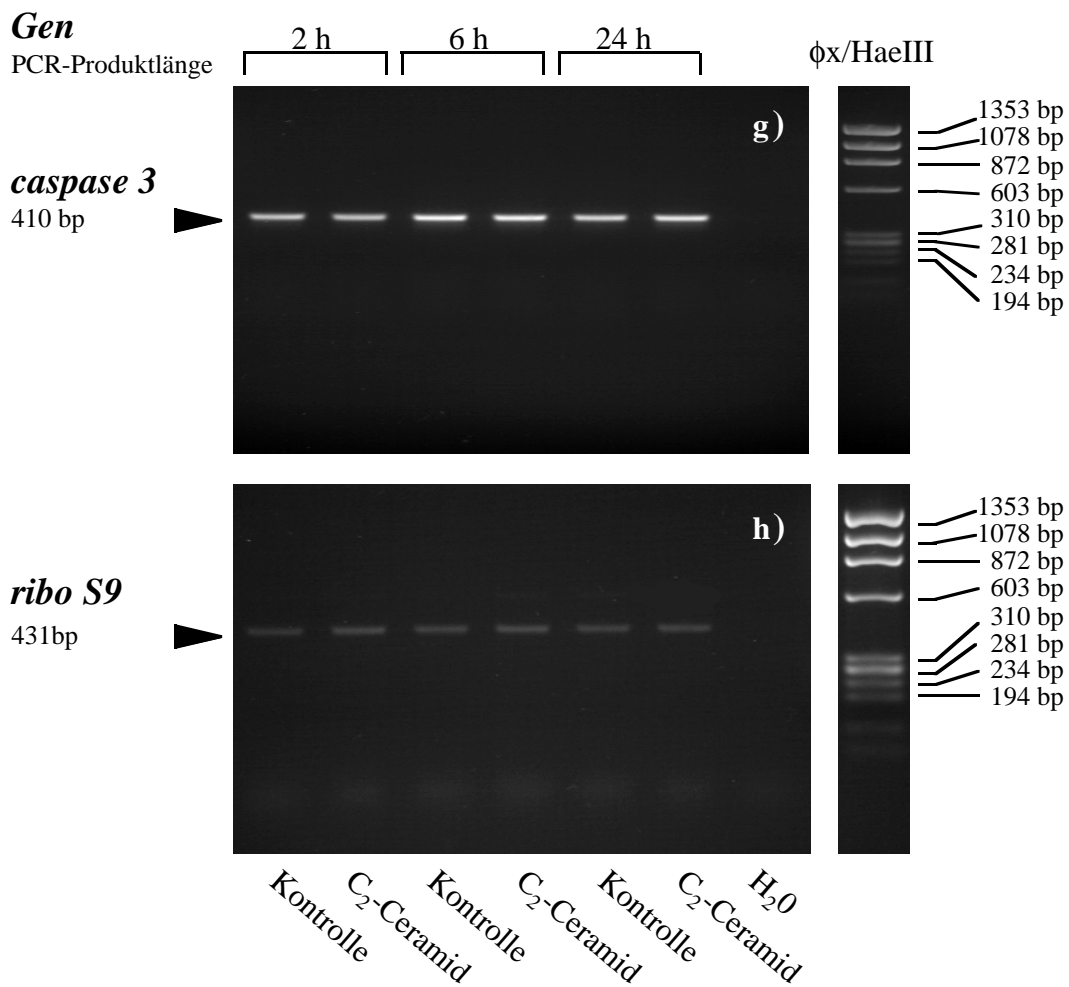


Abb. 13d-f



**Abb. 13a-h** Messung der Expression von Apoptose-assoziierten Genen in C<sub>2</sub>-Ceramid behandelten HaCaT-Zellen mittels RT-PCR.

Nach Kultivierung über Nacht in serumfreiem Medium (KGM) wurden HaCaT-Zellen für 2 h, 6 h und 24 h mit C<sub>2</sub>-Ceramid (30  $\mu$ M) oder mit Ethanol als Kontrolle behandelt. Nach der jeweiligen Behandlungszeit erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und PCR. Die PCR wurde mit Primerpaaren für *c-jun* (13a), *c-fos* (13b), *c-myc* (13c), *bcl-2* (13d), *bax* (13e), *p53* (13f), *caspase 3* (13g), und *ribo S9* (13h) durchgeführt. Die ersten 6 Spuren jedes Geles wurden mit PCR-Produkten beladen, die aus cDNA der angegebenen Inkubationszeiten mit C<sub>2</sub>-Ceramid oder Ethanol amplifiziert worden sind. Im Fall der siebten Spur wurde als doppelte Kontaminationskontrolle H<sub>2</sub>O oder RNA-Proben (nicht abgebildet) anstelle der Matrizen-cDNA für die PCR eingesetzt. Auf der achten Spur wurde jeweils der DNA-Längenmarker ( $\phi$ x/HaeIII) aufgetragen. Die Agarosegele wurden mit 9  $\mu$ l PCR-Produkt pro Tasche beladen. Die Färbung der Banden erfolgte durch Ethidiumbromid-Interkalation. Nach Sichtbarmachung auf einem UV-Durchlichttisch konnten die Agarosegele mit Hilfe einer Videodokumentation aufgenommen und digitalisiert werden, um dann die erhaltenen Signale semiquantitativ auszuwerten. Die Experimente wurden in Triplikaten zweimal wiederholt.



Reguliertes Gen	Zeit [ h ]	2	6	24
<i>c-jun</i>		↑	↑↑	↑↑↑
<i>c-fos</i>		●	↓	↓↓
<i>c-myc</i>		↑	↑↑	↑
<i>bcl-2</i>		●	↑	↑
<i>bax</i>		●	●	●
<i>caspase 3</i>		●	●	●
<i>p53</i>		●	●	●

↑↑↑ ≥ 3 x  
 ↑↑ = 2 - 3 x  
 ↑ = 1,5 - 2 x  
 ● = 1 x  
 ↓ = - 0,75 x  
 ↓↓ ≤ - 0,5 x

**Tab. 6 Messung der Expression von Apoptose-assoziierten Genen in C<sub>2</sub>-Ceramid-behandelten HaCaT-Zellen mittels RT-PCR.**

Nach Kultivierung über Nacht in serumfreiem Medium (KGM) wurden HaCaT-Zellen für 2 h, 6 h und 24 h mit C<sub>2</sub>-Ceramid (30 µM) und mit dem Vehikel Ethanol als Negativkontrolle behandelt. Nach der jeweiligen Behandlungszeit erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und PCR. Die Experimente wurden in Dreifach-Werten zweimal wiederholt. Die Expression der mRNA wurde semiquantitativ analysiert, indem die Expression der oben aufgeführten Gene jeweils mit der Expression des ribosomalen Proteins S9 normalisiert wurde. Die Pfeile geben den Unterschied der Expression der C<sub>2</sub>-Ceramid behandelten Zellen zu der Expression der Kontrollen wieder. Punkte zeigen an, daß es keine Expressionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle gab.

Zusammenfassend ließ sich auf der Basis einer semiquantitativen Analyse bei den Apoptose-assoziierten Genen *bax*, *caspase 3* und *p53* mittels RT-PCR keine Ceramid-induzierten Expressionsänderungen in den drei durchgeführten Inkubationszeiten im Vergleich zur Kontrolle feststellen.

Bei dem Gen *bcl-2* konnten nach 2 h Inkubationszeit ebenfalls keine Expressionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Jedoch waren nach einer Behandlungszeit von 6 h und 24 h geringe Expressionssteigerungen (Verdopplung) zu verzeichnen.

Dagegen induzierte C<sub>2</sub>-Ceramid *c-myc* nach allen drei Inkubationszeiten gering (1,5-2 fach) bis mittelgradig (2-3 fach), wobei ein Peak nach 6 h auffiel.

Die größten Expressionsteigerungen (bis zu 5 facher Wert der Kontrolle) wurden bei *c-jun* nach einer Inkubationszeit von 24 h gemessen. Hier konnten nach 2 h geringgradige (1,5-2 fach) und nach 6 h mittelgradige (2-3 fach) Erhöhungen der Expression gemessen werden.

*c-fos* stellte das einzige Gen dar, bei dem C<sub>2</sub>-Ceramid zu einer Erniedrigung der exprimierten mRNA-Mengen führte und dieses am deutlichsten nach einer Inkubationszeit von 24 h.

## **5.6 Untersuchung der C<sub>2</sub>-Ceramid-vermittelten Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1**

Die in der RT-PCR gemessene Induktion von *c-jun*-mRNA deutet auf die Bildung und Aktivierung von AP-1 hin. Da sich einer Transkription von *c-jun* nicht zwingend eine Translation und Aktivierung von AP-1-Komplexen anschließt, mußte die durch C<sub>2</sub>-Ceramid-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 in HaCaT-Zellen mit Hilfe eines Transaktivierungsassays untersucht werden.

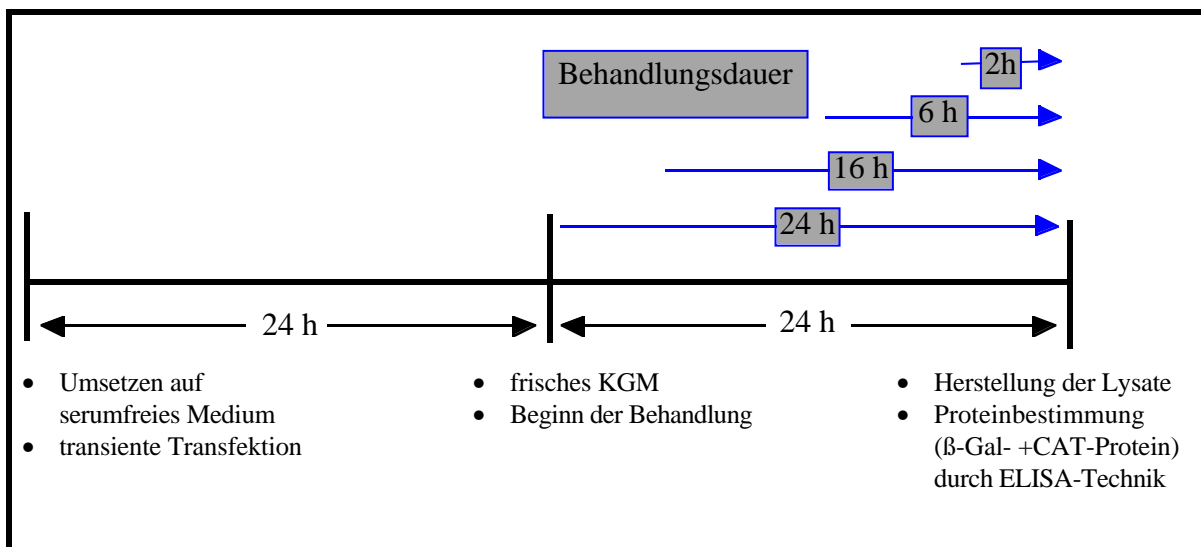
Dafür wurden HaCaT-Zellen bei einer Konfluenz von ca. 50 % transient mit den jeweiligen Plasmidkonstrukten transfiziert. Zwei Plasmidkonstrukte mit dem Reporter gen CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) wurden verwendet. In pBLCAT2 [Luckow and Schutz, 1987], welches als Vektorkontrolle diente, wird CAT unter Kontrolle des tk-Minimalpromotors exprimiert. In pBLCAT2/5xAP-1 [Nayeri et al., 1995] liegen 5 AP-1-Bindungsstellen stromaufwärts des tk-Minimalpromotors. Das Plasmid pCH110 enthält das lacZ-Gen als Reporter gen. Es kodiert eine  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal). In allen Experimenten wurde pCH110 cotransfiziert. In Abb. 15 sind die in den Transaktivierungsassays verwendeten Reporter gen plasmide schematisiert dargestellt.

