

1 Ergebnisse

1.1 Subzelluläre Lokalisation der Glukosylceramid-Synthase

Die Glukosylceramid-Synthase ist das Schrittmacherenzym für die meisten komplexeren Glykosphingolipide. Die Biosynthese der Sphingolipide findet bis zum Ceramid im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Van Echten und Sandhoff, 1993). Alle Glykosylierungsschritte erfolgen anschließend im Golgi-Apparat (Futerman und Pagano, 1991). Das Enzym ist in Rattenleberzellen als integrales Membranprotein der Golgi-Membran beschrieben. In humanen Melanomzellen liegen darüber bislang keine Daten vor. Um Daten über die Lokalisation der Glukosylceramid-Synthase zu bekommen, wurde eine Mikrosomen-Isolierung (siehe Kapitel 6.6.2) durchgeführt und von den verschiedenen Fraktionen der einzelnen Zentrifugationsschritte anschließend die *in vitro* Aktivität des Enzyms wie in Kapitel 6.5.1 beschrieben bestimmt. Dabei hat sich gezeigt, daß die größte Aktivität mit einem Umsatz von 2529 ± 200 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹] im Pellet der 100.000 xg Fraktion zu finden ist. In der 10.000 xg Fraktion konnte ein Umsatz von 2028 ± 133 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹] gemessen werden. Nur noch Spuren der Enzymaktivität konnten im Überstand der 100.000 xg Fraktion gemessen werden (Abbildung 9).

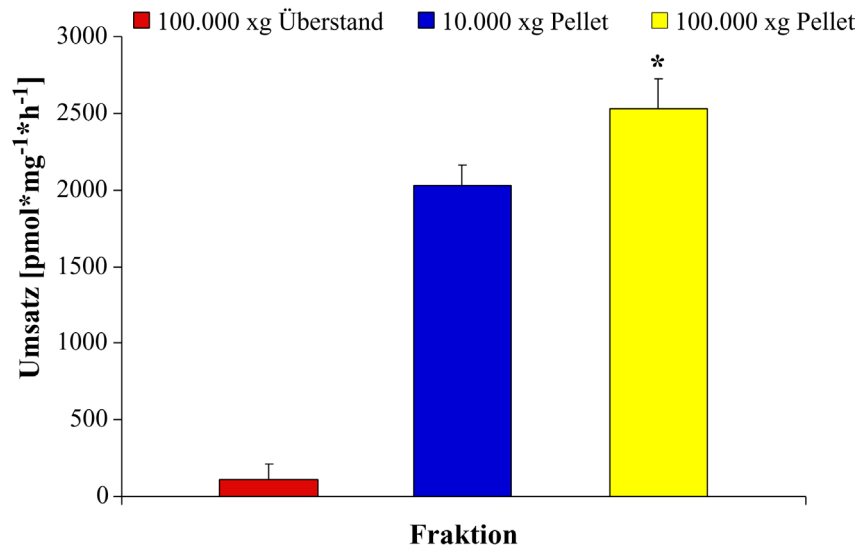


Abbildung 9: Subzelluläre Lokalisation der Glukosylceramid-Synthase. Für die subzelluläre Lokalisation der Glukosylceramid-Synthase wurde eine Mikrosomen-Isolierung durchgeführt und die einzelnen Fraktionen der Zentrifugationsschritte auf ihre *In-vitro*-Aktivität untersucht. Die größte Aktivität mit 2529 ± 200 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹] Umsatz ist im Pellet der 100.000 xg Fraktion (gelber Balken). Diese Aktivität ist signifikant höher ($p \leq 0,05$) gegenüber der Aktivität im 10.000 xg Pellet (blauer Balken). Im Überstand der 100.000 xg Zentrifugation sind nur Spuren der Aktivität der Glukosylceramid-Synthase nachweisbar (roter Balken). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$.

1.2 Einfluß der Proteinmenge auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase

Der Einfluß der Proteinmenge auf die *in vitro* Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde mit Hilfe des radioenzymatischen Assays untersucht (siehe Kapitel 6.5.1). Die Proteinmenge in dem Assay wurde dabei von 1 µg bis 100 µg variiert, wobei das Volumen der einzelnen Ansätze konstant gehalten wurde. Die Proteinkonzentration variierte dadurch von 0,04 µg/µl bis 4 µg/µl. Bereits ab 1 µg (0,04 µg/µl) Protein konnte ein geringer Umsatz von 1643 ± 960 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹] gemessen werden (Abbildung 10). Bei einer Proteinmenge von 5 µg (0,2 µg/µl) steigt die Aktivität auf 5710 ± 620 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹]. Bei einer eingesetzten Proteinmenge von 10 µg (0,4 µg/µl) konnte ein Umsatz von 8468 ± 620 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹] gemessen werden. Die größte *In-vitro*-Aktivität konnte bei 30 µg Protein (1,2 µg/µl) gemessen werden. Der Umsatz stieg in dieser Probe auf 12173 ± 240 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹]. Mit weiter steigender Proteinkonzentration fällt die Aktivität dann wieder ab. Bei 50 µg (2 µg/µl) beträgt der Umsatz 9137 ± 1940 [pmol * mg⁻¹ * h⁻¹], bei 75 µg (3 µg/µl) sank die

Aktivität auf 6148 ± 520 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]. Bei $100 \mu\text{g}$ ($4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) eingesetztem Protein konnte noch eine Aktivität von 5042 ± 480 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] gemessen werden.

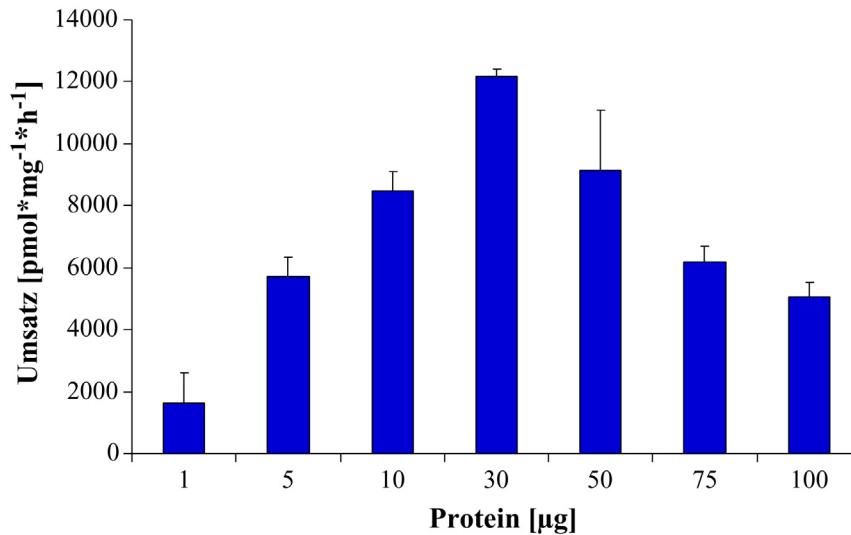


Abbildung 10: Einfluß der Proteinmenge auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase. Der *in vitro* Assay der Glukosylceramid-Synthase wurde mit verschiedenen Proteinmengen durchgeführt. Bereits bei $1 \mu\text{g}$ kann die Aktivität des Enzyms gemessen werden. Bis $30 \mu\text{g}$ Protein steigt die Aktivität auf den maximalen Wert von 12173 ± 240 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] an. Anschließend sinkt die Enzymaktivität bis $100 \mu\text{g}$ eingesetztes Protein ab. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n=3$.

