

1 Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das Melanom ist ein Tumor der Haut, der seinen Ursprung im unkontrollierten Wachstum von Pigmentzellen, den Melanozyten, hat.

Das Melanom gehört zu den am stärksten malignen Tumoren der Haut und der Schleimhäute. Dies liegt nicht am Wachstum des Primärtumors, sondern an seinem aggressiven biologischen Verhalten und der Tendenz, sehr früh Lymphknotenmetastasen zu bilden. Die Suche nach Genen, die speziell beim Melanom reguliert werden, steht im Mittelpunkt des Interesses vieler Forscher. Bis zuletzt konnten allerdings keine Melanom-spezifischen Gene identifiziert werden (Eberle *et al.*, 1995). Charakteristisch für das maligne Melanom ist seine hohe Therapie-Resistenz (Serrone und Hersey, 1999). Aus diesem Grund werden verstärkt Signalwege untersucht, welche die Regulation des Wachstums beim Melanom regulieren oder seine Chemotherapie-Resistenz beeinflussen sowie neue Wirkstoffe, die nicht von der Chemotherapie beeinflusst werden. Kürzlich konnte von Riebeling *et al.* (2002) gezeigt werden, daß Bisphosphonate, die bislang nur zur Prävention von Knochenmetastasen eingesetzt wurden, einen direkten Einfluß auf das Wachstum und Apoptoseverhalten verschiedener Melanomzelllinien haben. Kürzlich wurde in Mammakarzinomzellen eine zentrale Rolle Sphingolipid-Stoffwechsels in der Regulation der Chemotherapieresistenz vermutet (Cabot *et al.*, 1996). Daten für Melanomzellen liegen bislang nicht vor.

1.2 Sphingolipide

Sphingolipide sind neben den Glycerophospholipiden und Cholesterol mit einem Anteil von ca. 2,5 % einer der Hauptbestandteile eukaryotischer Zellmembranen. In der Hornschicht der Haut, dem *Stratum corneum*, beträgt der Gehalt an Sphingolipiden sogar über 18 % (Elias, 1983). Das erste Sphingolipid wurde 1874 von W. Tudichum aus Hirngewebe isoliert. Da die Funktion dieser Lipide zunächst rätselhaft war, bezeichnete er sie nach der Sphinx der griechischen Mythologie als Sphingolipide.

1.2.1 Struktur und Biosynthese der Sphingolipide

Das Rückgrat der Sphingolipide besteht aus dem C₁₈-Aminoalkohol Sphingosin, der mit einer Fettsäure verestert wird und verschiedene Kopfgruppen tragen kann. Die Biosynthese der Sphingolipide beginnt mit der Kondensation von L-Serin und der aktivierten Fettsäure Palmitoyl-Coenzym A zu 3-Dehydrosphinganin. Dieser Schritt wird durch das Enzym Serin-Palmitoyltransferase katalysiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Sphingolipid-Biosynthese. 3-Dehydrosphinganin wird anschließend durch das Enzym 3-Dehydrosphinganin-Reduktase zu *D-erythro*-Sphinganin reduziert. Das Enzym Sphinganin-Acyltransferase katalysiert die Übertragung einer aktivierten, meist gesättigten und unverzweigten Fettsäure auf die 2-Amino-Gruppe des Sphinganins (Mandon *et al.*, 1992). Im nächsten Schritt der Biosynthese wird die *trans*-4,5-Doppelbindung durch eine Desaturase eingeführt, wodurch Ceramid entsteht, von dem sich alle weiteren Sphingolipide ableiten (Rother *et al.*, 1992). Bis zu diesem Schritt findet die Synthese an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Van Echten und Sandhoff, 1993).

Durch die glykosidische Verknüpfung von Galaktose oder Glukose mit der 1-Hydroxylgruppe des Ceramids beginnt die Biosynthese der Glykosphingolipide, die im Golgi-Apparat stattfindet (Futerman und Pagano, 1991). Im Golgi-Apparat findet auch die Synthese von Sphingomyelin statt, das durch die Übertragung der Phosphocholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf die primäre Hydroxylgruppe der Ceramids entsteht (Futerman *et al.*, 1990). Einen Überblick über die Biosynthese der Sphingolipide gibt Abbildung 1.

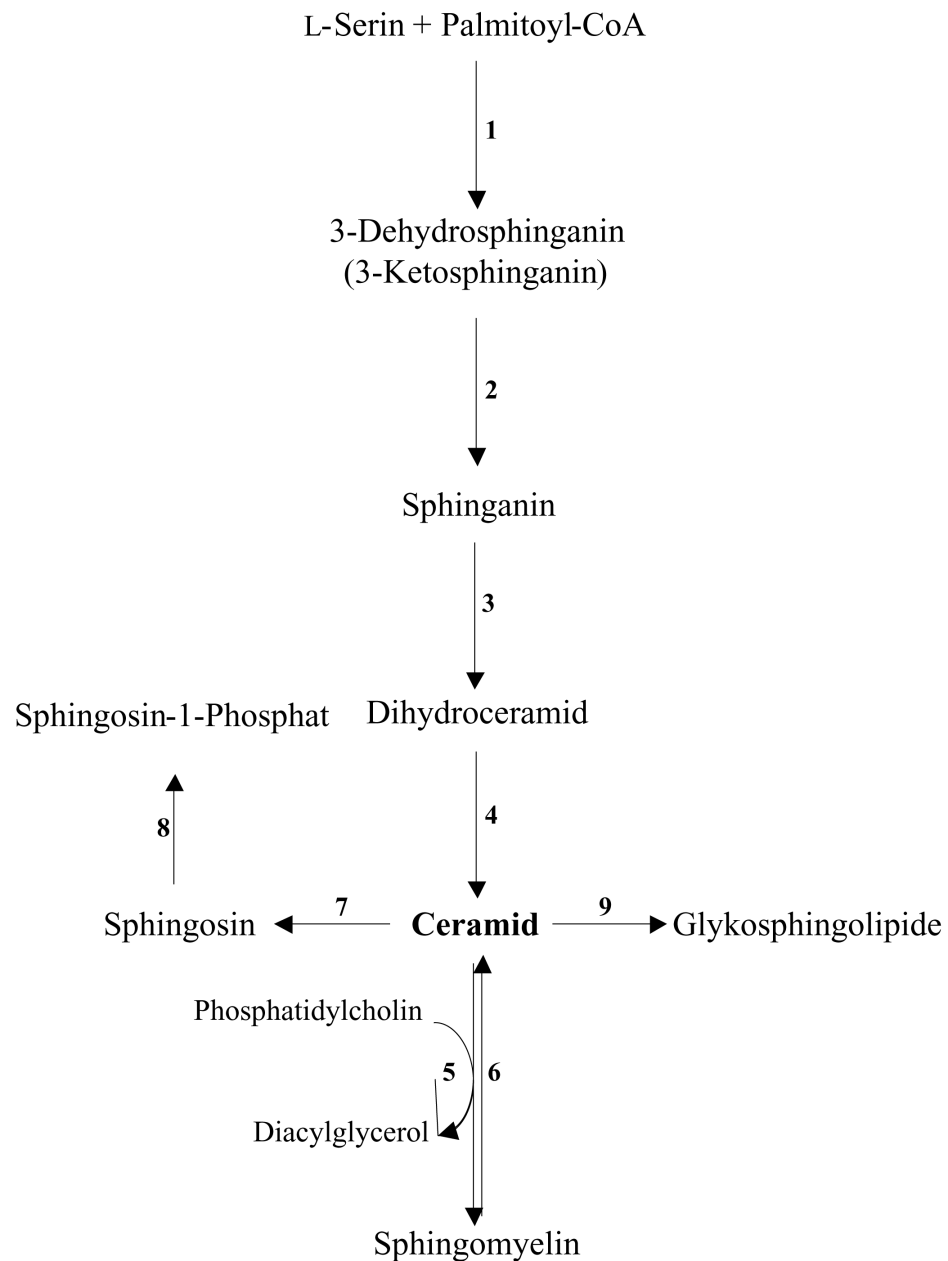


Abbildung 1: Die Biosynthese der Sphingolipide. Die Biosynthese der Sphingolipide findet bis zum Ceramid im ER statt. Alle weiteren Schritte erfolgen im Golgi-Apparat. Die Enzyme sind: 1: Serin-Palmitoyltransferase; 2: 3-Dehydrosphinganine-Reduktase; 3: Sphinganine-N-Acyltransferase; 4: Dihydroceramid-Desaturase; 5: Sphingomyelin-Synthase; 6: Sphingomyelinase; 7: Ceramidase; 8: Sphingosin-Kinase; 9: Glykosylceramid-Transferasen

1.3 Glykosphingolipide

Glykosphingolipide sind amphipatische Moleküle, die eine große heterogene Familie bilden. Sie entstehen durch die Übertragung von einem oder mehreren Zuckerresten auf die primäre Hydroxylgruppe von Ceramid. Diese Reaktion wird durch eine Reihe an Glykosyltransferasen katalysiert. In der Zelle sind Glykosphingolipide durch ihren Ceramidanteil in der äußeren Plasmamembran verankert, der hydrophile Zuckeranteil zeigt dabei in Richtung des Extrazellularraumes und ist hier an der Ausbildung der Glykokalix beteiligt (Riboni *et al.*, 1997). In der Natur gibt es eine Vielzahl an Glykosphingolipiden, die sich neben der Anzahl ihrer Zuckerreste auch in der Art der Verknüpfung der einzelnen Zucker unterscheiden. Dabei ist die Ausstattung eines Organismus mit Glykosphingolipiden art- und zelltypspezifisch. Diese Ausstattung der Zelle ändert sich im Verlauf der Differenzierung und durch virale oder onkogene Transformation (Hakomori, 1981). Trotz der Vielzahl an Glykosphingolipiden lassen sie sich in wenige Klassen einteilen (Abbildung 2). Glykosphingolipide der Zelloberfläche sind an Zelltyp-spezifischen Adhäsionsprozessen beteiligt (Varki, 1993) und dienen als Rezeptoren für Bakterien, Toxine und Viren (Markwell *et al.*, 1981; Karlsson, 1989). Zusätzlich sind sie von entscheidender Bedeutung für den Aufbau der Permeabilitätsbarriere der Haut (siehe Kapitel 1.5.2). Komplexe Glykosphingolipide können vom Immunsystem als Antigen erkannt werden und spielen bei einigen Autoimmunerkrankungen eine Rolle. So können z. B. beim insulinabhängigen *Diabetes mellitus* (Typ 1) Antikörper gegen Glykosphingolipide nachgewiesen werden (Misasi *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist die Hemmung der Sphingolipid-Biosynthese durch den Naturstoff Myriocin mit einer starken Immunsuppression verbunden (Miyake *et al.*, 1995). Alle Funktionen der Glykosphingolipide in der Zelle sind bislang jedoch nicht geklärt. In letzter Zeit rücken vor allem ihre Funktionen bei der Signalübermittlung ins Interesse der Forschung. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Glykosphingolipide am Aufbau von Mikrodomänen in der Plasmamembran, den sogenannten Rafts oder Caveolae, beteiligt sind. Sie könnten daher für eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen essentiell sein (Okamoto *et al.*, 1998).