Die Expression an  $\beta$ -Galaktosidase diente der Überwachung der Transfektionseffizienz und späteren Normalisierung der gemessenen Mengen an CAT-Protein. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit frischem serumfreien Medium versetzt und die Behandlung mit C<sub>2</sub>-Ceramid (30  $\mu$ mol/l), C<sub>2</sub>-Dihydroceramid (30  $\mu$ mol/l), oder dem Vehikel (0,8 % v/v Ethanol) begonnen. Die Vektorkontrollen wurden jeweils nur mit C<sub>2</sub>-Ceramid versetzt. Nach Inkubationszeiten von 2 h, 6 h, 16 h und 24 h wurden die Zellen lysiert. Es

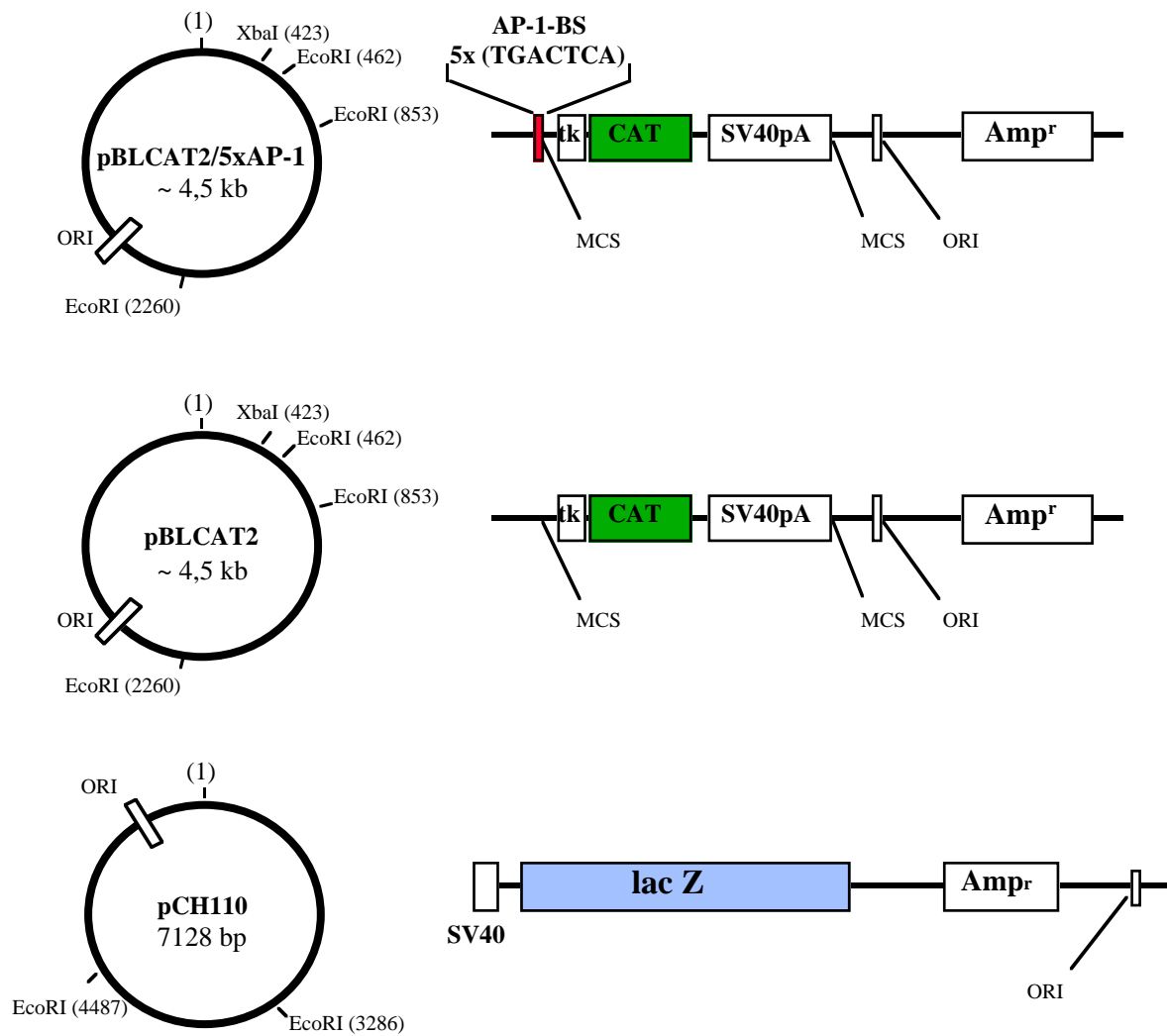
folgte die Bestimmung der  $\beta$ -Gal- und CAT-Mengen mit Hilfe von ELISA-Messungen (s. 4.5.9) aus jeder Probe. Die Abfolge von Umsetzen auf serumfreies Medium, Transfektion, Behandlung der Zellen und Herstellung der Lysate für die Proteinbestimmung wird in Abb. 14 verdeutlicht.

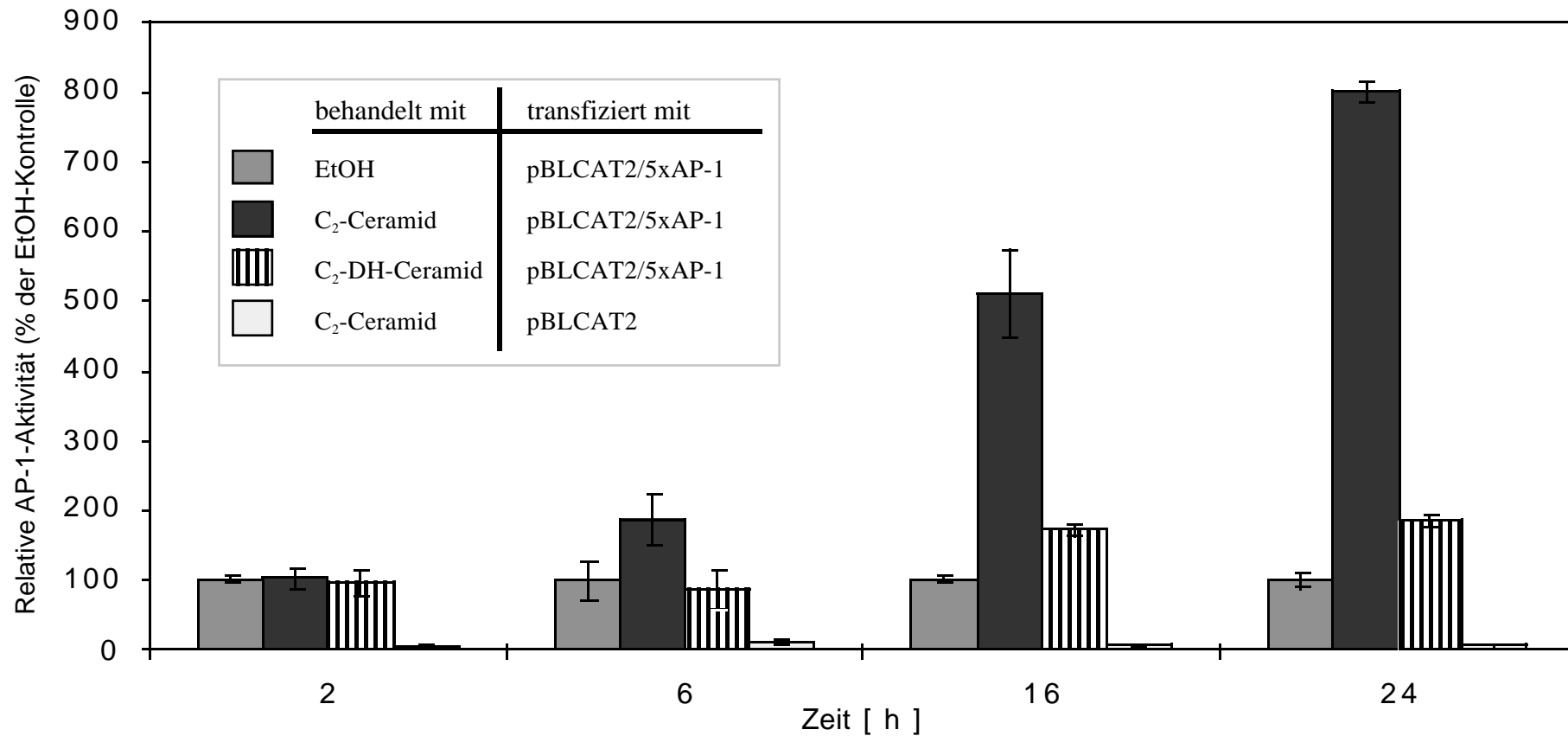
Die experimentellen Daten wurden normalisiert, indem jeweils die CAT-Menge in das Verhältnis zur  $\beta$ -Gal-Menge gesetzt wurde. Diese relative CAT-Menge ist direkt abhängig von der Bindung von AP-1 an die AP-1-Bindungsstelle stromaufwärts des tk-Minimalpromotors. In Abb. 16 wird diese als relative AP-1-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt.

**Abb. 14** *Behandlungsschema der Transaktivierungsassays.*



**Abb. 15** Für den Transaktivierungsassay verwendete Reporterplasmide.  
Schematisierte zirkuläre (links) und lineare (rechts) Darstellung.





**Abb. 16** Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1.

HaCaT-Zellen wurden in einer Konfluenz von 40-50% mit pBLCAT2/5xAP-1 sowie der Vektorkontrolle pBLCAT2 transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde mit der 24 h-Inkubation mit 30 µM C<sub>2</sub>-Ceramid, 30 µM C<sub>2</sub>-Dihydroceramid (C<sub>2</sub>-DH-Ceramid) und Ethanol als Kontrolle begonnen. Alle weiteren Behandlungszeiten wurden so gelegt, daß die Herstellung sämtlicher Zellysate für den CAT-ELISA 48 h nach der Transfektion erfolgte (s. Abb. 14). Die Kontrollen stellen die mit pBLCAT2/5xAP-1 transfizierten und mit Ethanol behandelten Zellen dar. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten und werden als % der Kontrolle ± S.D. (n=3) angegeben.

Weder C<sub>2</sub>-Ceramid noch C<sub>2</sub>-Dihydroceramid waren nach einer Behandlungszeit von 2 h in der Lage AP-1 zu aktivieren. Bei den Vektorkontrollen wurde eine relative AP-1-Aktivität von etwa 7 % zu jedem Zeitpunkt gemessen.

Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden nur bei C<sub>2</sub>-Ceramid behandelten Zellen eine eindeutige Erhöhung der AP-1-Aktivität in Höhe von 188 ±36 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Bei Inkubationszeiten von 16 h und 24 h erhöhten sowohl C<sub>2</sub>-Ceramid (511 ±63 % bzw. 799 ±15 % ) als auch C<sub>2</sub>-Dihydroceramid (172 ±8 % bzw. 186 ±7 %) die relative AP-1-Aktivität. Dabei war der Zuwachs der relativen AP-1-Aktivität zwischen der 16stündigen und der 24stündigen Inkubationszeit bei C<sub>2</sub>-Ceramid behandelten Zellen (+ 288 %) sehr viel größer als bei den C<sub>2</sub>-Dihydroceramid behandelten Zellen (+ 14 %).

Es konnte damit nachgewiesen werden, daß C<sub>2</sub>-Ceramid (30 µM) die AP-1-Aktivität in HaCaT-Zellen zeitabhängig steigert.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid auf Zellwachstum und Apoptose

Der Sphingomyelin-Zyklus wurde erst kürzlich in Keratinozyten nachgewiesen [Geilen et al., 1996]. In diesem Signaltransduktionsweg entsteht das Sphingolipid Ceramid, ein intrazellulärer Botenstoff, welcher in der Zelle Zellwachstumshemmung, Apoptose und Zelldifferenzierung als biologische Antworten auszulösen vermag [Hannun, 1994; Hannun und Obeid, 1995].

Bis dato wurde die Wirkung von Ceramid-Analoga auf Apoptose in humanen Keratinozyten nur in serumhaltigem Medium untersucht.

Sämtliche Experimente dieser Arbeit wurden in serumfreiem Medium durchgeführt, da die im Serum enthaltenen Faktoren wie z.B. das Komplementsystem bereits selbst Apoptose auslösen und so zu Artefakten bzw. verfälschten Ergebnissen führen können. So löst die Zugabe von Serum zu ruhenden Maus-Fibroblasten die Transkription der Apoptose-assoziierten Gene *c-fos* und *c-jun* aus. Die Erhöhung der Genexpression ist auf das im Serum enthaltene Protein SRF (*serum response factor*) zurückzuführen [Greenberg und Ziff, 1984]. Bei Experimenten in serumhaltigem Medium besteht somit die Gefahr, auch in den Kontrollen eine erhöhte basale Genaktivität bzw. eine erhöhte basale Apoptoserate zu messen. Die eindeutige Kausalität zwischen Stimulus und zellulärer Antwort kann verloren gehen. Als weiterer Nachteil können die eingesetzten Ceramid-Analoga von im Serum enthaltenen Proteinen wie z.B. dem Albumin gebunden werden. Dadurch wirkt nicht die im Kulturüberstand berechnete Konzentration des Agens, weil gebunden, auf die Zelle ein und kann von ihr auch nicht über die Zellmembran aufgenommen werden. Nicht zuletzt ist inzwischen die Durchführung von Versuchen mit Zellkulturen in serumfreiem Medium bei Veröffentlichungen zunehmend Standard. Dies macht den Vergleich von verschiedenen Zelllinien und Systemen leichter, da serumfreie Medien im Gegensatz zu serumhaltigen Medien eine definierte Menge an Wachstumsfaktoren und anderen Zusätzen enthalten. Um die Eiweißbindung des Ceramid-Analogons C<sub>2</sub>-Ceramid zu vermeiden und seine volle Wirkpotenz zu erhalten, erfolgten daher die Versuche zur Untersuchung des Einfluß von C<sub>2</sub>-Ceramid auf Wachstum und Apoptose in HaCaT-Zellen in dem Keratinozytenmedium KGM. Dieses Medium enthält kein Serum und hat sich für die Untersuchung von Wachstum und Differenzierung von Keratinozyten als geeignet erwiesen [Pillai et al., 1988].