1.3 Abhängigkeit der Substratmenge auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase

Die Aktivität eines Enzyms kann auch durch die Menge an eingesetztem Substrat beeinflusst werden. Dabei kann die Aktivität sowohl durch eine zu geringe Menge, als auch durch eine zu große Menge an Substrat (Substratinhibierung) gehemmt werden. Der Einfluß der Substratmenge auf die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in Mel-HO-Melanomzellen wurde untersucht, indem *In vitro* die eingesetzte Menge jeweils eines Substrates variiert wurde. Alle anderen Bedingungen des Assays blieben unverändert (siehe Kapitel 6.5.1). Die Menge an UDP-Glukose in dem Assay wurde von $25 \mu\text{M}$ bis $200 \mu\text{M}$ variiert (Abbildung 11A). Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase nahm dabei mit steigender Konzentration des Substrates zunächst zu. Bei $25 \mu\text{M}$ konnte ein Umsatz von 9059 ± 800 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] gemessen werden. Dieser stieg bis $130 \mu\text{M}$ eingesetzte UDP-Glukose auf 28225 ± 1640 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] und änderte sich dann nicht mehr signifikant.

Der Ceramidgehalt wurde zwischen 1 nmol (0,04 mM) und 10 nmol (0,4 mM) variiert (Abbildung 11B). Der Umsatz der Glukosylceramid-Synthase an UDP-Glukose stieg dabei von 3262 ± 1240 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] bei 1 nmol eingesetztem C₈-Ceramid auf 7585 ± 120 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] bei 6 nmol. Danach blieb der Umsatz nahezu konstant.

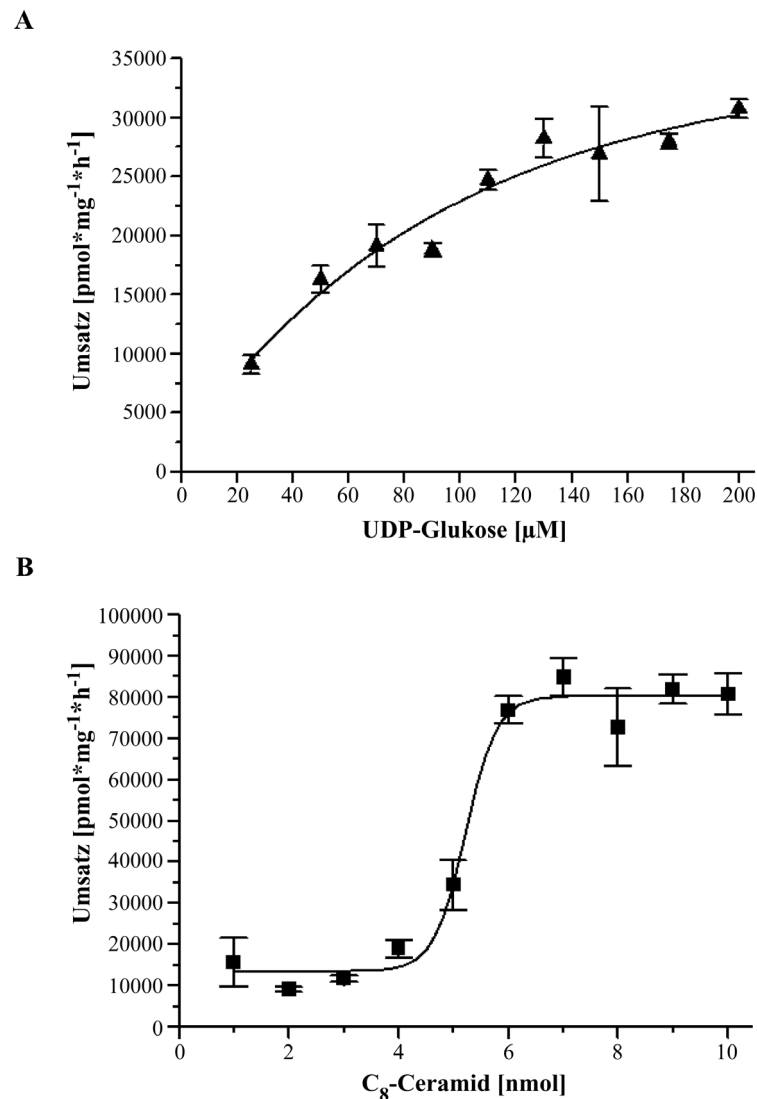


Abbildung 11: Einfluß der Substratmenge von UDP-Glukose (A) und Ceramid (B) auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase. Die Enzymaktivität wurde mit unterschiedlichen Mengen der beiden Substrate bestimmt. Für UDP-Glukose wurde die Menge zwischen 25 μM und 200 μM variiert. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase steigt dabei von 25 μM bis 130 μM an und änderte sich dann nicht mehr signifikant. Für C₈-Ceramid wurde die eingesetzte Menge zwischen 1 nmol (0,04 mM) und 10 nmol (0,4 mM) variiert. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase stieg dabei zwischen 1 nmol und 6 nmol an. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$.

1.4 Substratspezifität der Glukosylceramid-Synthase für verschiedene Ceramide

Neben dem langkettigen, natürlichen Ceramid gibt es auch eine Reihe kurzkettiger Ceramid-Analoga. Diese unterscheiden sich vom Ceramid durch ihre verkürzte Acylkette, die mit dem Sphingosinrückgrat verknüpft ist. Für diese Analoga sind unterschiedliche Aktivitäten der Glukosylceramid-Synthase beschrieben. (Paul *et al.*, 1996) konnten zeigen, daß nur Analoga mit einer Kettenlänge von mehr als vier Kohlenstoffatomen umgesetzt werden. Um dies auch für die humane Melanomzelllinie Mel-HO zu untersuchen, wurden neben natürlichem Ceramid die kurzkettigen Ceramid-Analoga *N*-Acetylsphingosin (C_2 -Ceramid) und *N*-Octanoylsphingosin (C_8 -Ceramid) eingesetzt und die Aktivität des Enzyms *in vitro* gemessen. Neben den kurzkettigen Analoga wurden auch deren Dihydro-Formen, *N*-Acetylspingalin (DH- C_2 -Ceramid) und *N*-Octanoylsphingalin (DH- C_8 -Ceramid), eingesetzt. Bei den Dihydro-Analoga fehlt die *trans*-4,5-Doppelbindung im Sphingosinrückgrat des Moleküls, die als essentiell für die biologische Funktion des Ceramids angesehen wird (Bielawska *et al.*, 1993). Abbildung 12A zeigt die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase mit natürlichem Ceramid als Substrat im Vergleich zu C_2 -Ceramid und DH- C_2 -Ceramid. Der Umsatz an UDP-Glukose mit natürlichem Ceramid betrug dabei 2529 ± 200 [pmol * mg^{-1} * h^{-1}]. Im Gegensatz dazu konnte praktisch keine Aktivität mit den Acetyl-Analoga gemessen werden. Der Vergleich von Ceramid mit C_8 -Ceramid (Abbildung 12B) hat gezeigt, das beide Lipide als Substrat zu einem etwa gleich großen Umsatz führen. Für DH- C_8 -Ceramid konnten nur Spuren der Aktivität gemessen werden (Abbildung 12C).

