

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
des Fachbereichs Humanmedizin
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
(Leiter: Prof. Dr. Prof. h. c. C. E. Orfanos)
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Dr. Christoph C. Geilen

Charakterisierung der humanen Glukosylceramid-Synthase in melanozytären Zellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Steffen Barz
aus Weinheim (Bergstraße)

Berlin 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christoph Geilen
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann

Tag der Disputation: 01.12.2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das maligne Melanom	1
1.2	Sphingolipide	1
1.2.1	Struktur und Biosynthese der Sphingolipide	2
1.3	Glykosphingolipide	4
1.3.1	Die Biosynthese komplexer Ganglioside	5
1.4	Die UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase	7
1.5	Biologische Funktionen von (Glyko-)Sphingolipiden	10
1.5.1	Sphingolipide und Apoptose	11
1.5.2	Rolle der Sphingolipide in der Haut	18
1.6	Pathobiochemie der (Glyko-)Sphingolipide	24
1.6.1	Sphingolipide und Krebs	24
1.6.2	Sphingolipidosen	26
1.7	Zielsetzung der Arbeit	29
2	ERGEBNISSE	30
2.1	Subzelluläre Lokalisation der Glukosylceramid-Synthase	30
2.2	Einfluß der Proteinmenge auf die <i>In-vitro</i> -Aktivität der Glukosylceramid-Synthase	31
2.3	Abhängigkeit der Substratmenge auf die <i>In-vitro</i> -Aktivität der Glukosylceramid-Synthase	32
2.4	Substratspezifität der Glukosylceramid-Synthase für verschiedene Ceramide	34
2.5	Einfluß von verschiedenen Nukleotiden auf die <i>In-vitro</i> -Aktivität der Glukosylceramid-Synthase	35
2.6	Spezifität des peptidspezifischen anti-humane Glukosylceramid-Synthase-Antikörpers SA-7061	36

2.7	Medium-abhängige Aktivität der Glukosylceramid-Synthase.....	38
2.8	Expression der Glukosylceramid-Synthase in der humanen Melanomzelllinie Mel-HO und primären humanen Melanozyten	38
2.9	Vergleich der <i>In-vitro</i>-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase von verschiedenen humanen Melanomzellen und Melanozyten.....	40
2.10	Chromatographische Auftrennung von Lipiden in Mel-Ho-Melanomzellen und primären humanen Melanozyten.....	42
2.11	Einfluß von Bcl-2 auf die <i>In-vitro</i>-Aktivität der Glukosylceramid- Synthase	43
2.12	Schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro-Melanomzellen.....	44
2.12.1	Klonierung der humanen Glukosylceramid-Synthase	44
2.12.2	Transiente Überexpression der humanen Glukosylceramid-Synthase	45
2.12.3	Stabile Überexpression der Glukosylceramid-Synthase.....	46
2.13	Einfluß der Überexpression der Glukosylceramid-Synthase auf die Apoptoserate.....	50
2.14	Einfluß von D,L-<i>threo</i>-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1- propanol (PPPP) auf das Wachstum der humanen Melanomzelllinie Mel-HO	53
2.15	Hemmung der Glukosylceramid-Synthase durch D,L-<i>threo</i>-1-Phenyl-2- hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP).....	54

3	DISKUSSION	56
3.1	Charakterisierung der humanen Glukosylceramid-Synthase in der humanen Melanomzelllinie Mel-HO	57
3.2	Expression und <i>In-vitro</i> -Aktivität der humanen Glukosylceramid-Synthase in verschiedenen humanen Melanomzelllinien und primären humanen Melanozyten	59
3.3	Schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro-Melanomzellen.....	63
3.4	Einfluß des Glukosylceramidsynthase-Inhibitors D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP).....	67
4	ZUSAMMENFASSUNGEN.....	73
4.1	Zusammenfassung	72
4.2	Summary.....	74
5	MATERIAL	77
5.1	Chemikalien.....	77
5.2	Verbrauchsmaterialien.....	78
5.3	Zellkulturmaterialien	79
5.4	Zellen.....	80
5.4.1	Zelllinien.....	80
5.4.2	Primäre Zellen.....	80
5.5	Antikörper	80
5.6	Primer	80
5.7	Gene.....	81
5.8	Vektoren	81
5.9	Geräte.....	82

6	METHODEN	84
6.1	Zellkultur	84
6.1.1	Zellkulturmedien und Lösungen	84
6.1.2	Präparation primärer humaner Melanozyten	86
6.1.3	Kultivierung der Zellen	87
6.1.3.1	Kultivierung humaner Melanomzellen	87
6.1.3.2	Zellkultur primärer humaner Melanozyten	87
6.1.3.3	Kultivierung von transfizierten humanen Melanomzellen	88
6.1.3.4	Kontrolle der Genexpression in transfizierten Melanomzellen	88
6.1.4	Einfrieren und Auftauen der Melanomzellen	88
6.2	Bakterien	89
6.2.1	Benötigte Lösungen und Medien	89
6.2.2	Anzucht transformierter <i>Escherichia coli</i> DH5 α Zellen	90
6.2.3	Einfrieren und Auftauen von <i>E. coli</i> DH5 α	90
6.3	Zellbiologie	90
6.3.1	Messung der Proliferation	90
6.3.2	Bestimmung der Zytotoxizität	92
6.3.3	Nachweis der Apoptose	93
6.4	Lipidchemie	94
6.4.1	Vesikelformierung für den <i>In-vitro</i> -UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase-Assay	94
6.4.2	Isolierung und Auftrennung zellulärer Lipide	95
6.4.2.1	Isolierung von zellulärem Gesamt-Lipid	95
6.4.2.2	Auftrennung und Nachweis zellulärer Lipide	95
6.5	Enzymreaktionen	96
6.5.1	Messung der UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase-Aktivität	96
6.6	Proteinchemie	97
6.6.1	Peptid-ELISA	97
6.6.2	Isolierung zellulärer Proteine und subzelluläre Isolierung	99
6.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	100

6.6.4	Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid- Gelelektrophorese	101
6.6.5	Western Blot	104
6.6.6	Immuno-Nachweis geblotteter Proteine	105
6.7	Molekularbiologie	107
6.7.1	Isolierung von Nukleinsäuren	107
6.7.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	107
6.7.1.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	108
6.7.1.3	Plasmidpräparation im Großmaßstab	108
6.7.1.4	Plasmidpräparation im Kleinmaßstab	109
6.7.1.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	110
6.7.2	Enzymkatalysierte Reaktionen	110
6.7.2.1	Restriktion von DNA	110
6.7.2.2	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA	111
6.7.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	111
6.7.3	Klonierung der humanen UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase... 111	
6.7.4	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5 α -Zellen.....	112
6.7.5	Polymerase-Kettenreaktion.....	114
6.7.6	Agarose-Gel Elektrophorese.....	114
6.7.7	Transfektion von humanen Melanomzellen mit dem schaltbaren Vektorsystem pTet-On.....	115
7	LITERATUR	117
8	ABKÜRZUNGEN	131
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	133
	CURRICULUM VITAE	I
	DANKSAGUNG	II

Die Natur hat sich soviel Freiheit vorbehalten,
daß wir mit Wissen und Wissenschaft ihr nicht durchgängig beikommen
oder sie in die Enge treiben können.

(Johann Wolfgang von Goethe)