Andererseits ist jedoch bekannt, daß ein Mangel an Wachstumsfaktoren, welcher aus dem Fehlen von Serum resultiert, einer der Effektoren sein kann, der den programmierten Zelltod induzieren kann [Thompson, 1995]. Deswegen wurden HaCaT-Zellen zunächst in serumhaltigem Medium gezogen und 24 h vor der Applikation von C<sub>2</sub>-Ceramid in KGM adaptiert.

Die Messung des Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen unter der Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid ergab eine dosisabhängige, mit höheren Konzentrationen zunehmende Hemmung

der Proliferation. Bereits nach 24 h, was ungefähr der Dauer eines Zellzyklus entspricht, betrug die Zellzahl der mit 5  $\mu\text{mol/l}$   $\text{C}_2$ -Ceramid behandelten Zellkulturen  $90 \pm 2$  % der Kontrollen. In einer Konzentration von 60  $\mu\text{mol/l}$   $\text{C}_2$ -Ceramid, der höchsten verwendeten Konzentration, betrug sie nur noch  $46 \pm 14$  % der Kontrollen (s. Abb. 7A). Die 48stündige Inkubation ergab ähnliche Ergebnisse, jedoch fiel die Proliferationshemmung erwartungsgemäß stärker aus (s. Abb. 7B). Die gemessene Zellzahl betrug teilweise bis zu 17,5 % weniger als bei der 24stündigen Inkubation. Die mit  $\text{C}_2$ -Ceramid durchgeführten Proliferationstests lassen eine konzentrationsabhängige, mit der Zeit zunehmende Proliferationshemmung in HaCaT-Zellen erkennen.

Bei der Messung des Proliferationsverhaltens wurde darauf geachtet, daß die Zelldichte bei Versuchsbeginn 50 % bei den Proliferationstests und 80 % bei den übrigen Tests nicht überstieg, denn dicht gewachsene Zellkulturen zeigen aufgrund der Kontaktinhibition nicht nur ein eingeschränktes Proliferationsverhalten, sondern beginnen auch zu differenzieren. Demgegenüber war die Wirkung des antiproliferativen Wirkstoffes um so größer, je geringer die Zelldichte bei Behandlungsbeginn war. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, daß bei niedrigerer Konfluenz im Verhältnis mehr Agens auf die einzelne Zelle einwirkt. Die konstante Zelldichte bei Versuchsbeginn war somit für die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse von großer Bedeutung.

Die bisher gewonnenen Resultate müssen dahingehend relativiert werden, daß der fast lineare Verlauf beider Diagramme der Proliferationstests (s. Abb. 1) aus den beiden Inkubationszeiten in den niedrigen Konzentrationen auf der antiproliferativen Wirkung von  $\text{C}_2$ -Ceramid, in höheren Konzentrationen aber auf unspezifischen Effekten beruhen kann. Der Einfluß auf die Proliferation wird mit der Kristallviolett-Methode nur indirekt über die Zellzahl gemessen. Somit könnte die scheinbare Proliferationshemmung in höheren Konzentrationen an  $\text{C}_2$ -Ceramid durch seine primär unspezifischen, zytotoxischen Eigenschaften mit nachfolgender Lyse der Zellen hervorgerufen werden. Die Messung der Aktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturüberstand, ein zytoplasmatisches Enzym, das nur bei einer lysierten Zellmembran in den Kulturüberstand gelangt, sollte klären, in welchem Konzentrationsbereich  $\text{C}_2$ -Ceramid antiproliferativ wirkt, ohne dabei die Zellviabilität einzuschränken. Die Menge an gemessener LDH-Aktivität korreliert dabei mit der Anzahl toter Zellen.

Die durchgeführten LDH-Assays ergaben in Konzentration bis 30  $\mu\text{mol/l}$   $\text{C}_2$ -Ceramid nur unwesentliche Steigerungen der im Kulturüberstand gemessenen LDH-Aktivität verglichen mit der Kontrolle. Erst in einer  $\text{C}_2$ -Ceramid-Konzentration von 60  $\mu\text{mol/l}$  nach einer Behandlungszeit von 20 h erhöhte sich die LDH-Aktivität deutlich auf  $233 \pm 20$  % der Kontrolle (s. Abb. 9). Lichtmikroskopisch zeigten die Zellen in den höheren Konzentrationen ab 60  $\mu\text{mol/l}$  starke morphologische Veränderungen, die einer Lyse entsprachen. Die gewonnenen Ergebnisse aus den Proliferationstests und den Zytotoxizitätstests lassen darauf schließen, daß  $\text{C}_2$ -Ceramid in Konzentrationen bis 30  $\mu\text{mol/l}$  antiproliferativ aber nicht lytisch wirkt. Die geringfügige Erhöhung der LDH-Aktivität in dieser Konzentration nach 25 h sind



auf Lyse der apoptotischen Körperchen zurückzuführen. *In vivo* werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und deswegen ohne lokale Entzündungsreaktion eliminiert. *In vitro* ist diese Art der Eliminierung nicht möglich. Deshalb kommt es hier letztendlich sehr spät zur Schwellung und Lyse der apoptotischen Körperchen. Ihre Auflösung ähnelt der Nekrose, daher die Bezeichnung „sekundäre Nekrose“, die in dieser Form nur *in vitro* auftritt.

Im Hinblick auf die Erfassung einer der wichtigsten Kriterien der Apoptose, die Intaktheit der äußeren Zellmembran, ist der LDH-Assay von großem Nutzen. Es ist jedoch denkbar, daß ein Mediator den Zelltod induziert, ohne die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen, wie es bei der Nekrose in einem frühen Stadium geschieht. Unter diesem Aspekt stellt der *Cell death detection ELISA<sup>PLUS</sup>* eine spezifische Methode dar, um den apoptotischen Zelltod zu detektieren. Er quantifiziert die DNA-Fragmentierung, eines der wichtigsten biochemischen Kennzeichen der Apoptose, bevor es zu Permeabilitätsveränderungen der Plasmamembran kommt (prälytische DNA-Fragmentierung).

C<sub>2</sub>-Ceramid erhöhte die DNA-Fragmentierung in HaCaT-Zellen bereits nach 6 h in einer Konzentration von 30 µmol/l auf 127 ±10 % im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 10). Mit zunehmenden Konzentrationen erhöhte sich auch die Menge an gemessenen DNA-Fragmenten bei gleicher Inkubationszeit. Entscheidend ist hierbei, daß der Test nur niedermolekulare zytoplasmatische, Histon-assoziierte Fragmente erfaßt und größere sowie vorzeitig in den Kulturüberstand abgegebene DNA-Fragmente von unregelmäßiger Länge, wie sie bei der Nekrose entstehen, zu keinen falsch positiven Ergebnissen bei der Quantifizierung der DNA-Fragmente führen können. Es muß hierbei außerdem berücksichtigt werden, daß die Anzahl der gemessenen DNA-Fragmente nicht zwangsläufig mit der Anzahl apoptotischer Zellen korrelieren muß, da einzelne in der Apoptose weit fortgeschrittene Zellen mehr DNA-Fragmente beinhalten können, als eine Gruppe von Zellen, die sich in einem initialen Stadium der Apoptose befinden. Für die Quantifizierung der Anzahl an apoptotischen Zellen müßte ein TUNEL-Assay angewendet werden. Das Prinzip dieses Testsystems ist der Nachweis von DNA-Bruchstücken über den Einbau von Digoxigenin-markiertem dUTP und dATP an den 3'-Enden mittels der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT). Anschließend folgt die Detektion mit fluoreszenzmarkierten Anti-Digoxigenin-Antikörpern. Apoptose kann von Nekrose durch diesen Test allerdings schlechter unterschieden werden als durch den ELISA.

Aufgrund der Daten, die aus den Untersuchungen zur Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid hinsichtlich der Viabilität, des Proliferationsverhaltens und der Apoptose in HaCaT-Zellen gewonnen wurden, erfolgten alle weiteren Experimente in einer C<sub>2</sub>-Ceramid-Konzentration von 30 µmol/l.

Die Spezifität der biologischen Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid sollte durch die Wiederholung der Tests zur Bestimmung des Proliferations- und Apoptoseverhaltens von HaCaT-Zellen mit C<sub>2</sub>-Dihydroceramid (*N*-Acetyldihydrosphingosin), einem weiteren Ceramid-Analagon, überprüft und untermauert werden. Dieses Analogon besitzt keine Doppelbindung zwischen C-Atom 4

und C-Atom 5 (s. Abb. 6) und ist daher biologisch unwirksam [Bielawska et al., 1993]. Bei der Messung der Zellproliferation zeigte sich jedoch, daß C<sub>2</sub>-Dihydroceramid eine geringe antiproliferative Wirkung in diesem System auf HaCaT-Zellen hat. Seine Proliferationshemmung nach 24 h betrug etwa 12 % der Kontrolle, während die von C<sub>2</sub>-Ceramid mit etwa 43 % der Kontrolle im Vergleich viel stärker ausfiel (s. Abb. 8). C<sub>2</sub>-Dihydroceramid induzierte ebenfalls, wenn auch minimal, nach 6 h in Höhe von 113 ± 5 % der Kontrolle DNA-Fragmentierung (s. Abb. 11). Auch hier lag damit die Induktion durch C<sub>2</sub>-Ceramid mit 149 ± 20 % der Kontrolle deutlich über der von C<sub>2</sub>-Dihydroceramid. Die parallel durchgeführte Messung der LDH-Aktivität im Überstand ergab keine höheren Werte als bei den Kontrollen. Da beide Analoga in etwa gleich schnell in die Zelle aufgenommen werden, kann eine bessere Membrangängigkeit die größere biologische Wirksamkeit von C<sub>2</sub>-Ceramid nicht erklären [Bielawska et al., 1993]. Vielmehr ist es wahrscheinlicher, daß C<sub>2</sub>-Dihydroceramid, das in der Ceramid-*de novo*-Synthese direkt vor Ceramid steht [Merrill et al., 1986; Rother et al., 1992], nach Aufnahme in die Zelle durch die Dihydroceramid-Desaturase oxidiert wird, und das wirksame C<sub>2</sub>-Ceramid entsteht. C<sub>2</sub>-Dihydroceramid kann zu C<sub>2</sub>-Ceramid, Dihydrosphingomyelin, Dihydroglucosylceramid und anderen Sphingolipiden verstoffwechselt werden [Kok et al., 1997] und daher muß der Umbau von C<sub>2</sub>-Dihydroceramid zu C<sub>2</sub>-Ceramid nicht die einzige Variante im Metabolismus von C<sub>2</sub>-Dihydroceramid sein. Es war daher in unserem System als Negativkontrolle nur eingeschränkt geeignet.

### 6.2.1 Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid auf Apoptose-assoziierte Gene

Ein weiteres Ziel der Untersuchungen bestand darin, den Einfluß von C<sub>2</sub>-Ceramid auf die Expression Apoptose-assoziiierter Gene *bcl-2*, *bax*, *caspase 3*, *p53*, *c-myc*, *c-jun* und *c-fos* mittels RT-PCR zu untersuchen. Die Messung von Genexpressionsänderungen nach drei verschiedenen Zeitpunkten sollte helfen, ein oder mehrere Zeitfenster zu treffen, in denen mögliche Veränderungen der Genaktivität meßbar sein würden. Im Rahmen der Etablierung einer Methode zur Messung von Expressionsänderungen apoptotischer Gene mittels RT-PCR konnte in Vorversuchen nachgewiesen werden, daß C<sub>2</sub>-Ceramid in HL-60-Zellen die Expression von *c-jun* nach 1 h um etwa das 14 fache und nach 2 h um etwa das 9 fache steigerte. Der erste Meßzeitpunkt nach 2 h erschien deshalb auch in C<sub>2</sub>-Ceramid-stimulierten HaCaT-Zellen sinnvoll. Der Behandlungszeitraum von 6 h entsprach dem frühesten Zeitpunkt, an dem wir induzierte DNA-Fragmentierung in HaCaT-Zellen messen konnten. Schließlich wurde der Meßzeitpunkt nach 24 h als Zeitraum eines Zellzyklus ausgewählt. Letztendlich sollte die Untersuchung von Genaktivitäten auch Hinweise darauf geben, ob die durch Ceramid-induzierte Apoptose in humanen Keratinozyten einer Transkription von Genen bedarf, oder nur auf die schon existierende Apoptose-Maschinerie in Form der aus Proenzymen bestehenden Caspasen-Kaskade zurückgreift.