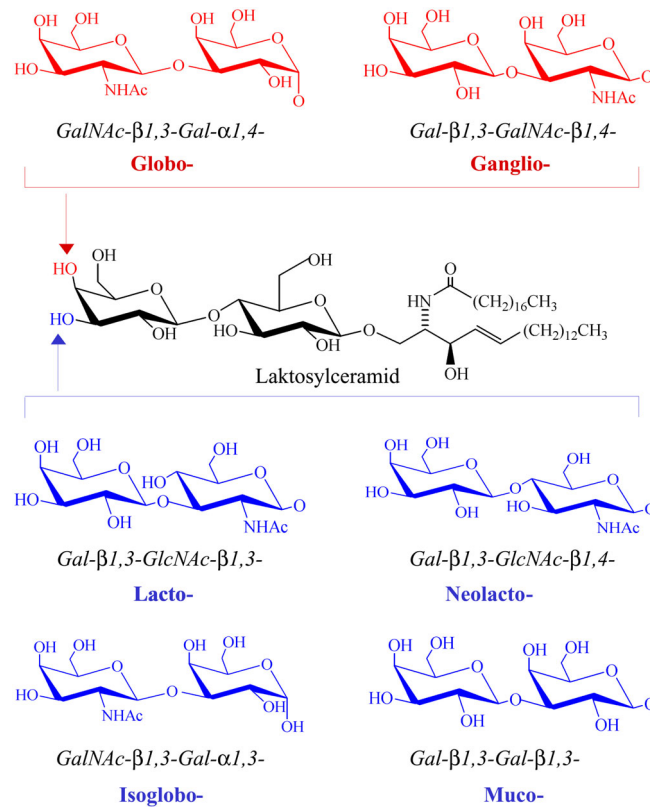


Abbildung 2: Strukturen und Trivialnamen der Glykosphingolipid-Serien von Säugetieren. Alle dargestellten Glykolipide leiten sich vom Laktosylceramid ab, das durch die Übertragung eines Glukoserestes und anschließend eines Galaktoserestes auf die primäre Hydroxylgruppe von Ceramid entsteht.

1.3.1 Die Biosynthese komplexer Ganglioside

Ganglioside sind saure Glykolipide der Ganglio- oder der Lacto-Serie, die eine oder mehrere Sialinsäuren enthalten (Kolter und Sandhoff, 1999). Besonders häufig sind sie auf der Oberfläche von Nervenzellen (Ledeen und Yu, 1992). Ihre Biosynthese wird hier kurz zusammengefasst. In Gangliosiden, aber auch in Glykoproteinen sind Sialinsäuren nur in α -glykosidischer Verknüpfung vorhanden. Die meisten anderen Zucker dagegen können sowohl in der α - als auch in der β -Konfiguration vorliegen. Mit Ausnahme von GM4 leiten sich alle Ganglioside strukturell und biosynthetisch vom Laktosylceramid ab. Durch membrangebundene Glykosyltransferasen werden im Golgi-Apparat weitere Zuckerreste einschließlich der Sialinsäure auf die Glykankette übertragen. Laktosylceramid und seine sialylierten Derivate GM3, GD3 und GT3 sind Vorstufen der komplexen Ganglioside der 0-, a-, b- und c-Serien (Abbildung 3). Ganglioside der c-Serie werden in menschlichem Gewebe nur in Spuren nachgewiesen (Kolter und Sandhoff, 1999). Die schrittweise Glykosylierung der Vorstufen wird überraschender-

weise nur durch wenige recht unspezifische Glykosyltransferasen durchgeführt. Untersuchungen der Lokalisation der Enzyme im Golgi-Apparat haben ergeben, daß die Vorläufermoleküle GM3 und GD3 in frühen Golgi-Kompartimenten gebildet werden und die komplexen Ganglioside überwiegend im *trans*-Golgi-Netzwerk (Lannert *et al.*, 1998). Neben der *de-novo*-Biosynthese können Glykosphingolipide auch in *Salvage*-Prozessen entstehen, bei denen Monosaccharide und insbesondere Sphingosin aus dem Glykosphingolipid-Abbau wiederverwendet werden (Gillard *et al.*, 1998). Dieser Prozeß wird auch als intramolekular-heterogener Turnover bezeichnet (Tauber *et al.*, 1983).

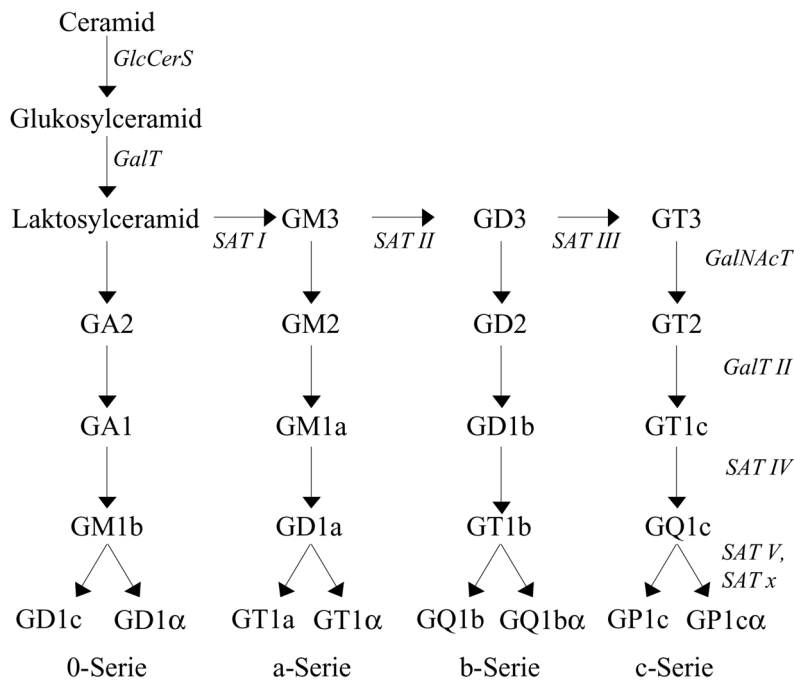


Abbildung 3: Biosynthese komplexer Ganglioside. Die einzelnen Reaktionsschritte werden von Membranständigen Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat katalysiert. Die Übertragung des Glukoserestes auf Ceramid findet dabei auf der zytosolischen Seite statt. Alle weiteren Schritte erfolgen im Lumen des Golgi-Apparates. Die Enzyme sind: GlcCerS: Glukosylceramid-Synthase; GalT: Galaktosylceramid-Transferasen; SAT: Sialyltransferasen; GalNAcT: *N*-Acetylgalaktosamin-Transferase

1.4 Die UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase

Die Grundstruktur der meisten Glykosphingolipide, das Glukosylceramid, wird auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates durch das Enzym UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase (Glukosylceramid-Synthase, EC 2.4.1.80) katalysiert (Coste *et al.*, 1986; Jeckel *et al.*, 1992). Das Enzym überträgt dabei den Glukoserest von UDP-Glukose auf die primäre Hydroxylgruppe von Ceramid (Abbildung 4) (Basu *et al.*, 1968). Diese Reaktion ist die Schrittmacherreaktion in der Gangliosid-Biosynthese (siehe Kapitel 1.3.1). Glukosylceramid war zusammen mit Sphingomyelin eines der ersten Sphingolipide, das 1874 von Tudichum isoliert wurde. Bei der Glukosylceramid-Synthase handelt es sich um ein Transmembranenzym, das 1996 kloniert werden konnte. Die cDNA des Enzyms weist 5' untranslatiert eine G / C reiche Region auf. Nahe des N-Terminus gibt es eine hydrophobe Region, welche die vermutete Signalanker-Sequenz ist. Eine vergleichbare Hydrophobizität konnte auch in einem Bereich nahe des C-Terminus festgestellt werden. Dieser Bereich interagiert möglicherweise mit der Membran. Vergleiche der Aminosäuresequenz zwischen der Glukosylceramid-Synthase und der Galaktosylceramid-Synthase haben keine erkennbaren Ähnlichkeiten gezeigt, obwohl beide Enzyme eine ähnliche Reaktion katalysieren (Ichikawa *et al.*, 1996).

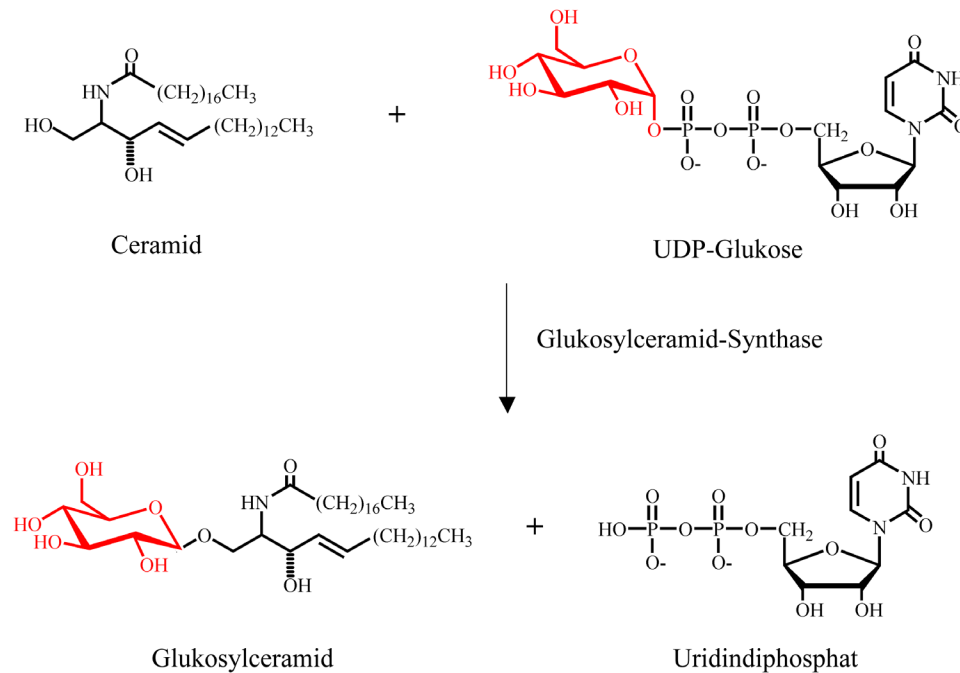


Abbildung 4: Umsetzung von Ceramid und UDP-Glukose durch die Glukosylceramid-Synthase. Die Reaktion wird auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates katalysiert. Sie stellt die Schrittmacherreaktion für die Biosynthese der meisten komplexeren Ganglioside dar.