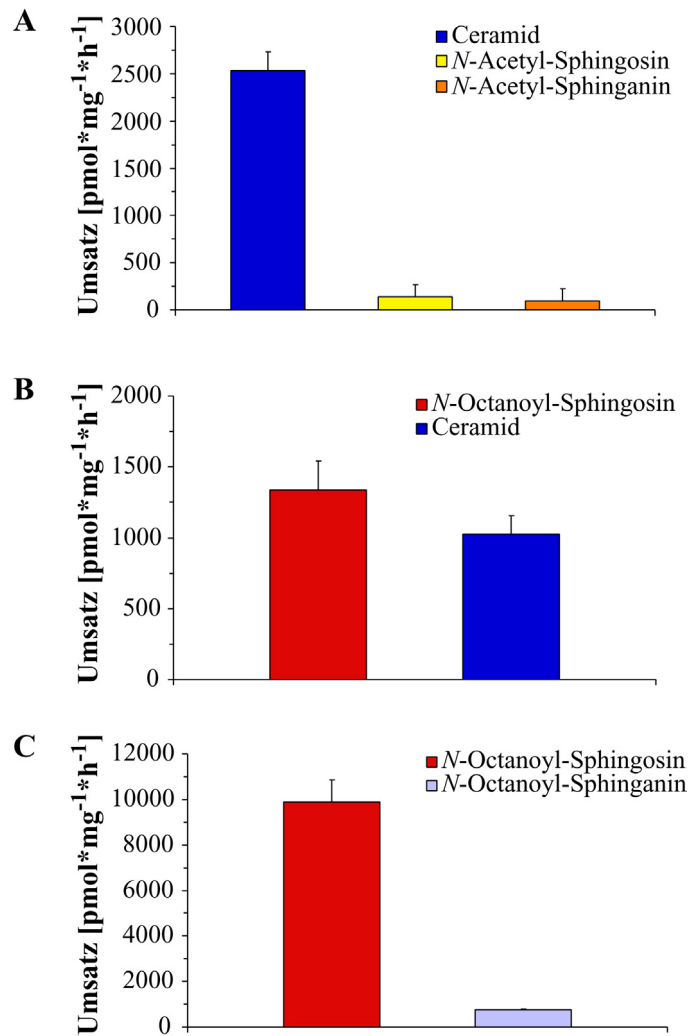


Abbildung 12: Substratspezifität der Glukosylceramid-Synthase für verschiedene Kettenlängen beim Ceramid (A, B, C). Neben natürlichem Ceramid wurden die kurzkettigen Analoga *N*-Acetylsphingosin (C_2 -Ceramid) und *N*-Octanoylsphingosin (C_8 -Ceramid), sowie deren Dihydro-Formen, *N*-Acetylsphinganin und *N*-Octanoylsphinganin als Substrate eingesetzt. Ceramid und C_8 -Ceramid waren dabei als Substrat nahezu gleichwertig. Die anderen eingesetzten Analoga, sowie die Dihydro-Formen führten zu nahezu keiner Enzymaktivität. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$.

1.5 Einfluß von verschiedenen Nukleotiden auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase

Für die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase sind Nukleotid-haltige Zucker essentiell. Diese Nukleotide können von den Zuckern abgespalten werden und daher die Aktivität des Enzyms beeinflussen. Shayman und Abe (2000), haben beschrieben, daß durch die Zugabe von Nukleotiden die Aktivität von Nukleotid-Pyrophosphatasen, die diese Spaltung katalysieren, *In vitro* gehemmt wird. Dadurch wird die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase positiv beeinflusst. In humanen Melanomzellen konnte

dieser Befund nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die Aktivität war hier in Gegenwart von 2 mM NAD (roter Balken), 2 mM NADP (gelber Balken) oder je 2 mM beider Nukleotide (orange-farbener Balken) im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

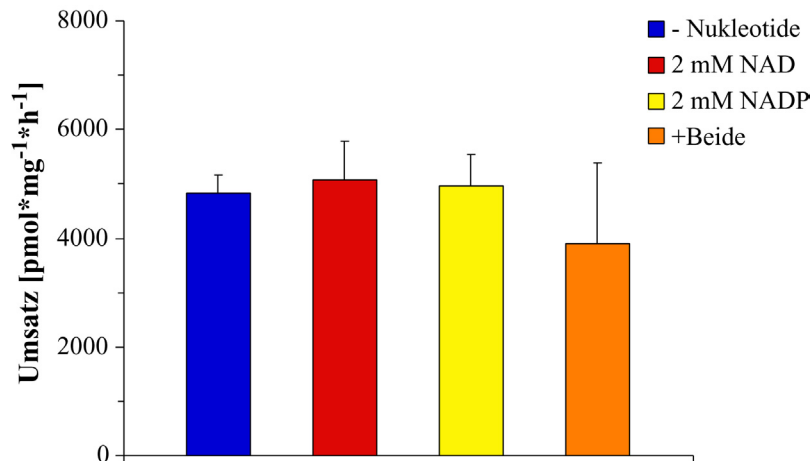


Abbildung 13: Einfluß von Nukleotiden auf die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase *In vitro*. Die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde ohne Nukleotide (blauer Balken) und in Gegenwart von 2 mM NAD (roter Balken), 2 mM NADP (gelber Balken) oder je 2 mM beider Nukleotide (orange-farbener Balken) gemessen. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde dabei nicht durch die Nukleotide beeinflusst. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für n = 4.

1.6 Spezifität des peptidspezifischen anti-humane Glukosylceramid-Synthase-Antikörpers SA-7061

Für die humane Glukosylceramid-Synthase sind bislang keine Antikörper käuflich zu erwerben. Um dennoch Expressionsanalysen des Enzyms auf Proteinebene durchführen zu können, wurde ein peptid-spezifischer polyklonaler Antikörper (SA-7061) von der Firma Eurogentec (Köln, D) hergestellt. Die dafür benötigten Peptidsequenzen wurden aus der Proteinsequenz der Glukosylceramid-Synthase entnommen und mittels Datenbanksuche (BLAST) auf ihre theoretische Spezifität getestet (siehe Kapitel 5.5). Die Spezifität des erhaltenen Immunsersums wurde durch einen Sandwich-ELISA getestet, bei dem als Antigen die beiden Peptide dienen, die auch bei der Herstellung des Antikörpers benutzt wurden (siehe Kapitel 6.6.1). Verglichen wurde das Immunsersum mit dem Präimmunsersum. Bei dem Präimmunsersum handelt es sich um Serum, das vor der Immunisierung des Kaninchens gewonnen wurde. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des Sandwich-ELISA mit Präimmunsersum (blaue Balken) und dem SA-7061-Serum (rote Balken). Nach der Farbreaktion wurde der Ansatz bei 490 nm im

ELISA-Photometer vermessen. Getestet wurden jeweils verschiedene Verdünnungen wie in Abbildung 14 gezeigt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz, bei dem das SA-7061-Serum nicht an die Mikrotiterplatte gekoppelt wurde (K1) (siehe Kapitel 6.6.1), ein Ansatz ohne sekundären Antikörper (K2), ein Ansatz, der ohne Antigen inkubiert wurde (K3), ein Ansatz ohne primäres Antiserum (K4) und ein Ansatz mit einem Peptid, das aus der Sequenz der humanen Phospholipase D stammt (Müller-Wieprecht *et al.*, 1998). Man erkennt, daß der anti-Glukosylceramid-Synthase-Antikörper ab einer Verdünnung von 1:1 ca. 3 mal besser das Antigen erkennt als das Präimmunserum ($p \leq 0,05$). Mit steigender Verdünnung steigt die Bindungsstärke des SA-7061-Serums an und bleibt bei einer Verdünnung von 1:100 bis 1:10.000 etwa konstant. Die Bindungsstärke des Präimmunserums an die Antigene ändert sich dabei nicht. In der Kontrolle 1 bindet das anti-Glukosylceramid-Synthase-Serum ca. 4,6 mal besser als das Präimmunserum. In den anderen Kontrollen kann kein Unterschied zwischen den beiden Seren festgestellt werden.