Die Untersuchung der Gene *bcl-2* und *bax* als Vertreter der *bcl-2*-Familie ergaben bei *bax* keine Expressionsveränderungen zu keinem der drei ausgewählten Meßzeitpunkte während bei *bcl-2* nach 6 h und 24 h geringgradige (1,5-2 fache) Expressionssteigerungen zu verzeichnen waren. Nach dem Gleichgewichtsmodell [Yang und Korsmeyer, 1996] ist das Schicksal einer Zelle vom Verhältnis zwischen Apoptose-Stimulatoren wie Bax und Apoptose-Inhibitoren wie Bcl-2 abhängig. Demnach würde die verstärkte Expression von Bcl-2-Proteinen die Bildung von pro-apoptotischen Bax-Homodimeren reduzieren und die Bildung von anti-apoptotischen Bcl-2/Bax-Heterodimeren begünstigen. Die Tatsache, daß HaCaT-Zellen trotz der vermehrten Transkription bei unveränderter Transkription von Bax in Apoptose gehen, könnte auf der vergleichsweise geringen Erhöhung der *bcl-2*-Expression beruhen. Gestützt wird diese Annahme durch Experimente unserer Arbeitsgruppe, in denen durch eine 5 fache Erhöhung der *bcl-2*-Genexpression mit Hilfe eines *bcl-2*-Expressionsvektors die Ceramid-induzierte Apoptose in HaCaT-Zellen verhindert werden konnte [Müller-Wieprecht et al., eingereicht]. Eine weitere Erklärung wäre die Aktivität von anderen pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (s. 1.3.2).

Glaubte man ursprünglich, daß die *de novo*-Proteinsynthese für alle Formen des programmierten Zelltodes essentiell ist [Ellis et al., 1991b], so weiß man heute, daß die Apoptose-Maschinerie in allen eukaryotischen Zellen schon vorangelegt ist und für ihre Aktivierung in vielen Fällen keine neue Proteinsynthese notwendig ist [Raff, 1992; Martin, 1993]. Dieses Wissen deckt sich mit den Ergebnissen der RT-PCR mit den verwendeten *caspase 3*-Primern. Die Caspase 3 gehört als Effektor-Caspase zur Apoptose-Maschinerie und liegt als inaktives Proenzym in der Zelle vor. Daher ist bei einer induzierten Apoptose die Aktivierung des Enzyms, nicht aber die Transkription des *caspase 3*-Gens über das basale Niveau von unstimulierten Zellen hinaus für den Ablauf des programmierten Zelltodes erforderlich.

Die Menge an *c-myc*-Transkripten wurde nach Stimulation von HaCaT-Zellen mit C<sub>2</sub>-Ceramid nach 2 h und 24 h etwa verdoppelt und nach 6 h betragen sie etwa das 2,7 fache gegenüber den Kontrollen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Wolff et al. durchgeführten Experimenten, die eine verminderte Expression von *c-myc* nach Behandlung mit C<sub>2</sub>-Ceramid in HL-60-Zellen feststellten [Wolff et al., 1994]. Andere Studien weisen darauf hin, daß es sich hier um ein zelltypspezifisches Phänomen handelt, denn die Herabregulierung von *c-myc*-mRNA basiert demnach nicht auf der Aktivierung der CAPP, eines der direkten Zielmoleküle von Ceramid, sondern auf einer unspezifischen Hemmung der RNA-Polymerase nach Behandlung der Zellen mit Agenzien, die differenzierend wirken [Krumm et al., 1992; Strobl und Eick, 1992]. In verschiedenen Arbeiten wurde zum einen eine erniedrigte Expression [Fischer et al., 1994; Helmberg et al., 1995; Kaptein et al., 1996], zum anderen eine erhöhte Expression [Vastrik et al., 1994; Packham und Cleveland, 1995] von *c-myc* mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht. Aus diesen Arbeiten geht hervor, daß die Kulturbedingungen einen entscheidenden Einfluß auf den Wirkungsmechanismus von c-Myc haben und bei einem limitierten Angebot von

Wachstumsfaktoren, wie es bei Kultivierung in serumfreiem Medium der Fall ist, Apoptose über eine erhöhte Expression von *c-myc* eingeleitet wird. In Anbetracht der Mutation von *p53* in der HaCaT-Zelllinie (s.u.) ist von den in Abb. 2 (s. 1.3.5) dargestellten möglichen Wirkungsmechanismen bei HaCaT-Zellen in serumfreiem Medium die Induktion durch eine bestimmte Gruppe von Apoptose-assoziierten Genen, unabhängig von *p53*, wahrscheinlicher. Weitere Untersuchungen der möglichen Partner von c-Myc sind notwendig, um die molekularen Mechanismen der Aktivierung von Apoptose-assoziierten Genen durch *c-myc* besser zu verstehen.

Bei dem Gen *p53* waren mit der RT-PCR keine wesentlichen Expressionsänderungen im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß in HaCaT-Zellen beide Allele von *p53* mutiert sind. Man nimmt an, daß diese Mutationen für die spontane Immortalisierung dieser Zelllinie mitverantwortlich sind [Boukamp et al., 1997]. Im Gegensatz zu anderen Keratinozytenzelllinien, die durch Infektion mit SV40 (*simian-virus 40*) immortalisiert wurden, weisen HaCaT-Zellen ein regelmäßiges Wachstum und eine unveränderte Differenzierung auf [Boukamp et al., 1988]. Sie besitzen keinen für Tumorzellen typischen Phänotyp und behalten ihr genomisches Gleichgewicht bis zu einer hohen Passagenzahl bei [Boukamp et al., 1997]. Wegen der Schwierigkeiten in der Kultivierung von primären Keratinozyten, die zwischen den einzelnen Passagen zum Teil sehr große Unterschiede in Wachstum und Differenzierung aufweisen und deswegen für die Durchführung von Experimenten nur in der 1. und 2. Passage verwendet werden können, wurden HaCaT-Zellen für Experimente bevorzugt und der Nachteil eines mutierten Gens *p53* in Kauf genommen. Der Einfluß des veränderten p53-Proteins in HaCaT-Zellen auf den Ablauf der Apoptose bleibt unklar und wird in der Literatur nicht näher beschrieben. Es wurde aber in mehreren Zelllinien eine Ceramid-induzierte Apoptose beschrieben, die unabhängig von *p53* verläuft [Santana et al., 1996; Esteve et al., 1998; Yount et al., 1999]. Dies wäre auch für die Ceramid-induzierte Apoptose in HaCaT-Zellen vorstellbar, da die Transkription von *p53* meßbar war und eine induzierte Transkription von dem mutierten Gen nicht beeinflußt werden dürfte.

### 6.2.2 Wirkung von C<sub>2</sub>-Ceramid auf die Expression von AP-1

Die Wirkung von Ceramid auf die Expression der Gene *c-jun* und *c-fos*, deren Genprodukte als Heterodimer den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden, ergab entgegengesetzte Resultate. *C-jun* wurde nach 2 h auf etwa den 1,8 fachen Wert, nach 6 h auf etwa den 2-3 fachen Wert und nach 24 h auf etwa den 3,5-5 fachen Wert gegenüber den Kontrollen induziert. Die Expression von *c-fos* hingegen veränderte sich nach 2 h kaum, reduzierte sich dann aber nach 6 h und 24 h auf etwa 70 % bzw. weniger als 50 % der Kontrollen. Diese Ergebnisse lassen auf eine langanhaltende und kontinuierliche Zunahme der *c-jun*-Expression innerhalb der 24stündigen Behandlung mit C<sub>2</sub>-Ceramid bei gleichzeitiger Herunterregulierung von *c-fos* schließen. Die entgegengesetzte Regulierung der beiden Gene scheint im Hinblick auf das

Zustandekommen eines funktionellen AP-1-Komplexes zunächst widersprüchlich. Es kommen aber wie in Kapitel 1.3.7 beschrieben noch weitere Proteine (Fra-1, Fra-2, FosB) der *fos*-Familie für eine Heterodimerisierung mit c-Jun in Frage. Daneben besteht auch noch die Möglichkeit der Bildung von Homodimeren zwischen zwei c-Jun-Proteinen sowie der Homodimerisierung mit JunB und JunD, den übrigen Mitgliedern der *jun*-Familie. Die anhaltende und ansteigende Expression von *c-jun*-mRNA innerhalb von 24 h deckt sich mit den Ergebnissen, die in dermalen Fibroblasten erzielt wurden [Reunanen et al., 1998].

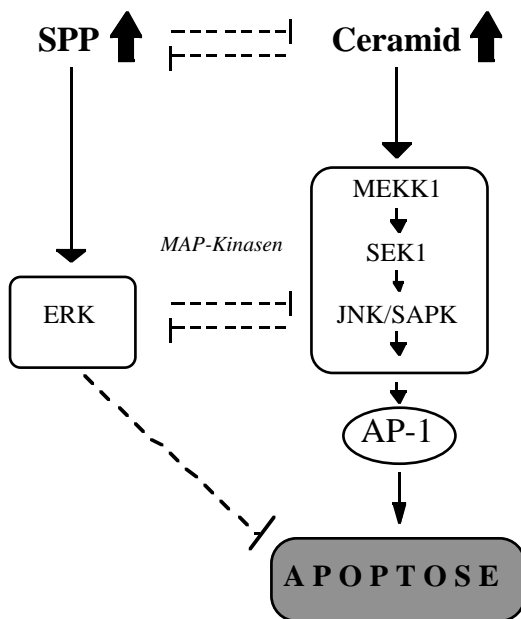
Ursprünglich wurden *c-jun* und *c-fos* bei der Stimulierung von ruhenden Maus-Fibroblasten mit Serum als früh exprimierende Gene beschrieben, die innerhalb von 1-2 h aktiviert und transient exprimiert werden [Greenberg und Ziff, 1984]. In Systemen mit terminaler Differenzierung wie der Epidermis ist die Aktivität und Expression von AP-1 hingegen kontinuierlich [Basset-Seguín et al., 1990; Smeyne et al., 1993]. Die gemessene stetige Zunahme von *c-jun*-mRNA kann durch positive Autoregulation erklärt werden. Sie ist wahrscheinlich die Ursache für die Verstärkung eines in die Zelle gelangenden Signals in Form einer langanhaltenden und zunehmenden Transkription von *c-jun*. Im Gegensatz zu c-Fos, das die eigene Transkription über einen autorepressiven Mechanismus hemmt [Sassone-Corsi et al., 1988; Schönthal et al., 1989], können c-Jun-Proteine über die Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren durch Binden an 2 AP-1-BS innerhalb des *c-jun*-Promotors ihre eigene Expression auslösen [Angel et al., 1988]. Außerdem wird die Transkription von *c-fos* durch c-Jun inhibiert [Schönthal et al., 1989], so daß dies der Grund für die abnehmende Expression von *c-fos* sein könnte.

Neben p38 und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) gehört JNK (c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen) als Subfamilie zu den Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK). Aktivierte JNK phosphorylieren c-Jun-Proteine an den Serinresten 63 und 73 und erhöhen damit ihre Transaktivierungsaktivität [Kallunki et al., 1994; Kyriakis et al., 1994]. Aufgrund der Induktion durch Zytokine und insbesondere durch verschiedene Stresssignale (UV-,  $\gamma$ -Strahlung, Hitzeschock, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc.) wird die JNK auch SAPK (*stress-activated protein kinase*) genannt. Sie ist maßgeblich an der Ceramid-induzierten Apoptose beteiligt. Folgende Arbeiten belegen dies und deuten darauf hin, daß der Sphingomyelin-Zyklus stromaufwärts der JNK/SAPK-Aktivierung liegt und AP-1 ein wichtiger Bestandteil der Ceramid-induzierten Signalkaskade ist :

1. Die Behandlung mit C<sub>2</sub>-Ceramid führte in HL-60-Zellen zu einem Anstieg von *c-jun*- und *c-fos*-mRNA und zu einer Erhöhung der AP-1 Aktivität. Eine synthetische *anti-sense*-DNA von *c-jun* führte aber zur einer Erniedrigung der *c-jun*-mRNA und verhinderte die C<sub>2</sub>-Ceramid induzierte Apoptose [Sawai et al., 1995].
2. BAEC (*bovine aortic endothelial cells*) und lymphoblastischen U937-Zellen wurden mit TNF $\alpha$  behandelt oder Umweltstress ausgesetzt (z.B. Hitze, UV-Strahlung), welches zur schnellen Bildung von Ceramid, Aktivierung des JNK-Signalwegs und zur Apoptose führte. C<sub>2</sub>-Ceramid, jedoch nicht C<sub>2</sub>-Dihydroceramid, stimulierte in ähnlicher Weise die JNK-Aktivierung. Dagegen kam es zur Unterbrechung des Signalwegs mit dominant-

negativen Mutanten von SEK1 oder c-Jun. Diese Mutanten blockierten die TNF $\alpha$ -, Stress- und Ceramid-induzierte Apoptose [Verheij et al., 1996].