Die Glukosylceramid-Synthase ist hauptsächlich im *cis/medial* Golgi-Apparat lokalisiert, jedoch über verschiedene Golgi-Subfraktionen, z. B. einer „*light smooth*“-Vesikel-Fraktion und einer „*heavy*“-Vesikel-Fraktion verteilt (Futerman und Pagano, 1991). Durch Aufreinigung und Anreicherung auf das mehr als 10.000-fache des Ausgangshomogenats konnte das Enzym näher charakterisiert werden. Für seine volle Aktivität benötigt das gereinigte Enzym Phospholipide (Cestelli *et al.*, 1979; Vunnam und Radin, 1979). Die größte Aktivität wird dabei durch Dioleoyl-Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin erreicht. Die Glukosylceramid-Synthase weist eine Stereo- und Substratspezifität für *D/L-erythro*-Ceramid auf. Die Aktivität ist zudem abhängig von der Kettenlänge des Substrates. Die besten Substrate sind *N*-Hexanoylsphingosin (C₆-Ceramid) und *N*-Octanoylsphingosin (C₈-Ceramid). Eine Aktivität mit Kettenlängen unter *N*-Pentanoylsphingosin (C₅-Ceramid) konnte nicht nachgewiesen werden. Von den Hexosen ist UDP-Glukose das bevorzugte Substrat, TDP- und CDP-Glukose werden jedoch auch effizient genutzt. Andere UDP-Hexosen wie UDP-Galaktose, UDP-Glukosamin oder UDP-Glukuronsäure wurden nicht oder nur zu einem geringen Teil umgesetzt (Paul *et al.*, 1996).

Immunpräzipitationen mit Golgi-Membranen haben gezeigt, daß sowohl der C-Terminus als auch eine hydrophile Schleife nahe des N-terminalen Endes vom Zytosol zugänglich sind. Die Behandlung von Golgi-Membranen mit quervernetzenden Reagenzien wie *N*-Hydroxysuccinimid führte zu einem ca. 50 kDa großen Peptid. Die gleiche Behandlung von aufgereinigter Glukosylceramid-Synthase hatte jedoch keinen Effekt. Dies deutet daraufhin, daß das Enzym *in vivo* im Golgi-Apparat als ein Heterodimer oder ein Oligomer mit einem bislang nicht identifizierten Protein vorliegt (Marks *et al.*, 1999).

Durch die Untersuchung verschiedener Mutanten hat sich gezeigt, daß für die katalytische Aktivität der Glukosylceramid-Synthase der C-terminale Bereich von entscheidender Bedeutung ist. Die Expression einer Mutante, der die letzten acht Aminosäuren des C-terminalen Endes fehlen, reduzierte die Aktivität des Enzyms auf 4 % im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Marks *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Aminosäuren Histidin¹⁹³ (His-193) und Cystein²⁰⁷ (Cys-207) für katalytische Reaktion essentiell sind. Dabei konnte nachgewiesen werden, das His-193 in oder nahe der Bindungsstelle sowohl für UDP-Glukose als auch für *D-threo*-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol (PDMP), einem Inhibitor für die Glukosylceramid-Synthase liegt (Wu *et al.*, 1999). Durch „*multiple alignment*“ der flankierenden Sequenz von His-193 und Cys-207 (Aminosäuren 89-278) konnte kürzlich zudem gezeigt werden, daß diese Region ein konserviertes D1, D2, D3 (Q/R)XXRW-Motiv enthält, das im mutmaßlichen aktiven Zentrum von prozessiven β -Glykosyltransferasen (z. B. Zellulose-Synthase) vorkommt. Mutationen in diesem Bereich führen zum vollständigen oder fast vollständigen Verlust der Aktivität der Glukosylceramid-Synthase. Damit konnte zum ersten Mal eine Ähnlichkeit zwischen der Glukosylceramid-Synthase und anderen Glykosyltransferasen nachgewiesen werden.

Die Regulation des Sphingolipidstoffwechsels ist für die Zelle von großer Bedeutung, da die Menge der einzelnen Metaboliten des Ceramids über das Schicksal der Zelle zu entscheiden scheinen. Während Ceramid selbst pro-apoptotisch ist (siehe Kapitel 1.5.1), sind mindestens zwei seiner Stoffwechselprodukte, das Sphingosin-1-Phosphat und das Glukosylceramid, anti-apoptotisch. Untersuchungen zur Regulation der Glukosylceramid-Synthase haben gezeigt, daß das Enzym sowohl durch die exogene Zugabe kurzkettiger Ceramid-Analoga als auch die intrazelluläre Bildung von Ceramid reguliert werden kann. In beiden Fällen konnte eine gesteigerte mRNA-Menge

in Huh-7-Hepatom-Zellen und der Maus-Melanomzelllinie B16 nachgewiesen werden. In B16-Melanomzellen konnte zudem gezeigt werden, daß nur die Glukosylceramid-Synthase, nicht aber die Sphingomyelin-Synthase reguliert wird. Die Sphingosinbildung ist ebenfalls nicht betroffen. Für die Regulation durch Ceramid ist der Wildtyp-Promotor des Enzyms essentiell. Steht das Gen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven CMV-Promotors, kann keine Regulation mehr nachgewiesen werden (Komori *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 2000).

1.5 Biologische Funktionen von (Glyko-)Sphingolipiden

Lange Zeit schrieb man den Sphingolipiden nur strukturgebende Eigenschaften zu. Das Interesse galt in erster Linie der Kohlenhydratkopfgruppe der Glykosphingolipide, da deren gestörter Abbau mit einigen Erkrankungen des Nervensystems zusammenhängt. Das Auftauchen einiger Glykosphingolipide nur in bestimmten Stadien der Embryonalentwicklung führte zu der Vermutung, daß Sphingolipide in der Gewebsentwicklung, der Onkogenese, dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung eine wesentliche Rolle spielen (Hakomori, 1981; Hannun und Bell, 1989). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß der konstitutive „*knock out*“ des Glukosylceramid-Synthase-Gens in Mäusen und der damit verbundene Verlust der Glykosphingolipide zum Tod der Embryone nach 7,5 bis 9,5 Tagen nach der Befruchtung führt. Die Embryogenese konnte in der Abwesenheit von Glukosylceramid ungestört bis zur Gastrulation, mit Differenzierung zu primitiven Keimblättern, ablaufen. Dieser Prozeß wurde dann jedoch durch abrupte Apoptose unterbrochen. *In vivo* waren die embryonalen Stammzellen, die defizient in der Glukosylceramid-Synthase sind, in der Lage zu Endoderm-, Mesoderm- und Ectoderm-Derivaten zu differenzieren, konnten aber in keinem Fall ausdifferenzierte Gewebe bilden. *In vitro* konnte die hämatopoetische und neuronale Differenzierung induziert werden. Diese Daten zeigen, daß die Synthese von Glykosphingolipiden essentiell für die Embryonalentwicklung und Gewebsdifferenzierung ist. Trotz der gestörten Glykosphingolipid-Biosynthese konnte kein Anstieg an intrazellulärem Ceramid nachgewiesen werden, so daß die Ursachen für die Apoptose andere sind (Yamashita *et al.*, 1999).

Die Entdeckung, das Sphingosin die Proteinkinase C hemmt zog die Aufmerksamkeit auf den Lipidanteil der Sphingolipide und führte zu der Hypothese, daß es sich bei

den Sphingolipidabkömmlingen um Signalmoleküle handelt. Die Behandlung der humanen Leukämie-Zelllinie HL-60 mit $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 verursacht die Differenzierung dieser Zelllinie zu Monozyten (Miyaura *et al.*, 1981). Dieser zeit- und konzentrationsabhängige Prozeß wird durch einen Anstieg an Ceramid und Phosphocholin in der Zelle begleitet. Der Anstieg an Ceramid erreicht nach zwei Stunden ein Maximum und ist nach vier Stunden wieder auf den Ausgangswert abgesunken. Der Anstieg des Ceramidgehaltes wird durch die Aktivierung einer Sphingomyelinase bewirkt. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung vom Sphingomyelin zu Phosphocholin und Ceramid. Die Resynthese des Sphingomyelins findet durch die Übertragung einer Phosphocholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid statt (Okazaki *et al.*, 1989; Geilen *et al.*, 1996). Inzwischen ist bekannt, daß Ceramid in einer Vielzahl von apoptotischen Signalwegen (siehe Kapitel 1.5.1), im Aufbau der Hautbarriere (siehe Kapitel 1.5.2) und bei der Chemotherapieresistenz von Krebs eine wichtige Rolle spielt (siehe Kapitel 1.6.1).

1.5.1 Sphingolipide und Apoptose

Apoptose ist ein natürlich vorkommender Prozeß des Zelltodes, der im Gegensatz zur Nekrose, eine physiologische Form des Zelltodes ist. Durch die Apoptose können gezielt einzelne Zellen aus dem Gewebeverband eliminiert werden, zum Beispiel während der Embryonalentwicklung. Eine genaue Regulation der Apoptose ist für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase genauso wichtig wie die Regulation des Zellwachstums. Die Zellen in einem Organismus sind unter ständigem Druck von pro- und anti-apoptotischen Stimuli. Dieses Verhältnis bestimmt, ob eine Zelle schließlich stirbt. Viele Krankheiten beruhen auf einem gestörten Verhältnis von Proliferation zu Apoptose. Bei den degenerativen Nervenerkrankungen Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson liegt z. B. eine erhöhte Apoptoserate vor. Bei Krebserkrankungen handelt es sich häufig um eine zu geringe Apoptoserate.