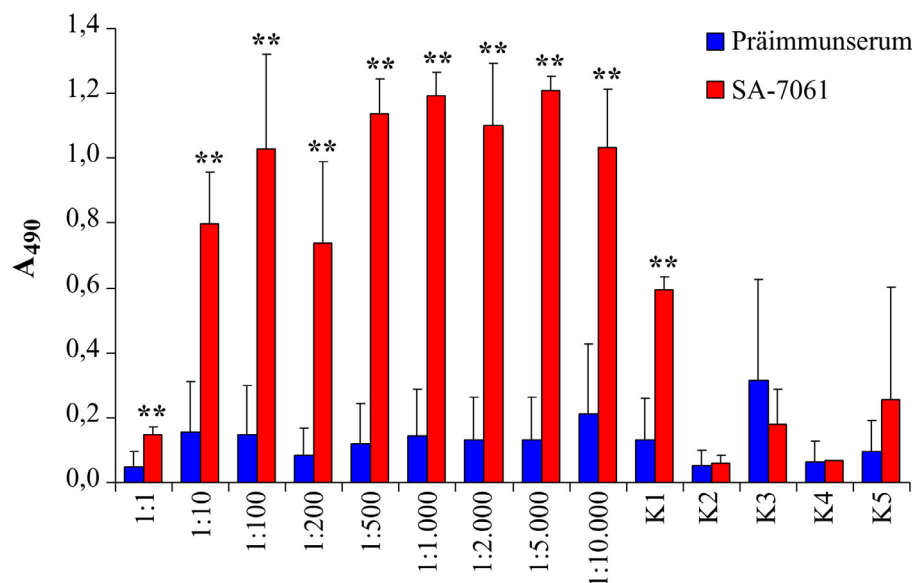


Abbildung 14: Untersuchung der Spezifität des polyklonalen peptidspezifischen anti-humane Glukosylceramid-Synthase-Antikörpers SA-7061. Das anti-humane Glukosylceramid-Synthase-Serum (SA-7061; rote Balken) bindet im Vergleich zum Präimmunserum (blaue Balken) in jeder Verdünnung signifikant besser. Neben den einzelnen Verdünnungen kann auch ein signifikantes Signal in einer der fünf Kontrollen (K1 - K5) nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$. K1 = Ansatz, bei dem die Seren nicht an die Mikrotiterplatte gekoppelt wurden; K2 = Ansatz ohne sekundären Antikörper; K3 = Ansatz ohne Antigen; K4 = Ansatz ohne primäres Antiserum K5 = Ansatz mit einem Kontrollpeptid aus der Sequenz der humanen Phospholipase D1. ** = $p \leq 0,01$

1.7 Medium-abhängige Aktivität der Glukosylceramid-Synthase

Ein Problem beim Vergleich unterschiedlicher Zelltypen ist häufig, daß verschiedene Kulturbedingungen benötigt werden. Durch diese unterschiedlichen Kulturbedingungen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellen unterschiedlich auf gleiche Stimuli reagieren oder sich die Aktivität einzelner Enzyme unterscheidet. Um den Einfluß der Kulturbedingungen auf Mel-HO-Melanomzellen zu untersuchen, wurden die Zellen 24 Stunden und 48 Stunden mit Melanozyten-Medium kultiviert (siehe Kapitel 6.1.3). Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase dieser Zellen wurde anschließend mit Mel-HO-Melanomzellen verglichen, die mit DMEM kultiviert wurden. Die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase war dabei weder nach 24 Stunden noch nach 48 Stunden unterschiedlich (Abbildung 15).

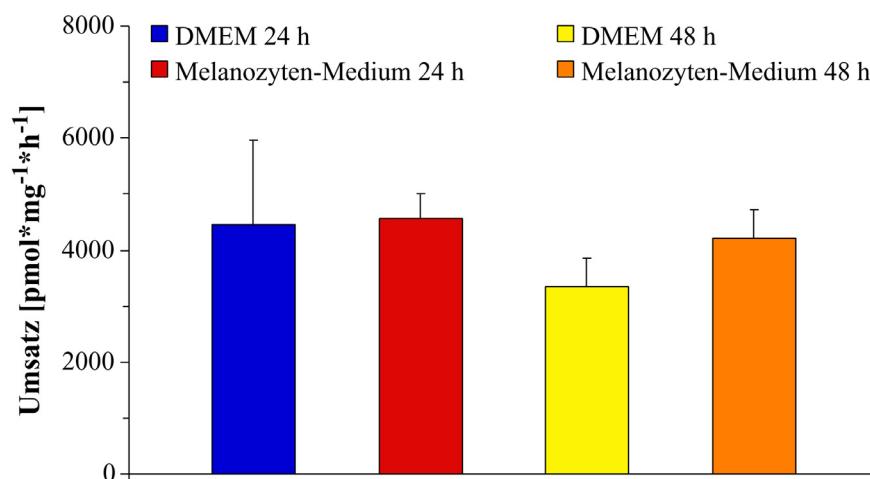


Abbildung 15: Einfluß der Kulturbedingungen auf die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase *In vitro*. Mel-HO-Melanomzellen wurden für 24 Stunden und 48 Stunden mit Melanozyten Medium kultiviert und anschließend die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase gemessen und mit der Aktivität von Zellen verglichen, die mit DMEM kultiviert wurden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$.

1.8 Expression der Glukosylceramid-Synthase in der humanen Melanomzelllinie Mel-HO und primären humanen Melanozyten

Die Resistenz von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika stellt ein großes Problem für die Behandlung dieser Erkrankungen dar. Neben dem klassischen Mechanismus der Resistenz, der über Membranpumpen läuft, scheinen auch Lipide in diesen Prozeß involviert zu sein. Lavie *et al.* (1996), konnten zeigen, daß die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase für die Adriamycin-Resistenz bei MCF-7-

Brustkrebszellen verantwortlich ist. Für das maligne Melanom beim Menschen liegen nur sehr wenige Daten vor, die einen Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf die Chemotherapie-Resistenz zeigen (Lucci *et al.*, 1998). Um den Einfluß auf das maligne Melanom zu untersuchen, wurden zunächst die Gen- (Abbildung 16A und B) und Proteinexpression (Abbildung 16C) der Melanomzelllinie Mel-HO mit primären humanen Melanozyten miteinander verglichen. Für die Genexpression wurde die RNA aus vier verschiedenen Melanozytenpräparationen und aus vier Passagen der Melanomzellen isoliert. Der Nachweis erfolgte durch RT-PCR (siehe Kapitel 6.7.5). Die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase in den verschiedenen Proben wurde auf die Expression des Haushaltgens Ribo S9 normalisiert. Ein Unterschied zwischen den Melanomzellen und Melanozyten konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Die Expression unterscheidet sich jedoch innerhalb der Melanomzellproben und der verschiedenen Melanozytenpräparationen.

Die Proteinexpression der Glukosylceramid-Synthase wurde mittels Western-Blot-Analyse (siehe Kapitel 6.6.5) nachgewiesen. Die verwendeten Proteine wurden dabei aus der gleichen Passage bzw. Präparation, wie die untersuchten RNA-Proben isoliert. Dabei hat sich gezeigt, daß in Melanomzellen die Proteinmenge der Glukosylceramid-Synthase deutlich höher ist als in den Melanozyten. Als Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge wurde die Blotmembran gestrippt und zusätzlich mit β -Aktin inkubiert. Die Proteinexpression des β -Aktins ist in allen Proben vergleichbar hoch.