Die Aktivierung des JNK/SAPK-Signalwegs erfordert innerhalb der MAPK-Kaskade die sequentielle Aktivierung der Proteine MEKK1, SEK1, JNK/SAPK und c-Jun [Kyriakis et al., 1994] (s. Abb. 17), wobei die Ceramid-induzierte Aktivierung der JNK wahrscheinlich über das kleine G-Protein Rac1 verläuft [Brenner et al., 1997]. Bemerkenswert ist, daß JNK p53 phosphoryliert aber bisher eine durch JNK vermittelte, p53-abhängige Apoptose noch nicht beschrieben ist.



**Abb. 17 Mögliche Funktion von AP-1 in der Signalweiterleitung proapoptotischer MAP-Kinasen.**

(SPP, Sphingosin-1-Phosphat; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; MEKK1, MAPK/ERK Kinase Kinase 1; SEK1, *stress-signaling kinase*)

Die in der RT-PCR gemessene Induktion von *c-jun*-mRNA deutet auf Bildung und Aktivierung von AP-1 hin. Die Aussagekraft des mRNA-Nachweises von *c-jun* hinsichtlich einer potentiellen Synthese des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Zelle ist aber nur begrenzt. Der Nachweis der Transkripte liefert keine Information darüber, ob die mRNA auch translatiert wird. Auch führt die Translation beider Untereinheiten von AP-1 nicht zwangsweise zur posttranslationalen Prozessierung des biologisch aktiven Transkriptionsfaktors. Für die Bestätigung der Ceramid-induzierten Aktivierung von AP-1 auf einer funktionellen Ebene war deshalb die Durchführung eines Transaktivierungsassays (s. 4.5.9) notwendig. In diesem Assay korreliert die Aktivität des Reportergens (CAT-Gen) positiv mit der AP-1-Aktivität.

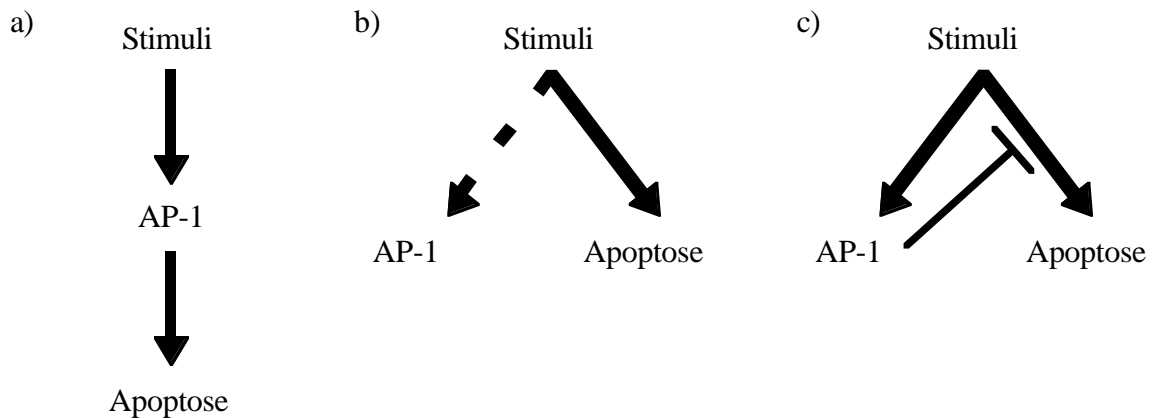
Mit Hilfe der Transaktivierungsassays konnte gezeigt werden, daß C<sub>2</sub>-Ceramid in HaCaT-Zellen nach einer 2stündigen Inkubation noch keinen Effekt auf die AP-1-Aktivität hat, aber nach 6 h etwa eine Verdopplung, nach 16 h eine Verfünffachung und nach 24 h eine Verachtachung gegenüber den Kontrollwerten bewirkt (s. Abb. 16). In Zellen, die zur Kontrolle mit dem CAT-Konstrukt ohne AP-1-BS (pBLCAT2) transfiziert wurden, war die

AP-1-Aktivität zu jedem Meßzeitpunkt mehr als 90 % niedriger als bei den unbehandelten, aber mit pBLCAT2/5xAP1 transfizierten Zellen, was den starken Einfluß der AP-1-BS bzw. der daran bindenden AP-1-Komplexe auf die Reporterogenaktivität deutlich macht. Auch in diesem System konnte eine Induktion der AP-1 Aktivität durch C<sub>2</sub>-Dihydroceramid um etwa das 1,8 fache nach 16 h und 24 h gegenüber den Kontrollen gemessen werden. Die mit dem Transaktivierungsassay erzielten Ergebnisse entsprechen in etwa den in epidermalen Mauskeratinozyten gewonnenen Daten. Dort konnte mit einem AP-1-abhängigen Reportergensystem (Luciferase) die Ceramid-induzierte AP-1-Aktivierung nach 24 h ebenfalls gezeigt werden, nicht hingegen mit Sphingosin, einem direkten Metaboliten von Ceramid [Huang et al., 1997]. Die Induktion von AP-1 verlief dabei konzentrationsabhängig und hatte ihre Maxima (3-3,5 fach) zwischen 20 und 40 µmol/l C<sub>2</sub>-Ceramid, was der verwendeten Konzentration in vorliegender Arbeit entspricht. Der in HaCaT-Zellen erst nach 16 h und 24 h gezeigte starke Anstieg der AP-1-Aktivität zusammen mit den Ergebnissen der RT-PCR weisen auf eine Ceramid-induzierte Neusynthese von AP-1-Komplexen hin und schränken die Bedeutung der Phosphorylierung präformierter AP-1-Komplexe ein. Darüber hinaus lassen die stark ansteigende Expression von *c-jun*-mRNA-Molekülen verbunden mit einer sinkenden Expression von *c-fos* auf die Beteiligung von c-Jun-Proteinen ohne Mitwirkung von c-Fos-Proteinen bei der Bildung eines funktionellen Transkriptionsfaktors schließen. Die Untersuchung der genauen Zusammensetzung des Transkriptionsfaktors AP-1 wäre für Folgeexperimente deshalb interessant.

Anhand der oben erwähnten Subfamilien der MAP-Kinasen lassen sich die durch AP-1 ausgelösten divergierenden biologischen Antworten erklären. Während die Aktivierung von ERK Proliferation und Entzündung induziert, leitet die Aktivierung von p38 und JNK/SAPK die Apoptose ein (s. Abb. 5). Die ERK- und JNK-Kaskaden stehen in Konkurrenz miteinander und inhibieren sich gegenseitig und somit ist für die Effektivität des JNK/SAPK-Signalweges sogar eine Inhibition der Aktivität der anti-apoptotischen ERK (in PC-12-Zellen) erforderlich [Xia et al., 1995]. Für das dynamische Gleichgewicht zwischen der Aktivität von ERK und JNK/SAPK bzw. p38 scheint ein anderes stromaufwärts liegendes Gleichgewicht zwischen Sphingosin-1-Phosphat (SPP) und Ceramid verantwortlich zu sein (s. Abb. 17). SPP, ein Stoffwechselprodukt von Ceramid, hat genau die entgegengesetzte Wirkung auf die oben beschriebenen Signalwege. SPP stimuliert nicht nur ERK, sondern es verhindert gleichzeitig auch die Ceramid-induzierte Aktivierung von JNK/SAPK mit nachfolgender Apoptose [Cuvillier et al., 1996]. Demgegenüber ist über die Verbindung von AP-1 zur eigentlichen Apoptose-Maschinerie (Caspasen-Kaskade) wenig bekannt.

Abb. 18 zeigt vereinfacht die drei möglichen Funktionen von AP-1 in den verschiedenen Signalwegen der Apoptose auf [Karin et al., 1997]. Möglicherweise ist die Aktivierung von AP-1 in all den Formen der Apoptose notwendig, in denen eine *de novo*-Proteinsynthese erforderlich ist, wie z.B. bei der durch NGF (*nerve growth factor*)-Entzug induzierten Apoptose [Ham et al., 1995] (Abb. 18a). In diesem Modell ist die Aktivierung von AP-1 für die Expression limitierter Faktoren essentiell, um Apoptose auszulösen. Die Inaktivierung

von AP-1 würde die Apoptose blockieren. AP-1 ist in diejenigen Auslösemechanismen der Apoptose nicht involviert (gestrichelter Pfeil), die keine *de novo*-Proteinsynthese erfordern, wie z.B. in der Fas- oder TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose [Liu et al., 1996; Lenczowski et al., 1997] (Abb. 18b). Eine völlig entgegengesetzte Funktion hat AP-1 bei bestimmten Arten von Stress wie UVC, bei dem es die Zelle vor Apoptose schützt [Schreiber et al., 1995] (Abb. 18c).



**Abb. 18** Die drei möglichen Funktionen von AP-1 in den verschiedenen Signalwegen der Apoptose

Da die Blockierung der Ceramid-induzierten Apoptose mittels spezifischer Hemmung der AP-1-Aktivität bereits in anderen Zelllinien nachgewiesen wurde, ist die in Abb. 18a dargestellte Funktion von AP-1 in der Ceramid-induzierten Apoptose in HaCaT-Zellen wahrscheinlich. Die endgültige Beweisführung steht jedoch noch aus.

Inzwischen wurde mit Hilfe von dominant-mutanten Jurkat- und HeLa-Zellen die Beteiligung von AP-1 und JNK für die Fas- und TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose ausgeschlossen. In diesem System wurde gezeigt, daß die Inaktivierung der JNK-Kaskade die Fas- und TNF $\alpha$ -Rezeptor-induzierte Apoptose nicht blockiert [Liu et al., 1996; Lenczowski et al., 1997]. Daher wäre für diese Formen Abb. 18b gültig. Es ist dennoch eine indirekte Beteiligung von AP-1 an der Liganden-induzierten Apoptose denkbar, da eine AP-1-BS im Promotorbereich des Gens für Fas Ligand (FasL) identifiziert, und die Aktivierung von FasL in der Stress-induzierten Apoptose bereits demonstriert wurde [Kasibhatla et al., 1998]. Auf diese Weise könnte AP-1 in der Ceramid-induzierten Apoptose über die Expression von FasL zu einer Verstärkung des Signals beitragen.

Auch wenn bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist, ob Apoptose eine Form der terminalen Differenzierung ist [Haake und Polakowska, 1993; Polakowska et al., 1994; Maruoka et al., 1997] oder ob es sich um zwei diskrete Prozesse des Zelltodes von epidermalen Keratinozyten handelt [Martin, 1993; Gandarillas et al., 1999], geben die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse Hinweise dafür, daß sich die Signalwege beider Prozesse überschneiden und der Transkriptionsfaktor AP-1 an beiden Mechanismen beteiligt ist.



In dem stark kontrollierten Differenzierungsprogramm der Epidermis scheint der Transkriptionsfaktor AP-1 ein zentrales Steuerelement zu sein. Die simultane Expression zahlreicher Mitglieder der AP-1 Familie ermöglicht eine Vielzahl biologischer Effekte dieses einen Transkriptionsfaktors. Weitere Forschungen bezüglich seiner Zusammensetzung und Wirkungsweise könnten neue Ansatzpunkte für die gezielte therapeutische Beeinflussung epidermaler Signaltransduktionswege liefern.

So konnte die Aktivierung von AP-1 durch ein zellpermeables Ceramid-Analogon im Rahmen der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden. Ceramid-Analoga stellen somit eine neue Wirkstoffklasse dar, die in der Therapie hyperproliferativer Hautkrankheiten wie z.B. der Psoriasis oder dem Lichen ruber eingesetzt werden könnten. Hier haben Struktur-Wirkungsuntersuchungen, die unsere Arbeitsgruppe durchgeführt hat, bereits erste Hinweise erbracht [Bektas et al., 1998].