Ein gutes Modell für die Erforschung apoptotischer Signalwege stellte der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) dar. In der Entwicklung dieses Wurms sterben exakt 131 Zellen ab. Diese Entwicklung wird durch drei Gene reguliert, für die es auch Homologe beim Menschen gibt. *Ced-3* ist eine Protease die, homolog zu den Caspasen beim Menschen ist. *Ced-4* codiert für ein Adaptermolekül, dessen Homolog beim Menschen Apaf-1 ist und wichtig bei apoptotischen Signalwegen über das

Mitochondrium ist. Das dritte Gen ist das anti-apoptotische *ced-9*, ein Homolog zu Bcl-2 (Fesus, 1993; Hale *et al.*, 1996).

Zellen, die in der Apoptose sind, zeigen charakteristische Merkmale. Die Zellen schrumpfen, es kommt zu einer Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA. Zusätzlich kann man auf der Zelloberfläche eine Blasenbildung („*Blebbing*“) beobachten. Schließlich werden von der Zelle Membran-umhüllte Vesikel („*apoptotic bodies*“) abgegeben, die die Zellfragmente enthalten. Diese Vesikel werden von Makrophagen oder dem umliegenden Gewebe phagozytiert.

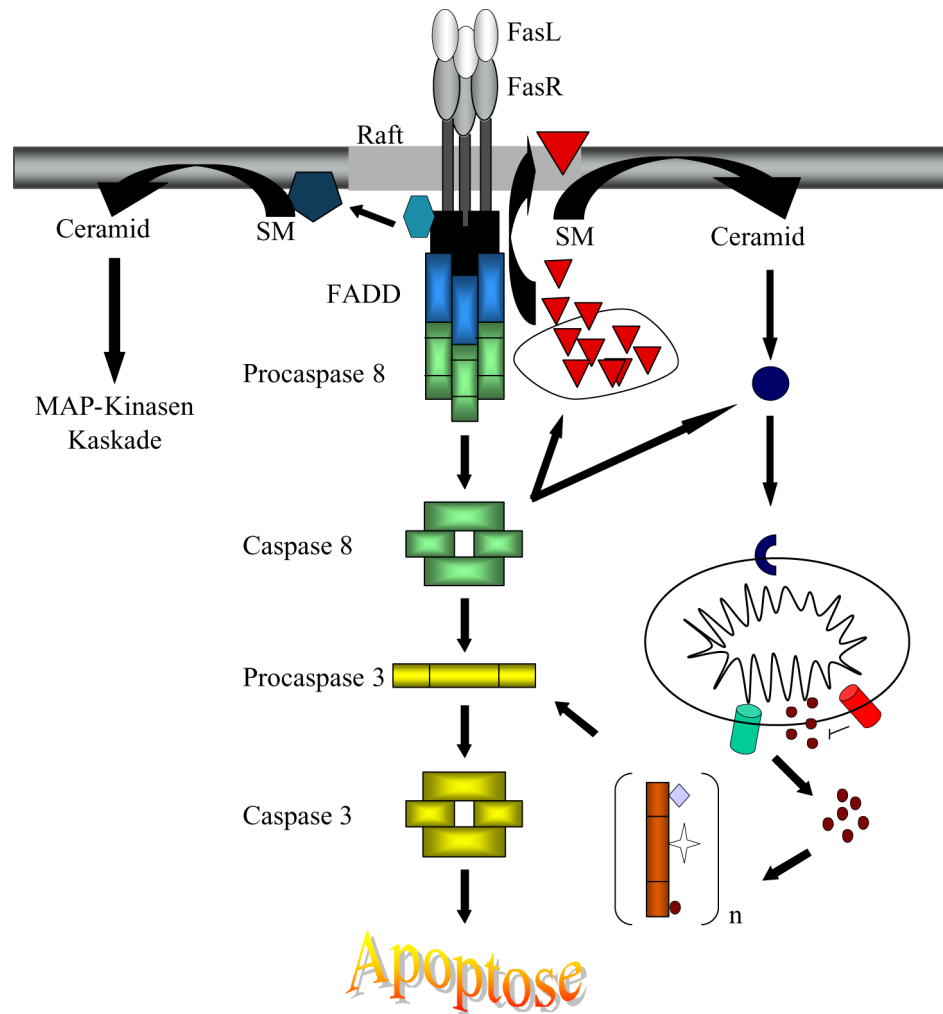
Die Apoptose kann in drei Phasen eingeteilt werden. Die Initiations-, die Kontroll- und die Effektorphase. In der Initiationsphase wird die apoptotische Signalkette eingeleitet. In der Kontrollphase führt die Interaktion verschiedener pro- und anti-apoptotischer Signale zur Ausführung oder zum Abbruch der Apoptose. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Mitochondrium. In der Effektorphase werden die Exekutions-caspasen aktiviert, die Apoptose kann jetzt nicht mehr gestoppt werden. Die Initiationsphase ist die variabelste Phase und wird häufig durch die Aktivierung von Todesrezeptoren ausgelöst. Todesrezeptoren sind Intermembranproteine, die alle zur Tumornekrose-Faktor-(TNF) Rezeptor-Superfamilie gehören. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einem Transmembranbereich und einer intrazellulären Domäne. Einer der am besten beschriebenen Todesrezeptoren ist CD95R (Apo-1/Fas) (Trauth *et al.*, 1989; Yonehara *et al.*, 1989). Für die Aktivierung müssen der Ligand und der Todesrezeptor trimerisieren. Unterhalb der Todesrezeptoren gibt es zwei Wege, zum einen die direkte Aktivierung der Caspasen, zum anderen den Weg über das Mitochondrium. Bei der direkten Aktivierung der Caspasen wird nach einem apoptotischen Signal durch die Anlagerung von Adaptermolekülen an den Todesrezeptor zunächst die Initiatorcaspase, Caspase-8, aktiviert, die dann wiederum zu einer Aktivierung der Exekutionscaspase, Caspase-3, führt. Für die Weiterleitung des Signals über das Mitochondrium findet zunächst ebenfalls eine Aktivierung der Caspase-8 statt. Anschließend wird das Bcl-2-Protein Bid gespalten und lagert sich zusammen mit anderen Bcl-2-Proteinen wie z. B. Bax in der äußeren mitochondrialen Membran an. Das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen ist entscheidend für die Weiterleitung des apoptotischen Signals weitergeleitet wird (Raisova *et al.*, 2001). Ist das Verhältnis zu Gunsten der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine verschoben, kommt es nicht zur Apoptose. Ist das Verhältnis zu Gunsten der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine verschoben kommt es zur Ausbildung von Poren über

die Cytochrom c und andere Faktoren in das Zytosol abgegeben werden. Cytochrom c lagert sich zusammen mit ATP, Apaf-1 und Procaspase-9 zu einem Komplex zusammen, der zur Aktivierung von Caspase-3 führt (Daniel *et al.*, 2001) (Abbildung 5).

Neben den Proteinen, die bei der Signalübermittlung während der apoptotischen Signalkaskade eine Rolle spielen, wurde in den letzten Jahren zunehmend auch die Rolle von Sphingolipiden untersucht. Die Auslösung der Apoptose durch Ceramid wurde erstmals durch in Leukämie-Zellen beschrieben (Obeid *et al.*, 1993). Ceramid kann in der Zelle zum einen durch die Neusynthese von Sphingolipiden, zum anderen aber auch durch die Hydrolyse von Sphingomyelin in der Plasmamembran durch Sphingomyelinasen entstehen (Abbildung 1). Sphingomyelinasen sind Enzyme, die spezifisch die Phosphodiester-Bindung von Sphingomyelin hydrolysieren. Verschiedene Isoformen können durch ihre unterschiedlichen pH-Optima unterschieden werden. Einige dieser Enzyme sind bereits auf molekularer Ebene charakterisiert. Die neutrale (nSMase) und saure Sphingomyelinase (aSMase) werden beide durch verschiedene Streß-Stimuli sehr schnell aktiviert, was zu einem intrazellulärem Anstieg an Ceramid führt (Mathias *et al.*, 1998; Hannun *et al.*, 2001). Die Aktivität der alkalischen Sphingomyelinase wird nur im Darm gefunden und hat wahrscheinlich keine Aufgaben in der Signalübermittlung.

Kürzlich wurde beschrieben, daß sich der CD95-Rezeptor bereits in trimerisierter Form auf der Zelloberfläche in definierten Membrandomänen befindet, die als Rafts bezeichnet werden (Cremesti *et al.*, 2001). Lipidomänen in der Plasmamembran wurden erstmals von Carter und Hakomori (1981), als Detergenz unlösliche Bereiche in der Plasmamembran von Fibroblasten beschrieben. Der Begriff „Rafts“ definiert sich nach der Methode ihrer Isolation. Dabei handelt es sich um Membranbereiche, die bei 4 °C unlöslich in nicht ionischen Detergenzien sind (Simons und Ikonen, 1997). Rafts haben eine spezielle Lipidzusammensetzung, sind reich an Cholesterol, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden wie dem Gangliosid GM1. Membranen, die diese Eigenschaften haben sind Caveolae, die zusätzlich noch das Strukturprotein Caveolin haben (Smart *et al.*, 1999). Die Aktivierung von CD95R in den Rafts führt zur Aktivierung geringer Mengen Caspase-8, welche die saure Sphingomyelinase aktiviert (Liu und Anderson, 1995; Bilderback *et al.*, 1997). Die saure Sphingomyelinase wurde wegen ihres pH-Optimums von pH 4,5–5 ursprünglich nur den Lysosomen zugeschrieben. Kürzlich wurde jedoch eine Isoform in sekretorischen Vesikeln nahe der

Plasmamembran beschrieben, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden kann (Schissel *et al.*, 1998a; Schissel *et al.*, 1998b; Grassme *et al.*, 2001). Diese Isoform der sauren Sphingomyelinase scheint für die Bildung von Ceramid in den Caveolae verantwortlich zu sein. Die Hydrolyse von Sphingomyelin führt hier zum Zusammenschluß weiterer aktivierter Todesrezeptoren. Auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran lagern sich an die Todesdomänen der CD95-Rezeptoren Adaptermoleküle wie „*Fas associated with a death domain*“ (FADD) an. An diese Moleküle kann sich im weiteren Procaspase-8 anlagern und durch Spaltung aktiviert werden. Der Komplex aus Todesrezeptor, Adaptermolekül und Procaspase-8 wird als „*death inducing signalling complex*“ (DISC) bezeichnet. Das Signal wird durch die Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid zum Mitochondrium weitergeleitet.