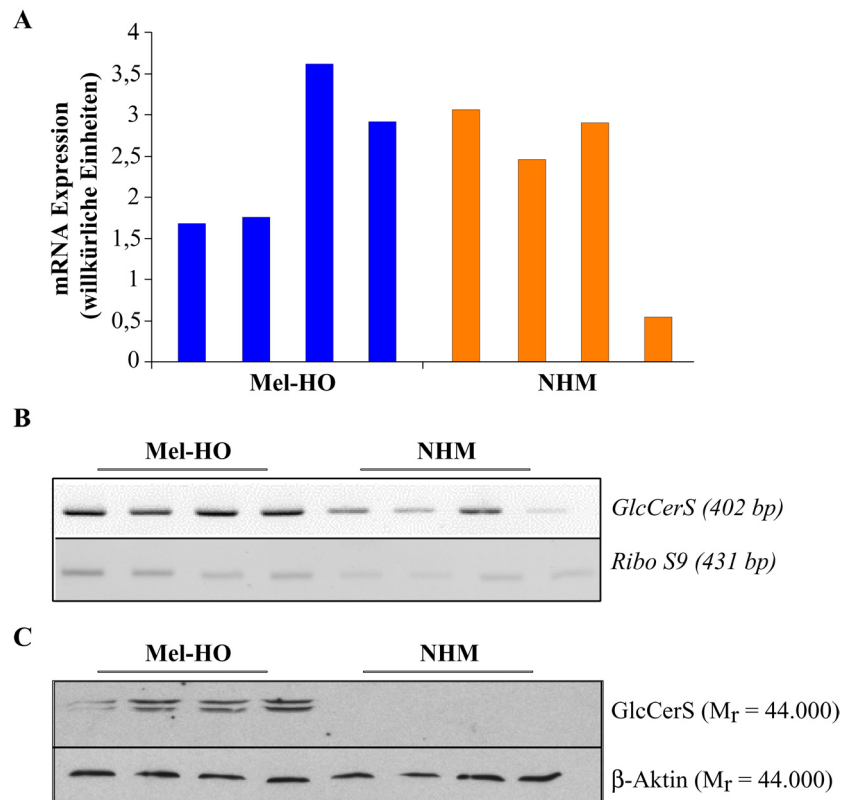


Abbildung 16: Expression der Glukosylceramid-Synthase auf Genebene (A und B) und auf Proteinebene (C) in Mel-HO-Melanomzellen und primären humanen Melanozyten. Die Genexpression wurde mittels RT-PCR gemessen (B) und auf das Haushaltsgen Ribo S9 normalisiert (A). Ein Unterschied zwischen Melanomzellen und Melanozyten war dabei nicht nachzuweisen. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Proteinexpression (C) der Glukosylceramid-Synthase zwischen Melanomzellen und Melanozyten deutlich. Als Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge wurde hier β -Aktin verwendet. Die verwendeten Proteine wurden aus der der gleichen Passage bzw. Präparation isoliert wie die untersuchten RNA-Proben.

1.9 Vergleich der *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase von verschiedenen humanen Melanomzellen und Melanozyten

Um den Einfluß der Glukosylierung von Ceramid auf die Therapieresistenz des malignen Melanoms weiter zu untersuchen, wurden als nächstes die Aktivitäten der Ceramid-sensitiven Zelllinien Mel-HO und A-375, der Ceramid-resistenten Melanomzelllinie Mel-2A (Raisova *et al.*, 2001) und von primären humanen Melanozyten miteinander verglichen. Dabei hat sich gezeigt, daß sich die Aktivität der einzelnen Melanomzellen nicht voneinander unterscheidet (Abbildung 17A und B). Im Gegensatz dazu wiesen die Melanozyten weniger als 50 %, die in Mel-HO-Melanomzellen gemessenen Aktivität auf (Abbildung 17C).

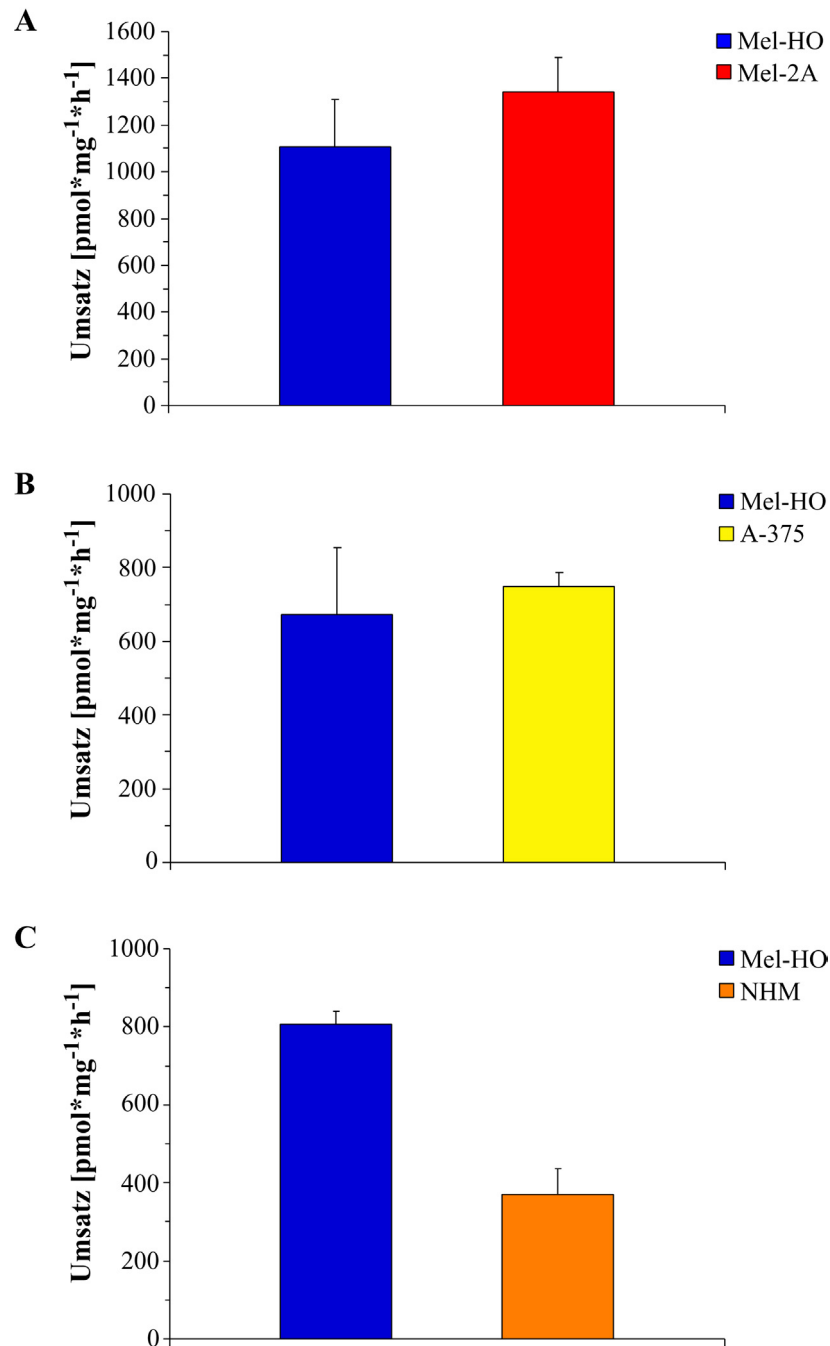


Abbildung 17: Vergleich der *In-vitro*-Glukosylceramid-Synthase-Aktivität zwischen den humanen Melanomzelllinien Mel-HO und Mel-2A (A), Mel-HO und A-375 (B), sowie Mel-HO und humanen Melanozyten (C). Die Aktivität in den einzelnen Melanomzelllinien unterscheidet sich nicht. Im Gegensatz dazu konnte aber in den Melanozyten nur etwa 45 % der Aktivität gemessen werden, die in Mel-HO Melanomzellen gemessen werden konnte. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für n = 4.