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Ceramid ist das zentrale Molekül im Sphingomyelin-Zyklus. Es wirkt als intrazellulärer Botenstoff (*Second Messenger*) und bewirkt Proliferationshemmung, Apoptose und Induktion der Differenzierung als zelluläre Antwort [Geilen et al., 1997a].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Ceramid auf Proliferation, Apoptose und Expression Apoptose-assoziiierter Gene in humanen Keratinozyten in serumfreiem Medium untersucht. Da natürliche langkettige Ceramide nur schwer in die Zelle gelangen können, wurden kurzkettige Ceramid-Analoga verwendet. Diese sind membranfähig und verursachen in der Zelle die gleiche biologische Wirkung wie ein Anstieg von natürlichem intrazellulärem Ceramid. Als Zellkulturmodell diente die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT.

Zuerst wurde die Wirkung des Ceramid-Analogons C<sub>2</sub>-Ceramid auf Proliferation und Apoptose in HaCaT-Zellen in serumfreiem Medium untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß C<sub>2</sub>-Ceramid in HaCaT-Zellen konzentrationsabhängig antiproliferativ ist und Apoptose induziert. Gleichzeitig wurde demonstriert, daß das in der Literatur als biologisch inaktiv beschriebene Ceramid-Analogon Dihydroceramid ebenfalls, wenn auch in viel geringerem Maße als C<sub>2</sub>-Ceramid, antiproliferativ und apoptotisch in HaCaT-Zellen wirkt und deshalb nur eingeschränkt in diesem System als Negativkontrolle verwendet werden kann.

Im Folgenden wurde der Effekt von C<sub>2</sub>-Ceramid (30 µmol/l) auf die Expression verschiedener Apoptose-assoziiierter Gene mittels RT-PCR untersucht.

Proteine wie das pro-apoptotische Bax und das anti-apoptotische Bcl-2 spielen in der Apoptose auf mitochondrialer Ebene eine zentrale Rolle. Obwohl eine geringe Erhöhung der *bcl-2*-Expression bei gleichbleibender *bax*-Expression gemessen werden konnte, verhinderte dies nicht die Ceramid-induzierte Apoptose.

Veränderungen der Expression von *p53*, einem Gen, das an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist, konnten nicht gemessen werden.

Die Expression von *c-myc*, das als Transkriptionsfaktor ebenfalls in den Zellzyklus eingreift, war zu allen drei Meßzeitpunkten geringfügig erhöht.

Deutliche Ceramid-induzierte Genexpressionsänderungen waren bei den Genen *c-jun* und *c-fos* zu verzeichnen. Ihre Genprodukte bilden zusammen den Transkriptionsfaktor AP-1. Innerhalb von 24 h stieg die Expression von *c-jun* bis auf das 5 fache der Kontrollen an. Die Expression von *c-fos* verhielt sich dazu entgegengesetzt und sank nach 24 h bis unter die Hälfte gegenüber den Kontrollen. Dies macht deutlich, daß eher c-Jun und nicht c-Fos an der Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 in diesem System beteiligt ist.

Um die Hinweise auf eine Ceramid-vermittelte Induktion von AP-1 zu bestätigen, wurde die Bildung und Aktivität von AP-1 mittels eines Transaktivierungsassays verifiziert. Die AP-1-Aktivität wurde nach 24stündiger Inkubation mit C<sub>2</sub>-Ceramid auf das 8 fache der Kontrollen induziert. Auf diese Weise konnte die Beteiligung des Transkriptionsfaktors AP-1 an der Ceramid-induzierten Apoptose auf funktioneller Ebene sowie an der Expression

---

Differenzierungs- und Apoptose-assoziiierter Gene in Säugern bestätigt werden. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erste direkte Verbindung zwischen einem intrazellulären Ceramidanstieg und der Zellproliferationshemmung und Einleitung der Apoptose gefunden. Diese Verbindung schließt die Signalkaskade zwischen der antiproliferativen und apoptotischen Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> auf Keratinozyten, die wir kürzlich nachweisen konnten [Geilen et al., 1997b]. Es ergibt sich folgendes Bild:

$1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3 \rightarrow \text{TNF}\alpha \rightarrow \text{Ceramid} \rightarrow \text{AP-1} \rightarrow \text{Hemmung der Zellproliferation und Einleitung der Apoptose.}$

## 8 SUMMARY

### **The role of transcription factor AP-1 in ceramide-induced apoptosis in the human keratinocyte cell line HaCaT**

Ceramide, representing the central molecule in the sphingomyelin cycle, serves as a second messenger for cellular functions ranging from proliferation and differentiation to growth arrest and apoptosis [Geilen et al., 1997a].

In the present study the effect of ceramide on proliferation, apoptosis and expression of apoptosis related genes was investigated in human keratinocytes in serum-free medium .

Because natural long-chain ceramides poorly penetrate the cell membrane, short-chain ceramide analogues were used which mimic the effects of natural intracellular ceramides. The human keratinocyte cell line HaCaT served as cell culture system.

First the effect of the ceramide analogue C<sub>2</sub>-ceramide on proliferation and apoptosis of HaCaT cells was tested in serum-free medium. The results showed that C<sub>2</sub>-ceramide inhibits cell proliferation and induces apoptosis in a concentration dependent manner. Moreover it could be demonstrated that the biologically inactive ceramide analogue C<sub>2</sub>-dihydroceramide was also able to induce apoptosis and to inhibit cell proliferation in HaCaT cells, but to a much lesser extent.

Furthermore the effect of C<sub>2</sub>-ceramide (30 µmol/l) on the expression of several apoptosis-related genes was investigated using RT-PCR.

At the mitochondrial level proteins like Bax which is pro-apoptotic and Bcl-2 which is anti-apoptotic play a major role in apoptosis. Although we measured a slightly elevated *bcl-2*-expression and a concurrent unaltered *bax*-expression, ceramide-induced apoptosis was not prevented.

The expression of *p53* which is involved in controlling the cell cycle, was unchanged.

The expression of *c-myc*, a transcription factor which is likewise involved in control of cell cycle, was slightly elevated after 2 h, 6 h and 24 h.

*c-fos* and *c-jun* encoding two subunits of the transcription factor AP-1 (activating protein-1) showed distinct changes in gene expression. The expression of *c-jun* was induced within 24 h up to a 5-fold increase. In contrast *c-fos* was downregulated after 24 h to 50 % of the control. These data suggest that c-Jun rather than c-Fos contributes to the formation of AP-1 in this system.

In order to prove the formation and activation of AP-1 and to confirm ceramide-mediated induction of AP-1, transactivating-assays were carried out. After 24 h incubation with C<sub>2</sub>-ceramide a 8-fold increase of AP-1-activity was observed.

In conclusion the participation of AP-1 in ceramide-induced apoptosis could be established on a functional level. These data confirm that transcription factor AP-1 regulates the

expression of differentiation and apoptosis related genes in mammals and the proof for a direct link between an increase of intracellular ceramide and the inhibition of cell growth as well as induction of apoptosis could be presented. These findings complete the signalling pathway of vitamin D<sub>3</sub> which we previously showed to inhibit cell growth and to induce apoptosis in keratinocytes [Geilen et al., 1997b].

In summary the following possible signal transduction pathway can be concluded:

$1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3 \rightarrow \text{TNF}\alpha \rightarrow \text{Ceramide} \rightarrow \text{AP-1} \rightarrow \text{inhibition of cell growth and induction of apoptosis.}$

## 9 ABKÜRZUNGEN

Abb. ....	Abbildung
Amp <sup>r</sup> .....	Ampicillinresistenzgen
A-SMase .....	Saure Sphingomyelinase
Apaf-1 .....	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
AP-1 .....	Aktivatorprotein-1
BH .....	Bcl-2-Homologie-Domäne
bp .....	Basenpaare
β-Gal .....	β-Galactosidase
CAD .....	Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease
CAPK .....	Ceramid-aktivierte Proteinkinase
CAT .....	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CAPP .....	Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase
ced .....	<i>cell death gene</i>
cDNA.....	zu RNA komplementäre DNA
DEPC .....	Diethylpyrocarbonat
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	Desoxyribonukleinsäure
DNase .....	Desoxyribonuklease
dNTP .....	Desoxyribonukleosdtriphosphat
DTT .....	Dithiothreitol
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA .....	Ethylendiamintetraacetat
EGF .....	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA .....	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immun-Adsorptionstest)
ERK .....	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
f.c. ....	<i>final concentration</i>
FCS .....	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
g .....	Gramm
h .....	Stunde(n)
HaCaT .....	immortalisierte Keratinozytenzelllinie
ICAD .....	Inhibitor der Caspase-aktivierten Desoxyribonuklease
ICE .....	<i>Interleukin 1β-converting enzyme</i>
JNK .....	c-Jun-NH <sub>2</sub> -terminale Kinasen (Synonym zu SAPK)
KBM .....	<i>keratinocyte basal medium</i>
KGM .....	<i>keratinocyte growth medium</i>
l .....	Liter

M .....	mol/l
mA .....	Milliampere
MAPK .....	Mitogen aktivierte Proteinkinase
μM .....	Micromol pro Liter
mM .....	Millimol pro Liter
min .....	Minuten(n)
mRNA .....	Messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MTP .....	Mikrotiterplatte
nm .....	Nanometer
N-SMase .....	neutrale Sphingomyelinase
OD .....	Optische Dichte
MCS .....	<i>multiple cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle)
PARP .....	Poly(ADP)ribose-Polymerase
PBS .....	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCD .....	<i>programmed cell death</i>
PKC .....	Proteinkinase
Rb .....	Retinoblastom-Genprodukt
RNA .....	Ribonukleinsäure
Rnase .....	Ribonuklease
RPMI .....	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT .....	Raumtemperatur
RT-PCR .....	reverse Transkription mit anschließender PCR
s. ....	siehe
sec .....	Sekunde (n)
SAPK .....	Stress-aktivierte Proteinkinasen
S.D. ....	<i>standarddeviation</i> (Standardabweichung)
SM .....	Sphingomyelin
Tab. ....	Tabelle
Taq Polymerase .....	DNA abhängige Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TNF .....	Tumornekrosefaktor
Tris .....	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U .....	Unit (Enzymeinheit)
Upm .....	Umdrehungen pro Minute
UV .....	Ultraviolettes Licht
v/v .....	Prozentangabe Volumen je Volumen
V .....	Volt
v/v .....	Volumen pro Volumen
W .....	Watt
x g .....	(mal) Erdbeschleunigung

Anmerkung: Genprodukte werden groß und Gene klein und kursiv geschrieben

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

**Alnemri, E.S. (1997):**

Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases.

*J. Cell. Biochem.* **64**, 33-42.

**Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. und Yuan, J. (1996):**

Human ICE/CED-3 protease nomenclature.

*Cell* **87**, 171.

**Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987):**

Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.

*Cell* **49**, 729-739.

**Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. und Karin, M. (1988):**

The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1.

*Cell* **55**, 875-885.

**Angel, P., Smeal, T., Meek, J. und Karin, M. (1989):**

Jun and v-jun contain multiple regions that participate in transcriptional activation in an interdependent manner.

*New Biol.* **1**, 35-43.

**Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. und Montminy, M. (1994):**

Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor.

*Nature* **370**, 226-229.

**Ashkenazi, A. und Dixit, V.M. (1998):**

Death receptors: signaling and modulation.

*Science* **281**, 1305-1308.

**Badie, B., Goh, C.S., Klaver, J., Herweijer, H. und Boothman, D.A. (1999):**

Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells.

*Cancer Gene Therapy* **6**, 155-162.

**Ballou, L.R., Lauderkind, S.J.F., Rosloniec, E.F. und Raghov, R. (1996):**

Ceramide signalling and the immune response.

*Biochim. Biophys. Acta* **1301**, 273-287.

**Basset-Seguín, N., Escot, C., Blanchard, J.M., Kerai, C., Verrier, B., Mion, H. und Guilhou, J.J. (1990):**

High levels of c-fos proto-oncogene expression in normal human adult skin.

*J. Invest. Dermatol.* **94**, 418-422.

**Bektas, M., Dullin, Y., Wieder, T., Kolter, T., Sandhoff, K., Brossmer, R., Ihrig, P., Orfanos, C.E. und Geilen, C.C. (1998):**

Induction of apoptosis by synthetic ceramide analogues in the human keratinocyte cell line HaCaT.

*Exp. Dermatol.* **7**, 342-349.



**Bianchi, L., Farrace, M.G., Nini, G. und Piacentini, M. (1994):**

Abnormal Bcl-2 and "tissue" transglutaminase expression in psoriatic skin.  
*J. Invest. Dermatol.* **103**, 829-833.