	nSMase		gespaltenes Bid		Apaf-1
	Mitochondrium		pro-apoptisches Bcl-2-Protein		dATP
	aSMase		anti-apoptisches Bcl-2-Protein		Bid
	sekretorische Vesikel mit aSMase		Cytochrom c		FAN

Abbildung 5: Übersicht über die FasR vermittelten apoptotischen Signalwege. Die Einleitung der Apoptose beginnt häufig mit der Aktivierung von Todesrezeptoren. An den aktivierten Rezeptor können sich dann Adaptermoleküle anlagern und Procaspase-8 anlagern. Das Signal kann dann zum einen direkt zur Procaspase-3 weitergeleitet werden, die durch Caspase-8 in ihre aktive Form gespalten wird und anschließend verschiedene Todessubstrate spaltet. Der zweite Weg führt über die Aktivierung des Mitochondriums. Auf diesem Weg spielt Ceramid eine Rolle. Dessen Entstehung in der Plasmamembran durch die Aktivität der sauren Sphingomyelinase (aSMase) führt zu weiterer Rezeptor-Vernetzung. Anschließend wird das Bcl-2-Protein Bid gespalten und wandert in die äußere mitochondriale Membran, in der Poren entstehen. Durch diese Poren kann Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt werden. Dort bildet es mit Apaf-1, dATP und Procaspase-9 einen Komplex, der zur Aktivierung der Caspase-3 und zur Apoptose führt. Die Aktivierung einer neutralen Sphingomyelinase (nSMase) führt dagegen zur Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade.

Die Rolle der sauren Sphingomyelinase bei der Induktion der Apoptose ist jedoch umstritten. Bezombes *et al.* (2001), konnten in Niemann-Pick-Zellen zeigen, daß die saure Sphingomyelinase nicht notwendig für die Auslösung der Apoptose ist. Morbus Niemann-Pick ist eine autosomal rezessive Krankheit, bei der ein Defekt der sauren Sphingomyelinase vorliegt und sich Sphingomyelin daher in den Lysosomen anstaut (Levade *et al.*, 1986). Obwohl die Zellen defizient für die sauren Sphingomyelinase sind, konnten Daunorubicin und Doxorubicin Apoptose auslösen. Beide Anthracycline induzieren Apoptose durch einen Anstieg an intrazellulärem Ceramid (Jaffrezou *et al.*, 1996; Cuvillier *et al.*, 1998). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, daß die Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)-induzierte Apoptose durch Hemmung der neutralen Sphingomyelinase mit dem nicht kompetitiven Inhibitor GW4869 verhindert werden kann (Luberto *et al.*, 2002). Für die TNF- α -induzierte Apoptose ist das Adaptermolekül „*factor associated with neutral sphingomyelinase*“ (FAN) notwendig, das oberhalb der Todesdomäne an den TNF- α Rezeptor bindet und die neutrale Sphingomyelinase aktiviert. Dadurch kommt es zur Bildung von Ceramid, das vermutlich die MAP-Kinasen-Kaskade aktiviert (Segui *et al.*, 2001).

Die Ceramid-induzierte Apoptose kann nicht nur durch die Aktivierung von Todesrezeptoren ausgelöst werden, sondern auch durch die Behandlung von Zellen mit Ceramid oder Ceramidanaloga (Obeid *et al.*, 1993; Bektas *et al.*, 1998). Sowohl die Rezeptorvermittelte Apoptose als auch die durch exogenes Ceramid vermittelte kann durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 verhindert werden (Müller-Wieprecht *et al.*, 2000). Kürzlich konnte in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, daß für die Auslösung der Apoptose durch Ceramid das pro-apoptotische Bcl-2-Protein Bax wichtig ist. Zellen, denen das Bax-Gen und damit auch das Protein fehlt oder die mit Bax-Antisense behandelt wurden, sind resistent gegenüber der Behandlung mit Ceramid (Kim *et al.*, 2001; Von Haefen *et al.*, 2002).

Der intrazelluläre Ceramidspiegel kann zusätzlich auch noch durch die Beeinflussung von Stoffwechselwegen verändert werden. Die Inhibition der Cytidylyltransferase durch Hexadecylphosphocholin (HePC), des Schrittmacher-Enzyms in der Phosphatidylcholin-Biosynthese, führt zu einem Anstieg an Ceramid. Die Phosphatidylcholin-Biosynthese ist mit dem Sphingolipidstoffwechsel bei der Sphingomyelinsynthese verbunden. Für die Synthese von Sphingomyelin wird die Phosphocholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid übertragen (siehe Abbildung 1). Die

Hemmung des Phosphatidylcholinstoffwechsels führt daher auch zur Hemmung der Sphingomyelin synthese und zu einem Anstieg an intrazellulärem Ceramid (Wieder *et al.*, 1998). Der Eingriff in den Katabolismus der Sphingolipide kann ebenfalls zu einem Anstieg von Ceramid führen. Kürzlich konnten Raisova *et al.* (2002), zeigen, daß die Hemmung der Ceramidase mit den neuartigen Ceramidaseinhibitoren (1S,2R)-2-*N*-Myristoylamino-1-phenyl-1-propanol (*D-e*-MAPP) und (1R,2R)-2-*N*-Myristoylamino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol (*D*-NMAPPD) in HaCaT-Keratinocyten und Melanomzellen zu einem Ceramidanstieg und dadurch zur Apoptose führt. Ceramidasen sind Enzyme, die Ceramid zu Sphingosin und einer Fettsäure abbauen. Die durch die Inhibitoren ausgelöste Apoptose konnte durch die Überexpression von Bcl-2 verhindert werden. Der Einfluß von Ceramidasen auf die Ceramid-induzierte Apoptose ist interessant, da auch eine mitochondriale Form dieses Enzyms beschrieben ist (El Bawab *et al.*, 2000).

Kürzlich konnte die Hypothese eines mitochondrialen Ceramidpools bestätigt werden. Matsko *et al.* (2001), konnten bei der Untersuchung der CD95- und Strahlen-induzierten Apoptose einen Anstieg von Ceramid im Mitochondrium nachweisen. Dieses Ceramid kann die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran durch Porenbildung beeinflussen. Durch diese Poren können Proteine mit einem maximalen Molekulargewicht von $M_r = 60.000$ ins Zytosol gelangen. Unklar ist, ob Cytochrom c durch diese Poren abgegeben wird (Siskind *et al.*, 2002). Die Überexpression der bakteriellen Sphingomyelinase in MCF7-Brustkrebszellen hat zudem gezeigt, daß die Hydrolyse eines mitochondrialen Pools von Sphingomyelin die Apoptose auslöst. Die Zellen wurden hierfür mit bakterieller Sphingomyelinase transfiziert, die zudem noch Zielsequenzen für unterschiedliche zelluläre Kompartimente enthielt. Dabei zeigte sich bei der Untersuchung der Apoptose, daß nur Zellen sterben, bei denen die Sphingomyelinase die Zielsequenz für das Mitochondrium enthielt (Birbes *et al.*, 2001).

Neben Ceramid als pro-apoptischen Stimuli werden auch Glykosphingolipide, vor allem GD3 als pro-apoptisch beschrieben. Genau wie Ceramid löst GD3 die Apoptose über den mitochondrialen Signalweg aus und führt zur Freisetzung von Cytochrom c. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß es durch die Aktivierung des CD95-Rezeptors neben der Bildung von Ceramid auch zur Bildung von GD3 kommt. GD3 ist in der Lage, an isolierten Ratten-Mitochondrien die Cyclosporin A abhängige „*permeability transition pore*“ (PTP) zu öffnen und dadurch Cytochrom c frei zu setzen. Dieser Effekt ist spezifisch für GD3 und kann nicht durch andere Ganglioside wie GD1a oder GM3

ausgelöst werden (Kristal und Brown, 1999; Scorrano *et al.*, 1999). Diese Daten werden durch die Beobachtung unterstützt, daß die Behandlung von Hepatozyten mit TNF- α zu einer Umsortierung von GD3 von der Plasmamembran zum Mitochondrium führt. Dieser Effekt kann auch durch die saure Sphingomyelinase oder durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden, nicht jedoch durch neutrale Sphingomyelinase. Die Hemmung der Gangliosid-Biosynthese durch die Hemmung der Glukosylceramid-Synthase führt zu einer Hemmung der Kolokalisation von GD3 mit dem Mitochondrium. Während des Prozesses der Umsortierung kann GD3 in frühen und späten Endosomen nachgewiesen werden (Garcia-Ruiz *et al.*, 2002).

Neben der Apoptose können Zellen auch durch Nekrose sterben. Dabei handelt es sich im Gegensatz zur Apoptose jedoch um einen passiven Tod, der keine Energie erfordert. Die Zelle schwillt an und platzt schließlich, wobei sich ihr Inhalt *in vivo* in das umliegende Gewebe ergießt. Dies führt schließlich zu einer Entzündungsreaktion. Dieser nekrotische Zelltod ist für den Organismus immer pathologisch.

Neben den apoptotischen Sphingolipiden sind auch verschiedene Metaboliten beschrieben, die eine anti-apoptotische Wirkung haben. Das Gangliosid GM1 ist in der Lage, Nervenzellen und Rattenfibroblasten vor der Apoptose durch Wachstumsfaktor-Entzug und der Behandlung mit *N*-Acetylsphingosin (C_2 -Ceramid) zu schützen (Ferrari *et al.*, 1995).

Das am besten beschriebene anti-apoptotische Sphingolipid ist Sphingosin-1-phosphat. Für dieses Molekül sind neben den intrazellulären Effekten auch extrazelluläre Rezeptoren beschrieben. Dabei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Edg-Familie. Die Aktivierung dieser Rezeptoren beeinflusst u. a. die Morphologie der Zellen und reguliert *in vitro* die Angiogenese (Spiegel, 1999; Spiegel, 2000).