1.10 Chromatographische Auftrennung von Lipiden in Mel-Ho-Melanomzellen und primären humanen Melanozyten

Aufgrund der Unterschiede zwischen Melanomzellen und Melanozyten bei der Proteinexpression der Glukosylceramid-Synthase und der Enzymaktivität, wurde das Lipidmuster von Mel-2A Melanomzellen und primären humanen Melanozyten verglichen. Die Lipide wurden dabei aus zwei verschiedenen Passagen der Melanomzellen und aus zwei unterschiedlichen Präparationen der Melanozyten isoliert und aufgetrennt (siehe Kapitel 6.4.2). Abbildung 18 zeigt die aufgetrennten Lipide. In den Spuren 1 und 2 wurden dabei die Lipidextrakte der Melanozyten aufgetragen, in den Spuren 3 und 4 die Lipide der Mel-2A Zellen. In Spur 5 wurde als Standard Glukosylceramid aufgetragen und in Spur 6 ein Gangliosid-Mix. Ein Unterschied in der Menge an Glukosylceramid konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Ein Unterschied besteht aber in der Menge an Gangliosiden. Bei den Melanomzellen werden deutlich mehr saure Glykosphingolipide gebildet als in den Melanozyten.

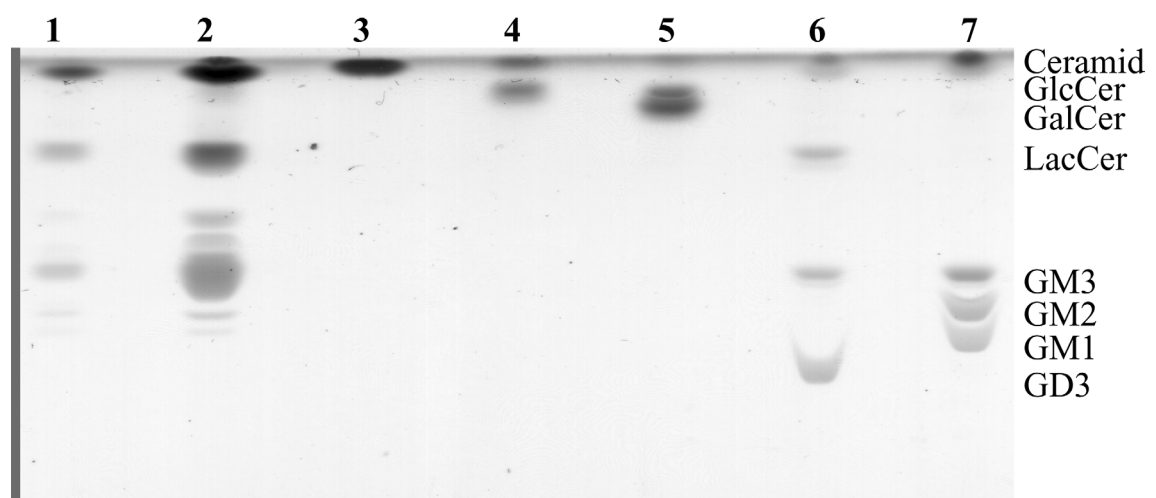


Abbildung 18: Chromatographische Auftrennung von Lipiden aus Mel-HO-Melanomzellen und primären humanen Melanozyten. In der ersten Spur wurden die Lipide einer Melanozytenpräparationen aufgetragen. In der Spur 2 von Mel-HO-Melanomzellen aufgetragen. In Spur 3 wurde Ceramid als Standard aufgetragen, in Spur 4 ein Glucosylceramid. Spur 5: Galaktosylceramid. Spur 6: Laktosylceramid-Mix (Laktosylceramid, GM3 und GD3). Spur 7: Monosialylgangliosid-Mix (GM1, GM2, GM3). GlcCer = Glukosylceramid; GalCer = Galaktosylceramid; LacCer = Laktosylceramid.

1.11 Einfluß von Bcl-2 auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase

Die Überexpression von Bcl-2 ist einer der Mechanismen, mit denen Zellen resistent gegenüber apoptotischen Stimuli werden (Raisova *et al.*, 2001; Raisova *et al.*, 2002). Um herauszufinden, ob die Überexpression von Bcl-2 einen Einfluß auf die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase hat, wurde die *In-vitro*-Aktivität des Enzyms in 502-1-Zellen gemessen. Bei diesen Zellen handelt es sich um Bro-Melanomzellen, die stabil Bcl-2 schaltbar überexprimieren. Die Schaltbarkeit wird durch das Tet-On-Vektorsystem (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D), das eine Kontrolle der Genexpression durch die Zugabe von Doxycyclin zu den Zellen beinhaltet, ermöglicht. Die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde zwischen Zellen mit induzierter Genexpression und Zellen ohne induzierte Bcl-2-Expression verglichen. Die Induktion der Genexpression erfolgte dabei durch die Behandlung mit 4 μM Doxycyclin für 24 Stunden. In dieser Zeit wurde kein Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt (siehe Kapitel 6.1.3.3). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

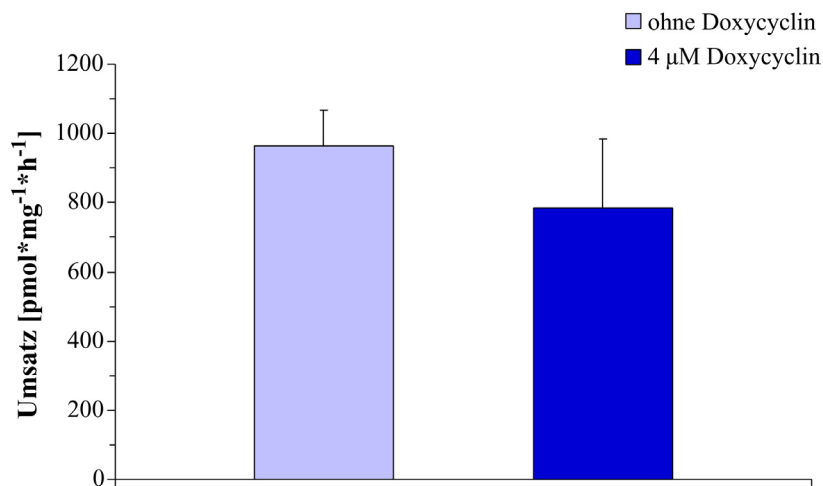


Abbildung 19: Einfluß der Bcl-2-Überexpression auf die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase *In vitro*. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde in der Bcl-2 überexprimierenden Zelllinie 502-1 untersucht. Die Bcl-2-Expression läßt sich bei dieser Zelllinie durch die Zugabe von Doxycyclin induzieren. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für n = 4.