**Bielawska, A., Crane, H.M., Liotta, D., Obeid, L.M. und Hannun, Y.A. (1993):**

Selectivity of ceramide-mediated biology.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 26226-26232.

**Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979):**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

**Bishop, J.M. (1987):**

The molecular genetics of cancer.  
*Science* **235**, 305-311.

**Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. und Fusenig, N.E. (1988):**

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.  
*J. Cell Biol.* **106**, 761-771.

**Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hulsen, A., Fasching, C., Cremer, T. und Fusenig, N.E. (1997):**

Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT.  
*Genes Chromosomes Cancer* **19**, 201-214.

**Boyce, S.T. und Ham, R.G. (1983):**

Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture.  
*J. Invest. Dermatol.* **81**, 33-40.

**Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. und Hunter, T. (1991):**

Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity.  
*Cell* **64**, 573-584.

**Brenner, B., Koppenhoefer, U., Weinstock, C., Linderkamp, O., Lang, F. und Gulbins, E. (1997):**

Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 22173-22181.

**Carson, D.A. und Ribeiro, J.M. (1993):**

Apoptosis and disease.  
*Lancet* **341**, 1251-1254.

**Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. und Dixit, V.M. (1996):**

Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95.  
*Science* **274**, 990-992.

**Claret, F.X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T. und Karin, M. (1996):**

A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors.

*Nature* **383**, 453-457.

**Cleary, M.L., Smith, S.D. und Sklar, J. (1986):**

Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation.

*Cell* **47**, 19-28.

**Cohen, G. (1997):**

Caspases: The executioners of apoptosis.

*Biochem. J.* **326**, 1-16.

**Collins, S.J., Gallo, R.C. und Gallagher, R.E. (1977):**

Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.

*Nature* **270**, 347-349.

**Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S. und Spiegel, S. (1996):**

Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.

*Nature* **381**, 800-803.

**Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. und Stark, G.R. (1994):**

Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.

*Science* **264**, 1415-1421.

**Davis, R.J. (1993):**

The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.

*J. Biol. Chem.* **268**, 14553-14556.

**Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. und Davis, R.J. (1994):**

JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.

*Cell* **76**, 1025-1037.

**Dobrowsky, R.T. und Hannun, Y.A. (1992):**

Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase.

*J. Biol. Chem.* **267**, 5048-5051.

**Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C. und Hannun, Y.A. (1993):**

Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A.

*J. Biol. Chem.* **268**, 15523-15530.

**Eckert, R.L. und Welter, J.F. (1996):**

Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression.

*Mol. Biol. Rep.* **23**, 59-70.

**Ellis, R.E., Yuan, J.Y. und Horvitz, H.R. (1991a):**

Mechanisms and functions of cell death.

*Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 663-698.

**Ellis, R.E., Jacobson, D.M. und Horvitz, H.R. (1991b):**

Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*.

*Genetics* **129**, 79-94.

**Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998):**

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.  
*Nature* **391**, 43-50.

**Esteve, P., Embade, N., Perona, R., Jimenez, B., del Peso, L., Leon, J., Arends, M., Miki, T. und Lacal, J.C. (1998):**

Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway.  
*Oncogene* **17**, 1855-1869.

**Fesus, L., Davies, P.J. und Piacentini, M. (1991):**

Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death.  
*Eur. J. Cell Biol.* **56**, 170-177.

**Fesus, L. (1993):**

Biochemical events in naturally occurring forms of cell death.  
*FEBS Lett.* **328**, 1-5.

**Fischer, G., Kent, S.C., Joseph, L., Green, D.R. und Scott, D.W. (1994):**

Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti-mu- mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc.  
*J. Exp. Med.* **179**, 221-8.

**Fraser, A. und Evan, G. (1996):**

A license to kill.  
*Cell* **85**, 781-784.

**Gajewski, T.F. und Thompson, C.B. (1996):**

Apoptosis meets signal transduction: Elimination of a BAD influence.  
*Cell* **87**, 589-592.

**Gandarillas, A., Goldsmith, L.A., Gschmeissner, S., Leigh, I.M. und Watt, F.M. (1999):**

Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes.  
*Exp. Dermatol.* **8**, 71-79.

**Gao, J., Schwalb, T.A., Addeo, J.V., Ghosn, C.R. und Stern, M.E. (1998):**

The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical Cyclosporin A therapy.  
*Cornea* **17**, 654-663.

**Geilen, C.C., Bektas, M., Wieder, T. und Orfanos, C.E. (1996):**

The vitamin D3 analogue, calcipotriol, induces sphingomyelin hydrolysis in human keratinocytes.  
*FEBS Lett.* **378**, 88-92.

**Geilen, C.C., Wieder, T. und Orfanos, C.E. (1997a):**

Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis.  
*Arch. Dermatol. Res.* **289**, 559-566.

**Geilen, C.C., Bektas, M., Wieder, T., Kodelja, V., Goerdts, S. und Orfanos, C.E. (1997b):**

1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces sphingomyelin hydrolysis in HaCaT cells via tumor necrosis factor alpha.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 8997-9001.

**Gillies, R.J., Didier, N. und Denton, M. (1986):**

Determination of cell number in monolayer cultures.

*Anal. Biochem.* **159**, 109-113.

**Green, H. und Watt, F.M. (1982):**

Regulation by vitamin A of envelope cross-linking in cultured keratinocytes derived from different human epithelia.

*Mol. Cell. Biol.* **2**, 1115-7.

**Greenberg, M.E. und Ziff, E.B. (1984):**

Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.

*Nature* **311**, 433-438.

**Haake, A.R. und Polakowska, R.R. (1993):**

Cell death by apoptosis in epidermal biology.

*J. Invest. Dermatol.* **101**, 107-112.

**Ham, J., Babij, C., Whitfield, J., Pfarr, C.M., Lallemand, D., Yaniv, M. und Rubin, L.L. (1995):**

A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death.

*Neuron* **14**, 927-939.

**Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H. und Bell, R.M. (1986):**

Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets.

*J. Biol. Chem.* **261**, 12604-12609.

**Hannun, Y.A. (1994):**

The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide.

*J. Biol. Chem.* **269**, 3125-3128.

**Hannun, Y.A. und Obeid, L.M. (1995):**

Ceramide: An intracellular signal for apoptosis.

*TIBS* **20**, 73-77.

**Hannun, Y.A. 1997.**

Sphingolipid second messengers: Tumor suppressor lipids

*Plenum Press, New York*, S. 305-313.

**Helmberg, A., Auphan, N., Caelles, C. und Karin, M. (1995):**

Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor.

*Adv. Cancer Res.* **14**, 452-460.

**Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. und Kroemer, G. (1997):**

The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death.

*Oncogene* **15**, 1573-81.

**Holleran, W.M., Feingold, K.R., Man, M.Q., Gao, W.N., Lee, J.M. und Elias, P.M. (1991a):**

Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function.

*J. Lipid Res.* **32**, 1151-1158.

**Holleran, W.M., Man, M.Q., Gao, W.N., Menon, G.K., Elias, P.M. und Feingold, K.R. (1991b):**

Sphingolipids are required for mammalian epidermal barrier function. Inhibition of sphingolipid synthesis delays barrier recovery after acute perturbation.

*J. Clin. Invest.* **88**, 1338-1345.

**Hsu, S.C., Wu, C.C., Luh, T.Y., Chou, C.K., Han, S.H. und Lai, M.Z. (1998):**

Apoptotic signal of Fas is not mediated by ceramide.

*Blood* **91**, 2658-2663.

**Huang, C., Ma, W.Y., Hanenberger, D., Cleary, M.P., Bowden, G.T. und Dong, Z. (1997):**

Inhibition of ultraviolet B-induced activator protein-1 (AP-1) activity by aspirin in AP-1-luciferase transgenic mice.

*J. Biol. Chem.* **272**, 26325-26331.

**Hueber, A.O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S. und Evan, G.I. (1997):**

Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis.

*Science* **278**, 1305-1309.

**Iwasaki-Bessho, Y., Banno, Y., Yoshimura, S., Ito, Y., Kitajima, Y. und Nozawa, Y. (1998):**

Decreased phospholipase D (PLD) activity in ceramide-induced apoptosis of human keratinocyte cell line HaCaT.

*J. Invest. Dermatol.* **110**, 376-382.

**Jacobson, M.D., Weil, M. und Raff, M.C. (1997):**

Programmed cell death in animal development.

*Cell* **88**, 347-354.

**Jones, K.T. und Sharpe, G.R. (1994):**

Staurosporine, a non-specific PKC inhibitor, induces keratinocyte differentiation and raises intracellular calcium, but Ro31-8220, a specific inhibitor, does not.

*J. Cell Physiol* **159**, 324-330.

**Jones, M.J. und Murray, A.W. (1995):**

Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D.

*J. Biol. Chem.* **270**, 5007-5013.

**Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Derijard, B., Moore, G., Davis, R. und Karin, M. (1994):**

JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation.

*Genes Dev.* **8**, 2996-3007.

**Kaptein, J.S., Lin, C.K.E., Wang, C.L., Nguyen, T.T., Kalunta, C.I., Park, E., Chen, F.S. und Lad, P.M. (1996):**

Anti-IgM-mediated regulation of c-myc and its possible relationship to apoptosis.

*J. Biol. Chem.* **271**, 18875-18884.

**Karin, M., Liu, Z. und Zandi, E. (1997):**

AP-1 function and regulation.

*Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-246.

**Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. und D.R., G. (1998):**

DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1.

*Mol. Cell.* **1**, 543-551.

**Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972):**

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

*Br. J. Cancer* **26**, 239-257.

**Kerr, J.F., Winterford, C.M. und Harmon, B.V. (1994):**

Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.

*Cancer* **73**, 2013-2026.

**Kitabayashi, I., Kawakami, Z., Chiu, R., Ozawa, K., Matsuoka, T., Toyoshima, S., Umesono, K., Evans, R.M., Gachelin, G. und Yokoyama, K. (1992):**

Transcriptional regulation of the c-jun gene by retinoic acid and E1A during differentiation of F9 cells.

*EMBO J.* **11**, 167-175.

**Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. und Newmeyer, D.D. (1997):**

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.

*Science* **275**, 1132-6.

**Kok, J.W., Nikolova-Karakashian, M., Klappe, K., Alexander, C. und Merrill Jr., A.H. (1997):**

Dihydroceramide biology.

*J. Biol. Chem.* **272**, 21128-21136.

**Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J. und Williams, L.T. (1997):**

Caspase-3-generated fragment of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis.

*Science* **278**, 294-298.

**Kroemer, G. (1997):**

The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis.

*Nat. Med.* **3**, 614-620.

**Kroemer, G., Zamzami, N. und Susin, S.A. (1997):**

Mitochondrial control of apoptosis.

*Immunol. Today* **18**, 44-51.

**Krumm, A., Meulia, T., Brunvand, M. und Groudine, M. (1992):**

The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region.

*Genes Dev.* **6**, 2201-2213.

**Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. und Woodgett, J.R. (1994):**

The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.

*Nature* **369**, 156-160.

**Lenczowski, J.M., Dominguez, L., Eder, A.M., King, L.B., Zacharchuk, C.M. und Ashwell, J.D. (1997):**

Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis.  
*Mol. Cell. Biol.* **17**, 170-181.

**Liu, J., Mathias, S., Yang, Z. und Kolesnick, R.N. (1994):**

Renaturation and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 3047-3052.

**Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1997):**

DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.  
*Cell* **89**, 175-184.

**Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. und Karin, M. (1996):**

Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death.  
*Cell* **87**, 565-576.

**Luckow, B. und Schutz, G. (1987):**

CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements.  
*Nucleic Acids Res.* **15**, 5490.

**Majno, G. und Joris, I. (1995):**

Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.  
*Am. J. Pathol.* **146**, 3-15.

**Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. 1989**

Molecular cloning: a Laboratory manual  
*Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*

**Martin, S.J. (1993):**

Protein or RNA synthesis inhibition induces apoptosis of mature human CD4+ T cell blasts.  
*Immunol. Lett.* **35**, 125-34.

**Maruoka, Y., Harada, H., Mitsuyasu, T., Seta, Y., Kurokawa, H., Kajiyama, M. und Toyoshima, K. (1997):**

Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death.  
*Biochem Biophys Res Commun* **238**, 886-890.

**McCall, C.A. und Cohen, J.J. (1991):**

Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease.  
*J. Invest. Dermatol.* **97**, 111-114.

**Mehendale, H.M. (1994):**

Amplified interactive toxicity of chemicals at nontoxic levels: mechanistic considerations and implications to public health.  
*Environ. Health Perspect.* **102 Suppl 9**, 139-149.

**Merkle, C., Fritsche, M., Mundt, M., Jahne, R. und Groner, B. (1998):**

Transcriptional regulation and induction of apoptosis: implications for the use of monomeric p53 variants in gene therapy.  
*Gene Therapy* **5**, 1631-1641.