1.5.2 Rolle der Sphingolipide in der Haut

Die Epidermis von Landsäugetieren hat sich im Verlauf der Evolution zu einer Barriere entwickelt, die zum einen Schutz vor äußeren Einflüssen bietet, zum anderen aber auch einen zu großen Wasserverlust aus dem Inneren des Körpers verhindert. Diese Barriere wird durch die Balance von Zellwachstum und Differenzierung von 10 - 20 Keratinozytenschichten aufrechterhalten. In der Keimschicht der Haut (*Stratum basale*) teilen sich ständig Keratinozyten. Jeweils eine Tochterzelle wandert dann nach

der Teilung langsam in Richtung der Hautoberfläche. Dabei differenziert die Zelle allmählich aus, verliert ihren Zellkern und verändert die Morphologie, bis sie zu einem Korneozyten geworden ist. Um das Gleichgewicht aufrecht zu halten, werden an der Oberfläche der Haut (Hornschrift, *Stratum corneum*) ständig Zellen durch Schuppung abgetragen (Abbildung 6).

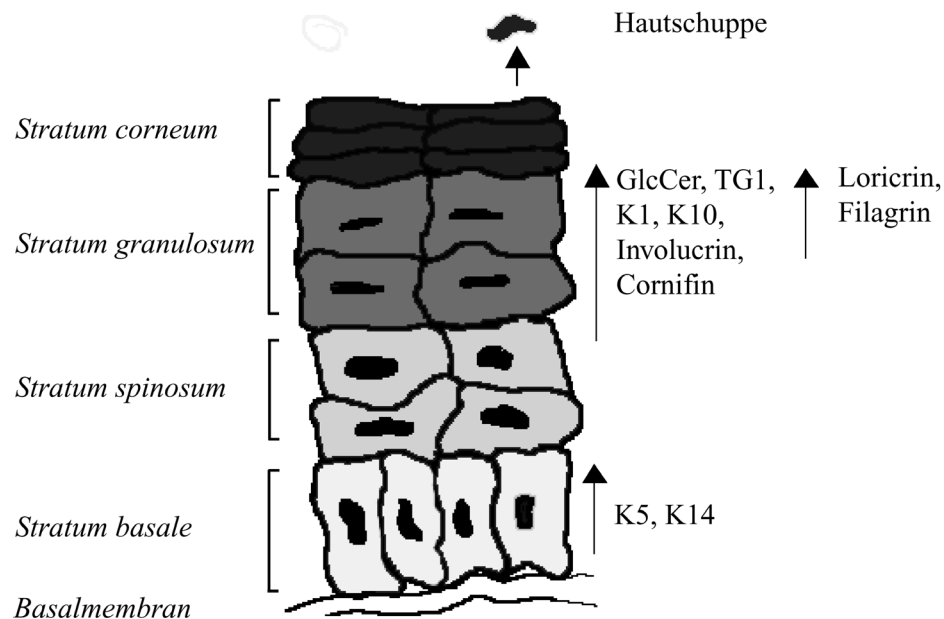


Abbildung 6: Aufbau der Haut. Die Haut bildet das größte Organ des Menschen. Sie stellt eine Barriere dar, die den Körper vor äußeren Einflüssen und zu großem Wasserverlust aus dem Inneren schützt. Die unterschiedlichen Schichten der Haut unterscheiden sich im Differenzierungszustand der Keratinozyten. Nach der Zellteilung in der Basalschicht, wandert eine der Tochterzellen in Richtung der Hautoberfläche. Auf diesem Weg differenziert sie zunehmend aus. Abgestorbene Zellen werden ständig von der Hautoberfläche durch Schuppung entfernt. Abkürzungen: K : Keratin; GlcCer: Glukosylceramid; TG1: Transglutaminase-1

Diese Zellschicht bildet einen mechanischen Schutz für den Organismus, der noch durch ein Proteingerüst verstärkt wird, das die Zellen miteinander verbindet. Für den Aufbau der Wasserschutz-Barriere sind Lipide verantwortlich, die von den Zellen in den Extrazellularraum abgegeben werden. Dabei spielen vor allem Sphingolipide eine große Rolle (siehe Tabelle 1). Die Inhibition der Sphingolipid-Biosynthese mit dem irreversiblen Serin-Palmitoyltransferase-Inhibitor β -Chloro-L-alanin führt zu einer deutlich gestörten Reparatur der Barriere nach Verletzungen.

Tabelle 1: Veränderungen der Lipidzusammensetzung während der Differenzierung der Haut (Gew. %) (Elias, 1983).

<i>Fraktion</i>	<i>Strata basale / spinosum</i> (<i>n</i> = 5)	<i>Stratum granulosum</i> (<i>n</i> = 7)	<i>Stratum corneum</i> (<i>n</i> = 4)
Polare Lipide	44,5 ± 3,4	25,3 ± 2,6	4,9 ± 1,6
Cholesterolsulfat	2,6 ± 3,4	5,5 ± 1,3	1,5 ± 0,2
Neutrale Lipide	51,0 ± 4,5	56,5 ± 2,8	77,7 ± 5,6
Freie Sterole	11,2 ± 1,7	11,5 ± 1,1	14,0 ± 1,1
Freie Fettsäuren	7,0 ± 2,1	9,2 ± 1,5	19,3 ± 3,7
Triglyceride	12,4 ± 2,9	24,7 ± 4,0	25,2 ± 4,6
Sterol/Wachs-ester	5,3 ± 1,3	4,7 ± 0,7	5,4 ± 0,9
Squalene	4,9 ± 1,1	4,6 ± 1,0	4,8 ± 2,0
n-Alkane	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,8	6,1 ± 2,6
Sphingolipide	7,3 ± 1,0	11,7 ± 2,7	18,1 ± 2,8
Glukosylceramide	3,5 ± 0,3	5,3 ± 0,2	Spuren
Ceramide	3,8 ± 0,2	8,8 ± 0,3	18,1 ± 0,4
Total	99,1	101,1	99,3

Die Hauptlipide der Barriere im *Stratum corneum* sind Ceramide, die von Glukosylceramiden abstammen (Abbildung 7). *In vitro*-Studien an kultivierten humanen Keratinozyten zeigten, daß die RNA Expression der Glukosylceramid-Synthase und ihre Aktivität im Verlauf der Differenzierung gesteigert werden (Sando *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse konnten durch *In situ*-Untersuchungen bestätigt werden, die gezeigt haben, daß Ceramid und seine Metaboliten in undifferenzierten Keratinozyten im Golgi-Apparat akkumulieren. Im Verlauf der Differenzierung findet dann eine Anhäufung der Sphingolipide in vesikulären Strukturen statt, die möglicherweise vom *trans*-Golgi abstammen. Zusätzlich findet eine verstärkte Proteinexpression der Glukosylceramid-Synthase während der Differenzierung der Hautzellen statt (Watanabe *et al.*, 1998). Die intrazellulär gebildeten Glukosylceramide werden anschließend durch Vesikel („*Odland Bodies*“) in den Extrazellulärraum abgegeben. Dort können sie durch β -Cerebrosidasen und Ceramidasen weiter prozessiert werden. β -Cerebrosidasen sind Enzyme, die den Glukoserest von Glukosylceramid abspalten, so daß wieder Ceramid entsteht. Durch die Aktivität der Ceramidasen wird das Ceramidmolekül zu Sphingosin und einer Fettsäure gespalten. Diese Fettsäuren können dann mit den Proteinen der extrazellulären Matrix verknüpft werden.

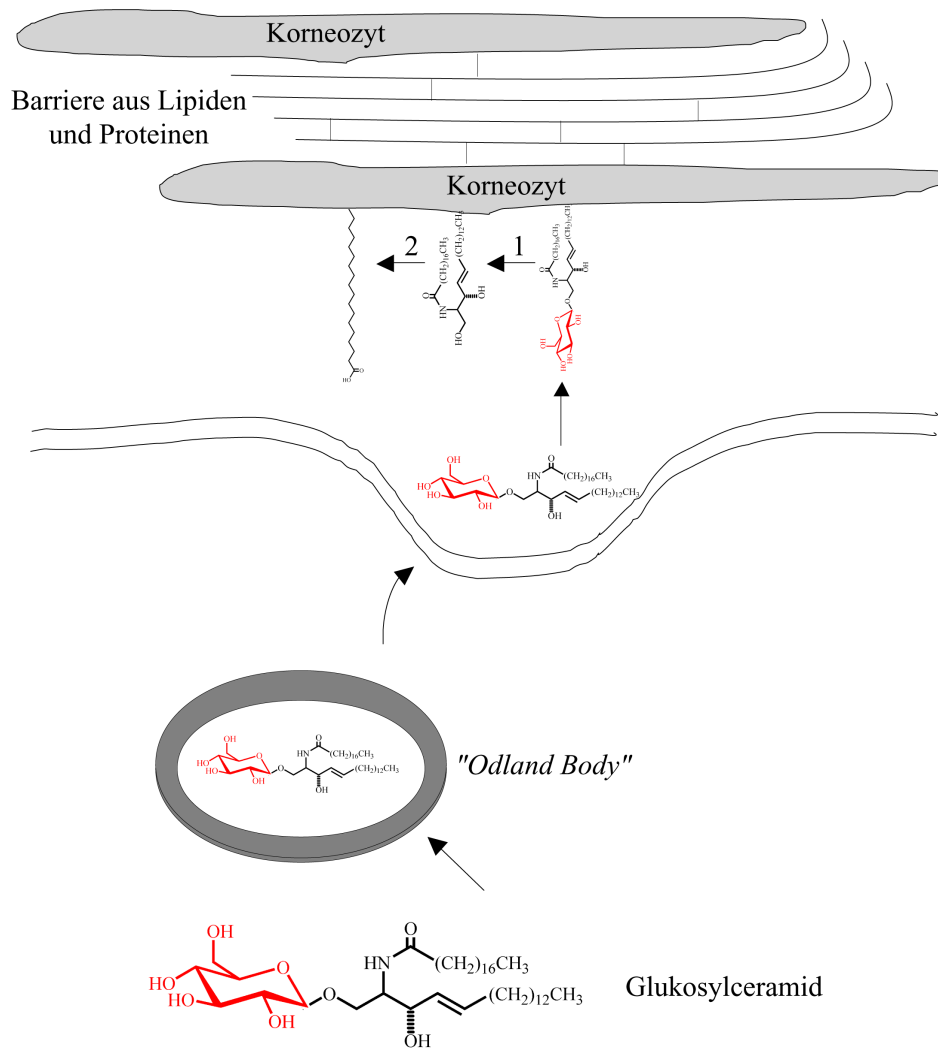


Abbildung 7: Bildung der Hautbarriere. Die für die Barriere benötigten Sphingolipide werden intrazellulär gebildet und anschließend durch Vesikel („Odland Bodies“) in den Extrazellulärraum transportiert. Dort können sie durch Cerbrosidasen (1), die Glukoserest abspalten und Ceramidasen (2), die das Ceramid zu Sphingosin und einer freien Fettsäure abbauen, weiter prozessiert werden. Zusätzlich können die Lipide des *Stratum corneum*s kovalent mit Proteinen der extrazellulären Matrix verknüpft werden.