1.12 Schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro-Melanomzellen

1.12.1 Klonierung der humanen Glukosylceramid-Synthase

Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase hat in Adriamycin-sensitiven MCF-7-Brustkrebszellen zur Resistenz der Zellen gegenüber Adriamycin, Ceramid und anderen Apoptose auslösenden Stoffen geführt (Liu *et al.*, 1999a; Liu *et al.*, 1999b). Um dieses Modell an Melanomzellen zu testen, wurde das Gen der humanen Glukosylceramid-Synthase (*hUGCG*) aus dem Vektor pT7T3D-pac/*hUGCG* (ATCC, Manassas, VA, USA) mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* ausgeschnitten und in den schaltbaren Vektor pTRE (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D) umkloniert (Abbildung 20A) (siehe Kapitel 6.7.3). Nach der Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem Konstrukt, wurde aus verschiedenen Bakterienklonen die Plasmid-DNA isoliert und der Einbau des Glukosylceramid-Synthase-Gens durch einen Restriktionsverdau überprüft (siehe Kapitel 6.7.2.1). Die Plasmid-DNA wurde hierfür mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XbaI* geschnitten. Dadurch konnte nicht nur der Einbau der DNA in den Vektor überprüft werden, sondern auch die Orientierung des Gens. Bei richtigem Einbau sind nach dem Verdau auf einem Agarosegel-Fragmente von 1611 bp und 3630 bp zu erkennen. Ein revers komplementärer Einbau führt zu Fragmenten von 959 bp und 4282 bp. Abbildung 20B zeigt exemplarisch die Kontrollrestriktion von drei Konstrukten. Auf das Agarosegel wurde neben dem ungeschnittenen Konstrukt (Spur 1, 6 und 10), der Vektor aufgetragen, der mit jeweils nur einem der beiden Restriktionsenzyme geschnitten wurde (Spur 2, 7 und 11 für *XbaI* sowie Spur 3, 8 und 13 für *NotI*). Der Verdau mit nur einem Restriktionsenzym ermöglicht die Kontrolle der Größe des Konstruktes, um auszuschließen, daß mehr als nur ein „Insert“ in den Vektor eingebaut wurde. Die Kontrolle des Einbaus erfolgte durch den Verdau des Vektors mit beiden Restriktionsendonukleasen (Spuren 4, 9 und 14).

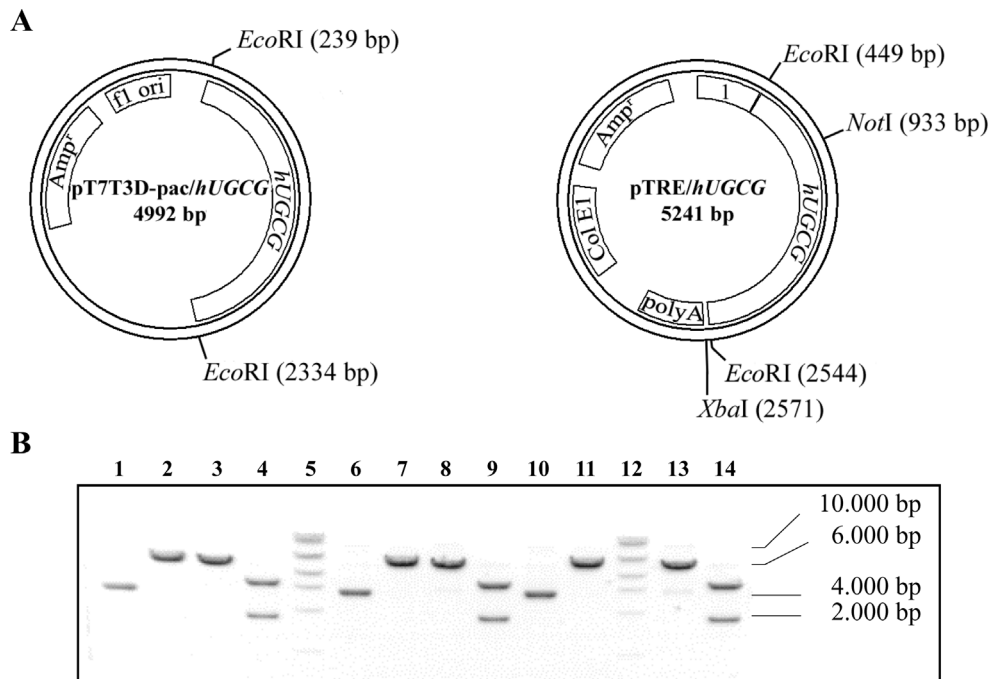


Abbildung 20: Verwendete Vektoren der Klonierung der Glukosylceramid-Synthase (A) und Kontrollrestriktion von pTRE/hUGCG (B). Das Gen der humanen Glukosylceramid-Synthase (*hUGCG*) wurde bei ATCC (Manassas, VA, USA) in dem Vektor pT7T3D-pac gekauft (A). Für die Überexpression wurde die DNA der Glukosylceramid-Synthase in den Vektor pTRE (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D) umklontiert (A). Die Kontrolle der Umklonierung erfolgte durch einen Restriktionsverdau verschiedener isolierter Plasmide. Durch die asymmetrische Anordnung der Schnittstellen kann zusätzlich zur Kontrolle des Einbaus des „Inserts“ auch die Orientierung überprüft werden. Abkürzungen: 1 = hCMV^{*}-1/TRE; Amp^r = Ampicillinresistenz; *hUGCG* = Gen der humanen Glukosylceramid-Synthase

1.12.2 Transiente Überexpression der humanen Glukosylceramid-Synthase

Nach der Kontrollrestriktion wurden Bro/Tet-On-Zellen (303AG7) mit den positiven Konstrukten transient transfiziert. Die Transfektion wurde in 6-Loch-Platten durchgeführt. Dabei wurden je zwei Löcher mit 1 µg desselben Konstruktes transfiziert. Jeweils ein Loch wurde nach 24 Stunden mit 4 µM Doxycyclin behandelt, um die Genexpression zu induzieren. Die restlichen Zellen blieben als Kontrolle unbehandelt und wurden nicht induziert. Die Genexpression wurde durch RT-PCR überprüft. Abbildung 21 zeigt beispielhaft ein Agarosegel mit den PCR-Fragmenten von neun Konstrukten. Als Kontrolle für die eingesetzte RNA-Menge wurde zusätzlich das Haushaltsgen Ribo S9 amplifiziert. Die RT-PCR zeigt, daß nicht alle Konstrukte zu einer gesteigerten Genexpression führen. Zusätzlich kann man erkennen, daß nicht alle Konstrukte, die zu einer gesteigerten Genexpression führen, durch die Zugabe von Doxycyclin schaltbar sind.

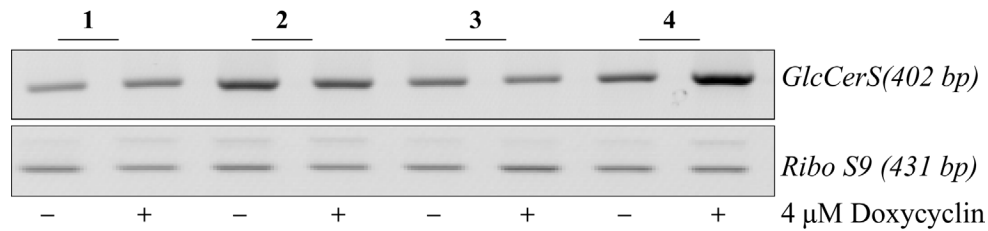


Abbildung 21: Kontroll-PCR von vier Konstrukten nach der transienten Transfektion mit pTRE/hUGCG. Die Transfektion erfolgte in 6-Loch-Platten. Die Zellen aus jeweils zwei Löchern wurden mit je einem Konstrukt transfiziert. Nach 24 Stunden wurde jeweils ein Loch von jedem Konstrukt mit 4 µM Doxycyclin behandelt, um die Genexpression zu induzieren. Konstrukte, die unter Doxycyclin-Behandlung eine gesteigerte Genexpression hatten, wurden für die stabile Transfektion ausgewählt. GlcCerS = Glucosylceramid-Synthase

1.12.3 Stabile Überexpression der Glukosylceramid-Synthase

Konstrukte, die bei der transienten Transfektion eine schaltbare, gesteigerte Genexpression zeigten, wurden für die stabile Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro/Tet-On-Zellen (303AG7) verwendet. Die Zellen wurden dazu für 24 Stunden mit den Vektoren pTRE/hUGCG und pTK-Hyg kotransfiziert. Der Vektor pTK-Hyg kodiert für die Hygromycin-Resistenz, die eine stabile Überexpression des Zielgens ermöglicht (siehe Kapitel 6.7.3). Nach der Transfektion wurden die Zellen auf Selektionsmedium kultiviert (siehe Kapitel 6.1.3.3). Der Erfolg der Überexpression wurde schließlich durch Untersuchung der *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase (Abbildung 22A), der Genexpression (Abbildung 22B und Abbildung 22C) und der Proteinexpression (Abbildung 22D) überprüft. Bei den untersuchten Klonen handelt es sich dabei um Mischpopulationen, da eine Subklonierung nicht erfolgreich war.