**Merrill, A.H., Sereni, A.M., Stevens, V.L., Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Bell, R.M. und Kinkade, J.M. (1986):**

Inhibition of phorbol-ester-dependent differentiation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells by sphinganine and other longchain bases.

*J. Biol. Chem.* **261**, 12610-12615.

**Miller, D.K., Myerson, J. und Becker, J.W. (1997):**

The interleukin-1 $\beta$  converting enzyme family of cysteine proteases.

*J. Cell. Biochem.* **64**, 2-10.

**Min, W., Ghosh, S. und Lengyel, P. (1996):**

The interferon-inducible p202 protein as a modulator of transcription: inhibition of NF-kappa B, c-Fos, and c-Jun activities.

*Mol. Cell. Biol.* **16**, 359-368.

**Minn, A.J., Vélez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. und Thompson, C.B. (1997):**

Bcl-x<sub>L</sub> forms an ion channel in sythetic lipid membranes.

*Nature* **385**, 353-357.

**Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. und Reed, J.C. (1994):**

Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo.

*Oncogene* **9**, 1799-1805.

**Mortola, E., Endo, Y., Ohno, K., Watari, T., Tsujimoto, H. und Hasegawa, A. (1998):**

The use of two immunosuppressive drugs, cyclosporin A and tacrolimus, to inhibit virus replication and apoptosis in cells infected with feline immunodeficiency virus.

*Vet. Res. Commun.* **22**, 553-563.

**Müller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. und Pfizenmaier, K. (1995):**

PKC  $\zeta$  is a molecular switch in signal transduction of TNF- $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid.

*EMBO J.* **14**, 1961-1969.

**Musti, A.M., Treier, M. und Bohmann, D. (1997):**

Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases.

*Science* **275**, 400-402.

**Nagata, S. (1997):**

Apoptosis by death factor.

*Cell* **88**, 355-365.

**Nagpal, S., Athanikar, J. und Chandraratna, R.A. (1995):**

Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha.

*J. Biol. Chem.* **270**, 923-927.

**Nayeri, S., Danielsson, C., Kahlen, J.P., Schrader, M., Mathiasen, I.S., Binderup, L. und Carlberg, C. (1995):**

The anti-proliferative effect of vitamin D3 analogues is not mediated by inhibition of the AP-1 pathway, but may be related to promoter selectivity.

*Oncogene* **11**, 1853-1858.

**Newton, K. und Strasser, A. (1998):**

The Bcl-2 family and cell death regulation.

*Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 68-75.



- Nicholson, D.W. und Thornberry, N.A. (1997):**  
Caspases: Killer proteases.  
*TIBS* **22**, 299-306.
- Nickel, W. und Wieland, F.T. (1997):**  
Biogenesis of COPI-coated transport vesicles.  
*FEBS Lett.* **413**, 395-400.
- Oshima, R.G., Abrams, L. und Kulesh, D. (1990):**  
Activation of an intron enhancer within the keratin 18 gene by expression of c-fos and c-jun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells.  
*Genes Dev.* **4**, 835-848.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W. und Kruzel, E. (1995):**  
Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.  
*Mol. Cell. Biol.* **15**, 3032-3040.
- Packham, G. und Cleveland, J.L. (1995):**  
The role of ornithine decarboxylase in c-Myc-induced apoptosis.  
*Crit. Rev. Oncog.* **194**, 283-290.
- Petit, P.X., Susin, S.A., Zamzami, N., Mignotte, B. und Kroemer, G. (1996):**  
Mitochondria and programmed cell death: back to the future.  
*FEBS Lett.* **396**, 7-13.
- Pillai, S., Bikle, D.D., Hincenbergs, M. und Elias, P.M. (1988):**  
Biochemical and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in a serum-free medium.  
*J. Cell. Phys.* **134**, 229-237.
- Pillai, S., Cho, S., Mahajan, M., Frew, L. und Rawlings, A.V. (1996):**  
Synergy between vitamin D precursor 25-hydroxyvitamin D and short chain ceramides on keratinocyte proliferation and differentiation.  
*J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1**, 39-43.
- Polakowska, R.R., Piacentini, M., Bartlett, R., Goldsmith, L.A. und Haake, A.R. (1994):**  
Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells.  
*Dev. Dyn.* **199**, 176-188.
- Raff, M.C. (1992):**  
Social controls on cell survival and cell death.  
*Nature* **356**, 397-400.
- Raskin, C.A. (1997):**  
Apoptosis and cutaneous biology.  
*J. Am. Acad. Dermatol.* **36**, 885-896.
- Reunanen, N., Westermarck, J., Hakkinen, L., Holmstrom, T.H., Elo, I., Eriksson, J.E. und Kahari, V.M. (1998):**  
Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 5137-5145.

- Rossi, A., Jang, S.I., Ceci, R., Steinert, P.M. und Markova, N.G. (1998):**  
Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes.  
*J. Invest. Dermatol.* **110**, 34-40.
- Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1992):**  
Biosynthesis of sphingolipids: Dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells.  
*Biochem. Biophys. Res. Com.* **189**, 14-20.
- Ryan, K.M. und Birnie, G.D. (1996):**  
Myc oncogenes: the enigmatic family.  
*Biochem. J.* **314**, 713-721.
- Ryseck, R.P. und Bravo, R. (1991):**  
c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins.  
*Oncogene* **6**, 533-542.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985):**  
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.  
*Science* **230**, 1350.
- Sakahira, H., Enari, M. und Nagata, S. (1998):**  
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.  
*Nature* **391**, 96-99.
- Santana, P., Pena, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z. und Kolesnick, R. (1996):**  
Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis.  
*Cell* **86**, 189-199.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J.C. und Verma, I.M. (1988):**  
Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos.  
*Nature* **334**, 314-319.
- Savill, J. (1996):**  
Phagocyte recognition of apoptotic cells.  
*Biochem. Soc. Trans.* **24**, 1065-1069.
- Sawai, H., Okazaki, T., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Kishi, S., Umehara, H. und Domae, N. (1997):**  
Ceramide-induced translocation of protein kinase C- $\delta$  and - $\epsilon$  to the cytosol.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 2452-2458.
- Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, H., Okano, H., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Ishikura, H. und Umehara, H. (1995):**  
Requirement of AP-1 for ceramide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 27326-27331.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. und Reed, J.C. (1997):**  
Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5113-5118.

**Schönthal, A., Buscher, M., Angel, P., Rahmsdorf, H.J., Ponta, H., Hattori, K., Chiu, R., Karin, M. und Herrlich, P. (1989):**  
The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription.  
*Oncogene* **4**, 629-636.

**Schreiber, M., Baumann, B., Cotten, M., Angel, P. und Wagner, E.F. (1995):**  
Fos is an essential component of the mammalian UV response.  
*EMBO J.* **14**, 5338-5349.

**Sheng, M., Thompson, M.A. und Greenberg, M.E. (1991):**  
CREB: a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases.  
*Science* **252**, 1427-1430.

**Sillence, D.J. und Allan, D. (1997):**  
Evidence against an early signalling role for ceramide in Fas-mediated apoptosis.  
*Biochem. J.* **324**, 29-32.

**Smeal, T., Angel, P., Meek, J. und Karin, M. (1989):**  
Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes.  
*Genes Dev.* **3**, 2091-2100.

**Smeal, T., Hibi, M. und Karin, M. (1994):**  
Altering the specificity of signal transduction cascades: positive regulation of c-Jun transcriptional activity by protein kinase A.  
*EMBO J.* **13**, 6006-6610.

**Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T. und Morgan, J.I. (1993):**  
Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo.  
*Nature* **363**, 166-169.

**Strobl, L.J. und Eick, D. (1992):**  
Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo.  
*EMBO J.* **11**, 3307-3314.

**Thompson, C.B. (1995):**  
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.  
*Science* **267**, 1456-1462.

**Thornberry, N.A. und Lazebnik, Y. (1998):**  
Caspases: enemies within.  
*Science* **281**, 1312-1316.

**Treisman, R. (1992):**  
The serum response element.  
*Trends Biochem. Sci.* **17**, 423-426.

**Vastrik, I., Makela, T.P., Koskinen, P.J., Klefstrom, J. und Alitalo, K. (1994):**  
Myc protein: partners and antagonists.  
*Crit. Rev. Oncog.* **5**, 59-68.

**Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A. und Obeid, L.M. (1995):**  
Role of ceramide in cellular senescence.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 30701-30708.

**Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. und Kolesnick, R.N. (1996):**

Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress- induced apoptosis.  
*Nature* **380**, 75-79.

**Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979):**

Preparative and analytical purification of DNA from agarose.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**, 615-619.

**Vogt, P.K. und Bos, T.J. (1990):**

jun: oncogene and transcription factor.  
*Adv. Cancer Res.* **55**, 1-35.

**Welter, J.F. und Eckert, R.L. (1995):**

Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation.  
*Oncogene* **11**, 2681-2687.

**Wieder, T., Geilen, C.C., Kolter, T., Sadeghlar, F., Sandhoff, K., Brossmer, R., Ihrig, P., Perry, D., Orfanos, C.E. und Hannun, Y.A. (1997):**

Bcl-2 antagonizes apoptotic cell death induced by two new ceramide analogues.  
*FEBS Lett.* **411**, 260-264.

**Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Obeid, L.M. und Hannun, Y.A. (1994):**

Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 19605-19609.

**Wyllie, A.H., Kerr, J.F. und Currie, A.R. (1980):**

Cell death: the significance of apoptosis.  
*Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.

**Wyllie, A. (1998):**

An endonuclease at last.  
*Nature* **391**, 20-21.

**Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. und Greenberg, M.E. (1995):**

Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis.  
*Science* **270**, 1326-1331.

**Yang, E. und Korsmeyer, S.J. (1996):**

Molecular Thanatopsis: A discourse on the BCL-2 family and cell death.  
*Blood* **88**, 386-401.

**Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P. und Wang, X. (1997):**

Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.  
*Science* **275**, 1129-1132.

**Yount, G.L., Levine, K.S., Kuriyama, H., Haas-Kogan, D.A. und Israel, M.A. (1999):**

Fas (APO-1/CD95) signaling pathway is intact in radioresistant human glioma cells.  
*Can. Res.* **59**, 1362-1365.

**Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R.P., Schuermann, M., Muller, R. und Bravo, R. (1989):**

The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity.

*EMBO J.* **8**, 805-813.

**Zhang, J., Alter, N., Reed, J.C., Borner, C., Obeid, L.M. und Hannun, Y.A. (1996):**

Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5325-5328.

**Zhang, Y., Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X.-H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P.-Y., Lichenstein, H. und Kolesnick, R. (1997):**

Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase.

*Cell* **89**, 63-72.

**Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. (1997):**

Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.

*Cell* **90**, 405-413.

---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Stooss  
Vorname: Arnim  
Geburtsdatum: 01. Februar 1971  
Geburtsort: Ulm  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1977 - 1981: Grundschule in Amstetten  
1981 - 1990: Helfenstein-Gymnasium in Geislingen  
1990: Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst:

1990 - 1991: StKp Inst Kdo 2 Ulm

### Hochschulausbildung:

1991 - 1997: Studium der Veterinärmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München und  
École Nationale Vétérinaire de Toulouse  
9/ 1997: Dritter Abschnitt der tierärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)  
01.01.1999 Approbation als Tierarzt  
seit 11/1997 Doktorand an der Haut- und Poliklinik des  
Universitätsklinikums Benjamin Franklin am Fachbereich  
Humanmedizin der Freien Universität Berlin

## DANKSAGUNG

Zuerst danke ich Herrn Prof. Dr. M. F. G. Schmidt für das Vertrauen, meine Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin zu betreuen.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin am Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Prof. h.c. C. E. Orfanos danke ich, daß ich meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Christoph C. Geilen, für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für seine Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Anfertigung der Arbeit. Frau Dr. Verena Müller-Wieprecht danke ich für ihre sachkundige Betreuung und ihre impulsiven Korrekturen, bei der manches Blatt schon mal Feuer fing. Christian Riebeling, Meryem Bektas und Carola Müller waren für mich weitere unverzichtbare kompetente Ansprechpartner. Für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima in der AG Geilen danke ich auch Tanja Bauer, Gerit Golz, Monika Raisowa und Steffen Barz.

Meiner Freundin Jana Haut danke ich für ihr Verständnis für das Wachstumsverhalten von HaCaT-Zellen.

## **SELBSTÄNDIGKEITSVERSICHERUNG**

Hiermit versichere ich, daß ich vorliegende Arbeit auf der Grundlage der in Kapitel 3 und 4 angegebenen Hilfsmittel selbständig verfaßt habe.

Berlin 1999