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß neben Glukosylceramiden auch Sphingomyeline als Vorstufen für epidermale *Stratum corneum*-Ceramide dienen können (Abbildung 8). Von den sieben heterogenen Ceramiden der Haut, können vermutlich jedoch nur zwei aus Sphingomyelin-Vorläufern gebildet werden (Uchida *et al.*, 2000; Hamanaka *et al.*, 2002). Neben den verschiedenen Vorläufern des Ceramids in der Haut konnte auch die Lokalisation von Ceramid und Glukosylceramid ermittelt werden. Ceramid ist in basalen Zellen vor allem in der Kernmembran und der inneren und äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert. In etwas geringerer Menge

läßt es sich im Golgi-Apparat und der Plasmamembran nachweisen. In der oberen Epidermis ist Ceramid vor allem in „*lamellar bodies*“ und *trans*-Golgi-artigen Strukturen zu finden, sowie im „*cornified envelope*“, der Barriere der Haut. Glukosylceramid dagegen ist vor allem in *trans*-Golgi-artigen Strukturen und in „*lamellar bodies*“ im *Stratum granulosum* zu finden, sowie in der ersten Zellschicht des *Stratum corneums* (Vielhaber *et al.*, 2001).

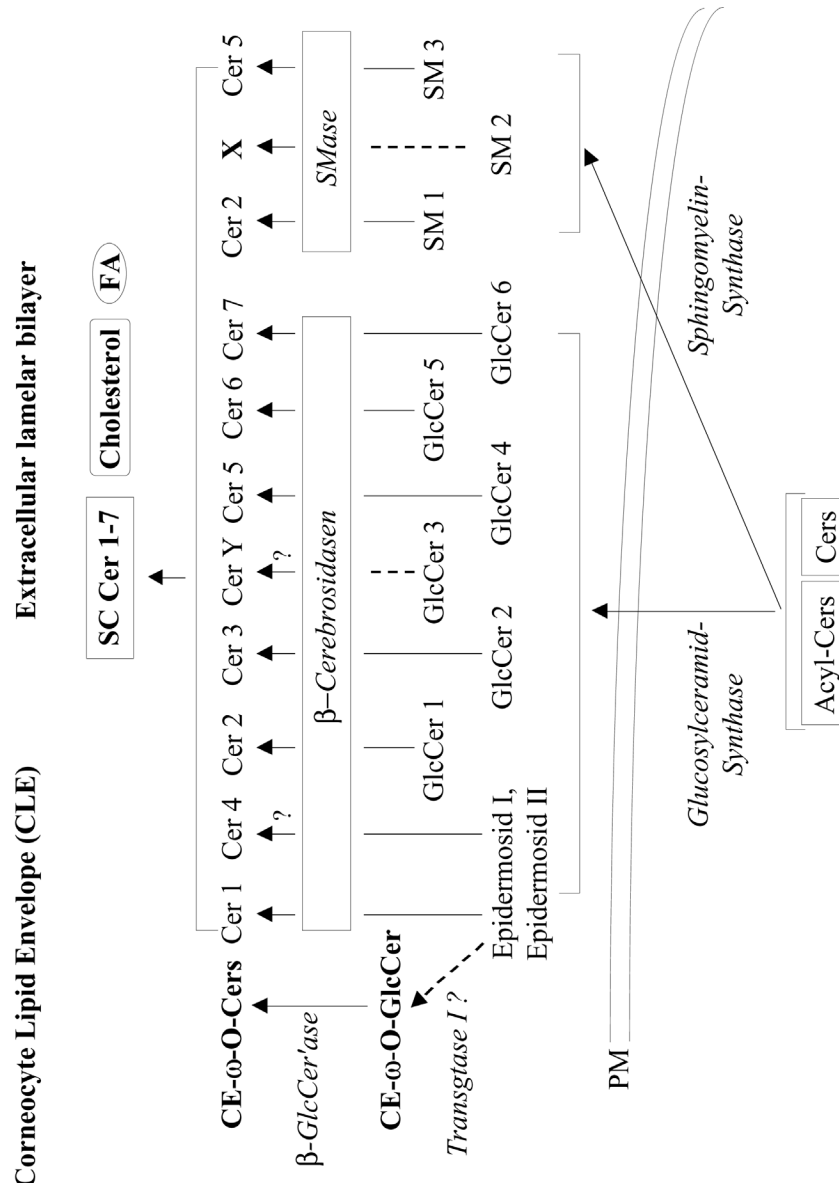


Abbildung 8: Bildung der verschiedenen Barriere-Ceramide in der Haut. Die Barriere-Ceramide der Haut werden intrazellulär gebildet, indem die Glucosylceramid-Synthase auf Ceramide (Cers) oder langkettige Ceramide (Acyl-Cers) einen Glukoserest überträgt. Diese Glucosylceramide werden dann auf der Zelloberfläche durch die Aktivität von β -Cerebrosidasen zu den einzelnen Barriere-Ceramiden (SC Cer 1-7) umgesetzt. Zusätzlich können die Lipide kovalent mit den Proteinen des *Stratum corneums* verknüpft werden. Dies geschieht vermutlich durch die Aktivität der Transglutaminase I. Abkürzungen: Cer: Ceramid; PM: Plasmamembran; GlcCer: Glucosylceramid; SM: Sphingomyelin; CE: *Cornified envelope*; Transgtase: Transglutaminase; SMase: Sphingomyelinase; FA: freie Fettsäure.

1.6 Pathobiochemie der (Glyko-)Sphingolipide

1.6.1 Sphingolipide und Krebs

Die *"Multidrug Resistance"* stellt für die Therapie von Tumoren ein großes Problem dar. Es handelt sich hierbei um einen prinzipiellen Mechanismus, mit dem sich Krebszellen Chemotherapeutika entziehen. Normalerweise bestehen Tumoren aus gemischten Populationen maligner Zellen, von denen einige sensitiv auf Chemotherapie reagieren und einige eine Resistenz gegen die verschiedenen eingesetzten Therapeutika aufweisen. Durch eine Chemotherapie werden nur die sensitiven Zellen getötet. Diese Selektion führt dadurch unter Umständen zur völligen Resistenz des Tumors (Persidis, 1999). Erstmals wurde das Auftreten von Chemotherapieresistenz bei Tumoren von Biedler und Riehm (1970) beschrieben. Verantwortlich für die Resistenz sind u.a. zwei Membranpumpen, das P-Glycoprotein und das sogenannte *"Multidrug Resistance Associated Protein (MRP)"* (Juliano und Ling, 1976), die zur Superfamilie von ABC-Transportern gehören.

Zusätzlich sind jedoch auch deutliche Veränderungen der Lipidzusammensetzung z. B. des Sphingomyelin- und Glykosphingolipidgehaltes beschrieben (Ramu *et al.*, 1984). Bereits früher konnte gezeigt werden, daß Onkogene einen Einfluß auf das Glykosphingolipidmuster von Zellen haben. So führt z. B. die Einführung eines Onkogens in Ratten-3Y1-Zellen zur Expression verschiedener Ganglioside, die normalerweise nicht auf der Zelle exprimiert werden (Nagai *et al.*, 1986). Beim malignen Melanom konnte *in vivo* gezeigt werden, daß im Verlauf des Prozesses ansteigender Malignizität die Zellen steigende Mengen des Gangliosids GD2 exprimieren. Auf normalen Melanozyten und Fibroblasten konnte GD2 nicht nachgewiesen werden (Thurin *et al.*, 1986). Eine Studie an kultivierten Melanomzellen hat gezeigt, daß nur die Zellen, die einen hohen GD2-Gehalt haben, in der Lage sind Tumore in Nacktmäusen auszubilden (Tsuchida *et al.*, 1987).

Lavie *et al.* (1996), konnten erstmals zeigen, daß die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase einen direkten Einfluß auf die Resistenz der Zellen hat. Bei der Adriamycin-resistenten Mamakarzinomzelllinie MCF-7-AdrR ist der Gehalt an Glukosylceramid deutlich gegenüber der sensitiven Zelllinie erhöht. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Wirkung von Tamoxifen, das in der Mamakarzinomtherapie eingesetzt wird, nicht allein auf der Blockierung des Östrogenrezeptors beruht, wie bis dahin angenommen, sondern auch auf der Hemmung der Glukosylceramid-Synthase

(Cabot *et al.*, 1996). Inzwischen hat sich gezeigt, daß viele Therapeutika, welche die Resistenz von Krebszellen beeinflussen, potente Inhibitoren der Glukosylceramid-Synthase sind (Lavie *et al.*, 1997). Behandelt man die resistenten Zellen mit diesen "Multi Drug Resistance"-Modulatoren (z. B.: Tamoxifen, Cyclosporin A), wird unter anderem die Bildung von Glukosylceramid blockiert, was zu einem Anstieg von Ceramid und damit zum Tod der Zelle führt. Die Behandlung von Zellen mit Tamoxifen und SDZ PSC 833, einem Cyclosporin Analogon, führt z. B. zu einem mehr als 11-fachen Anstieg an Ceramid und dadurch zur Apoptose. Obwohl es sich bei den "Multi Drug Resistance"-Modulatoren nicht um Chemotherapeutika im eigentlichen Sinn handelt, bilden sie eine interessante Klasse von Pharmaka, die im Fall einer Kombination mit Chemotherapeutika die Sensivität eines resistenten Tumors wieder herstellen könnten (Lucci *et al.*, 1999). Diese Befunde konnten mittlerweile auch an anderen Zellen, wie Neuroblastomzellen oder KB-Zellen bestätigt werden (Nicholson *et al.*, 1999; Sietsma *et al.*, 2000).

Diese Untersuchungen führten zu der Vermutung, daß Krebszellen nicht allein durch die Aktivität des P-Glycoproteins sondern auch aufgrund einer gesteigerten Aktivität der Glukosylceramid-Synthase resistent gegen Chemotherapeutika werden können. Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß die Überexpression des Enzyms in der sensitiven Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und der Mausmelanom-Zelllinie MEB-4 zur Resistenz der Zellen führt (Liu *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2002).

Untersuchungen an sechs Melanompatienten haben gezeigt, daß auch hier offenbar ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glukosylceramid und der "Multi Drug Resistance" besteht (Lucci *et al.*, 1998). Von sechs untersuchten Patienten hatten drei eine hohe Ansprechrate auf die Chemotherapie, bei den anderen drei zeigte sich keine Wirkung. Dies korrelierte mit dem Gehalt an Glukosylceramid.

Neben der Beeinflussung der Resistenz von Krebszellen werden auch „klassische“ Apoptosewege durch Todesrezeptoren beeinflusst. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Glukosylierung von Ceramid die TNF- α - und die Ceramid-induzierte Apoptose in MCF-7 AdrR-Zellen und Keratinozyten hemmt (Liu *et al.*, 1999b; Uchida *et al.*, 2002).

Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von Glukosylceramid in Chemotherapie resistenten MCF-7-Zellen haben gezeigt, daß das Lipid vor allem in „cytoplasmatic droplets“ akkumuliert. Die Behandlung dieser Zellen mit dem Glukosylceramid-Synthase-Inhibitor PPMP verhindert diese Anreicherung. Diese Er-

gebnisse konnten mit "Multi Drug Resistance"-Modulatoren wie Tamoxifen, Cyclosporin A und 3'-Azido-3'-deoxythymidin bestätigt werden (Morjani *et al.*, 2001).

Neben der gesteigerten Aktivität des Enzyms in "Multi Drug Resistance"-Zellen wurde auch die Entkopplung der Laktosylceramid-Synthese von der Glukosylceramid-Synthese im Golgi-Apparat als Ursache für eine gesteigerte Resistenz von Krebszellen beschrieben (Veldman *et al.*, 2002). Die Synthesen dieser beiden Glykosphingolipide sind normalerweise streng gekoppelt. Die Untersuchung resistenter A280-Zellen hat gezeigt, daß hier die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase im Vergleich zu nicht resistenten Zellen gleich hoch oder sogar niedriger war. Die *In vitro*-Aktivität der Laktosylceramid-Synthase dagegen war deutlich erhöht. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß in den resistenten A280-Zellen die Laktosylceramid-Synthase mehr peripher lokalisiert ist. Bei Wildtyp-Zellen zeigt sich eine Kolo-kalisation mit Giantin, einem Golgi-Marker, in einem perinukleär kondensierten Kompartiment im Zellzentrum. Offenbar kann durch die falsche Lokalisation der Laktosylceramid-Synthase das Glukosylceramid nicht mehr umgesetzt werden und reichert sich auch in der Zelle an, was zur Resistenz führt.

Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase muß nicht unbedingt zur Resistenz der Zellen führen. Tepper *et al.* (2000), haben gezeigt, daß in Jurkat T-Zellen Ceramid, das an der Plasmamembran gebildet wird, nicht glukosyliert werden kann. Das gleiche gilt auch für die Behandlung mit zellpermeablen Ceramidanaloga. Das Enzym bietet hier also nur einen bedingten Schutz vor der Ceramid-induzierten Apoptose, da nur Ceramid aus der *De novo*-Synthese zu Glukosylceramid umgesetzt werden kann.

1.6.2 Sphingolipidosen

Die Sphingolipidosen sind eine Gruppe von Krankheiten, die durch Defekte des lysosomalen Abbaus von Glykosphingolipiden und anderen Sphingolipiden der Plasmamembran hervorgerufen werden. Diese Krankheiten sind bereits sehr lange bekannt. 1881 wurde durch Warren Tay die „infantile amaurotische Idiotie“ beschrieben. Diese äußert sich durch Blindheit, verlangsamtes Wachstum, motorische Störungen, einen vergrößerten Kopf und führt im Alter von 3 bis 5 Jahren zum Tod des Patienten. Der amerikanische Neurologe Bernard Sachs hat 1896 das aufgeblähte Zytoplasma von Nervenzellen dieser Patienten beschrieben. Er erkannte auch die relativ starke Verbrei-

tung dieser Erkrankung unter der jüdischen Bevölkerung und prägte die Bezeichnung „familiäre Idiotie“ für diese Gruppe von Erbkrankheiten. Deren Prototyp ist heute als „Tay-Sachs-Krankheit“ bekannt. In den 30er Jahren gelang schließlich die Isolierung des Speichermaterials aus den Gehirnen von Patienten und dessen Identifizierung als neuartige saure Lipide. Wegen ihres verstärkten Auftretens im Gehirn bekamen sie von Ernst Klenk den Namen Ganglioside. 1962 konnte Lars Svennerholm das Hauptspeicherlipid bei Tay-Sachs-Patienten als das Gangliosid GM2 identifizieren (Kolter und Sandhoff, 1999). Untersuchungen an heterozygoten Überträgern der Sphingolipidosen haben gezeigt, daß die Aktivität des betroffenen Enzyms unter einen bestimmten Schwellenwert sinken muß, damit sie klinisch auffällig werden. Solange V_{\max} des entsprechenden Enzyms nicht unter die Einflußgeschwindigkeit des Substrates fällt, kommt es nicht zur Speicherung des entsprechenden Substrates. Dieses Modell der Restenzymaktivität erklärt die unterschiedlichen Verlaufsformen der Sphingolipidosen und bietet außerdem einen Ansatz zur Therapie der Krankheiten durch Hemmung der Biosynthese der Sphingolipide, so daß es nicht mehr zur Akkumulation eines Sphingolipids kommen kann. Für die Hemmung der Glykosphingolipide sind bereits verschiedene Inhibitoren der Glukosylceramid-Synthase wie *N*-Butyldeoxygalaktonojirimicin (NB-DGJ), *N*-Butyldeoxynojirimicin (NB-DNJ) oder *D*-erythro-1-Ethylendioxyphenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-propanol (*D*-*t*-EtDO-P4) beschrieben (Abe *et al.*, 2000; Andersson *et al.*, 2000). Neben der Tay-Sachs-Krankheit sind noch weitere Sphingolipidosen beschrieben. Bei den meisten davon ist der Katabolismus der Glykosphingolipide betroffen. Neben den katabolen Enzymen können auch die benötigten Aktivatorproteine betroffen sein. Dies ist z. B. bei der Sandhoff'schen Krankheit der Fall (Conzelmann und Sandhoff, 1978; Conzelmann und Sandhoff, 1979). Die meisten dieser Krankheiten sind in der infantilen Form letal. Bei den späteren Formen der Krankheiten kommt es zu neurologischen Störungen, Organversagen, Skelettveränderungen und zur Blindheit.

Die häufigste Sphingolipidose ist die Gaucher'sche Erkrankung, bei der ein Defekt der β -Cerebrosidase vorliegt, dem Enzym das Glukosylceramid zu Ceramid und Glukose abbaut. Für diese Erkrankung wurde kürzlich eine erste klinische Studie mit dem Inhibitor NB-DNJ durchgeführt (Cox *et al.*, 2000). In dieser Studie wurden 28 erwachsene Patienten, die am Typ 1 der Gaucher'schen Erkrankung litten, dreimal täglich mit 100 mg NB-DNJ behandelt, um einen Serumlevel von 1-2 $\mu\text{g/ml}$ zu erreichen. Bei der Typ 1-Form der Erkrankung handelt es sich um die weitaus häufigste

nicht neuropathische Form, bei der in erster Linie das reticuloendotheliale System betroffen ist. Die Behandlung der Patienten mit dem Inhibitor führte zu einer Abnahme des Leber- und Nierenvolumens um 12-19 % im Vergleich zum Ausgangsvolumen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Therapie-Resistenz ist eines der größten Probleme bei der Behandlung von Krebserkrankungen beim Menschen. Hierbei handelt es sich um einen prinzipiellen Mechanismus, mit dem sich Krebszellen der Behandlung durch Zytostatika entziehen. Dieses Phänomen wurde erstmals von Biedler und Riehm (1970) beschrieben. Verantwortlich für die Resistenz der Tumore sind vor allem Membranpumpen der ABC-Transporter Superfamilie, besonders das P-Glycoprotein und das sogenannte „*Multidrug Resistance Associated Protein (MRP)*“ (Juliano und Ling, 1976). Die Therapieresistenz ist auch das größte Problem bei der Behandlung des malignen Melanoms beim Menschen. Obwohl es sich um einen langsam wachsenden Tumor handelt, bildet das Melanom bereits sehr früh Metastasen in anderen Geweben. Diese sind mit den herkömmlichen Chemotherapeutika schlecht zu behandeln. Auf der Suche nach den Ursachen dieser Resistenz und der Entwicklung neuer Therapiekonzepte sind daher im Laufe der letzten Jahre zunehmend die Lipide in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt. Thurin *et al.* (1986), konnten beim malignen Melanom zeigen, daß der Gehalt des Gangliosids GM2 für die Progression des Tumors wichtig ist. Lavie *et al.* (1996), konnten erstmals zeigen, daß eine hohe Aktivität der Glukosylceramid-Synthase, des Schrittmacherenzym der Glykosphingolipid-Biosynthese, einen direkten Einfluß auf die Resistenz von Krebszellen hat. Untersuchungen an sechs Melanompatienten lassen vermuten, daß auch hier ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Glukosylceramid und der Resistenz der Zellen vorliegt, da bei den untersuchten Patienten der Gehalt an Glukosylceramid mit der Ansprechrate auf die Chemotherapie korrelierte (Lucci *et al.*, 1998). Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob die Chemotherapie-Resistenz beim Malignen Melanom im Zusammenhang mit der Expression von Glukosylceramid steht. Das Enzym soll außerdem in humanen Melanozyten und humanen Melanomzellen näher charakterisiert werden, da hier bislang keine Daten existieren. Zusätzliche Informationen über den Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf die Resistenz des malignen Melanoms sollen durch die Überexpression des Enzyms in einer sensitiven Melanomzelllinie gewonnen werden. Hierfür soll ein schaltbares Vektorsystem eingesetzt werden.