Die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde dabei zum einen mit der Aktivität von Mock-transfizierten Zellen verglichen und zum anderen wurde die Aktivität der einzelnen Klone mit und ohne Doxycyclin-Behandlung untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß nur zwei der drei untersuchten Populationen gesteigerte *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase gegenüber der Mock-Population aufwiesen. Von diesen beiden Populationen war nur MK12 schaltbar und wurde deshalb für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt. Die Induktion von MK12 mit 4 µM Doxycyclin führte außerdem zu einer ca. 1,2-fach gesteigerten mRNA-Expression und zu einer etwa 2-fach gesteigerten Proteinexpression der Glukosylceramid-Synthase. Als Kontrolle für die eingesetzte mRNA-Menge wurde zusätzlich das Haushaltsgen Ribo S9 amplifiziert.

Die Bandenstärke der PCR-Experimente wurde densitometrisch ausgewertet, die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase auf die Expression von Ribo S9 normalisiert und anschließend auf die Expression in den Mock-Zellen bezogen. Als Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge wurde der Western Blot zusätzlich mit β -Aktin inkubiert.

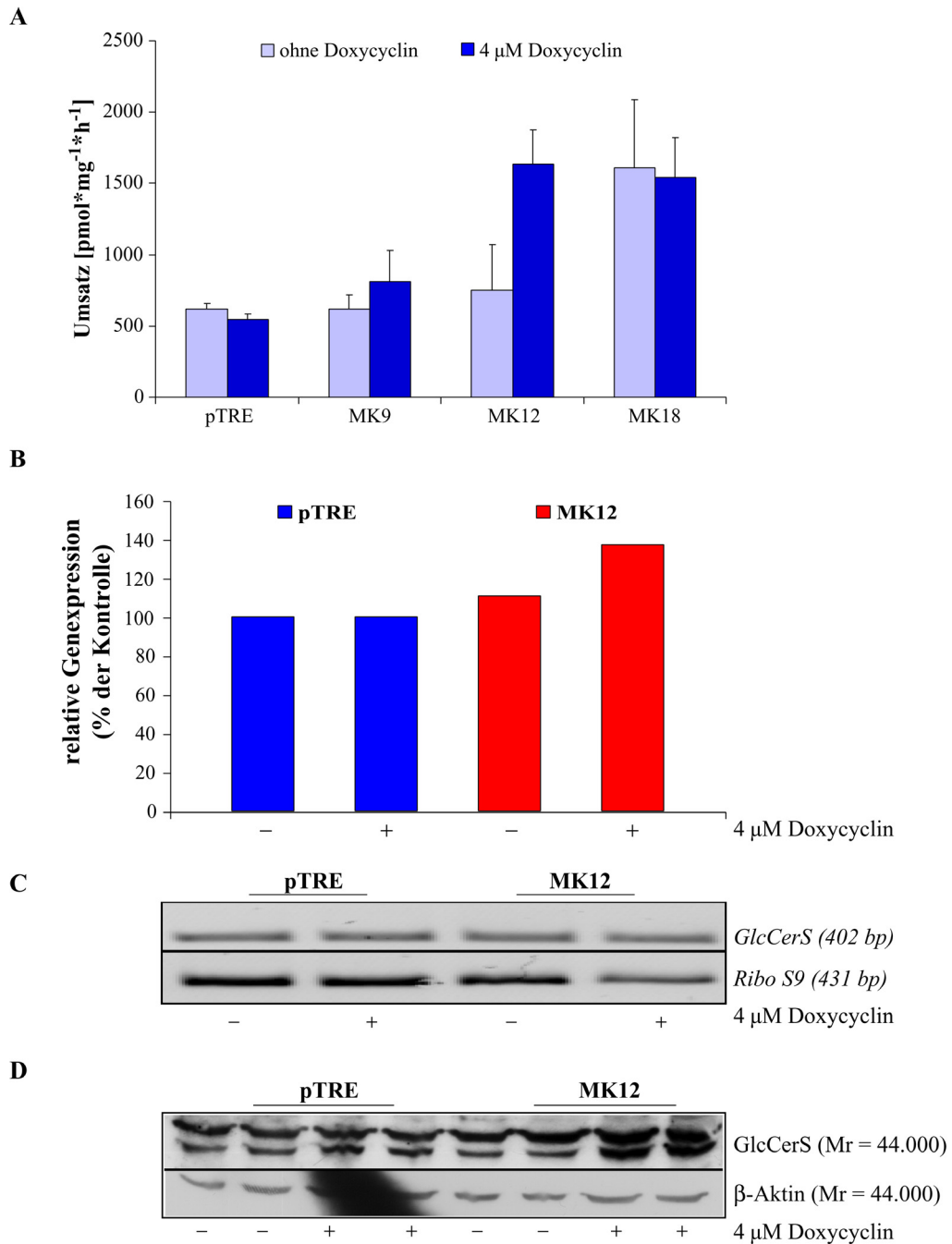


Abbildung 22: In-vitro-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase verschiedener stabiler Bro/hUGCG (Tet-On) Klone (A), Genexpression (B und C) und Proteinexpression (D) des stabilen Klons MK12. Die *In-vitro*-Aktivität der Klone wurde zum einen mit dem leeren Vektor (pTRE) verglichen, zum anderen wurde die Aktivität nach Behandlung mit 4 µM Doxycyclin untersucht. Nur einer der drei getesteten Klone zeigt nach der Behandlung mit Doxycyclin eine gesteigerte *in vitro* Aktivität. Die Genexpression des schaltbaren Klons (MK12) zeigt eine ca. 1,2-fache Induktion der Glukosylceramid-Synthase RNA nach 24 Stunden Doxycyclin Behandlung (B und C). Die Proteinexpression ist ebenfalls erhöht (Doppelwerte). GlcCerS = Glukosylceramid-Synthase

Neben der *In-vitro*-Aktivität, der mRNA- und der Protein-Expression der Glukosylceramid-Synthase wurde auch noch das Glykosphingolipid-Muster des überexprimierenden Klons MK12 untersucht (Abbildung 23). Die Zellen blieben hierfür entweder für 24 Stunden als Kontrolle unbehandelt (Spur 1) oder wurden mit 4 μ M Doxycyclin behandelt, um die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase zu induzieren (Spur 2). Anschließend wurden die Lipide wie in Kapitel 6.4.2 beschrieben isoliert und aufgetrennt und angefärbt. Zur Identifikation der Banden wurden verschiedene Standards mitgeführt. In Spur 3: Ceramid, in Spur 4: Glukosylceramid, in Spur 5: Galaktosylceramid, in Spur 6: ein Laktosylceramid-Mix (von oben: Laktosylceramid, GM3 und GD3) und in Spur 7: ein Monosialylgangliosid-Mix (von oben: GM3, GM2 und GM1). Der Glykosphingolipid-Gehalt der Proben wurde anschließend densitometrisch ausgewertet und auf 100.000 Zellen normalisiert. Die Menge an Glykosphingolipiden in den induzierten Zellen war dabei etwa doppelt so hoch im Vergleich zu den Kontrollzellen. Eine gesteigerte Glukosylceramid-Menge konnte nicht nachgewiesen werden.

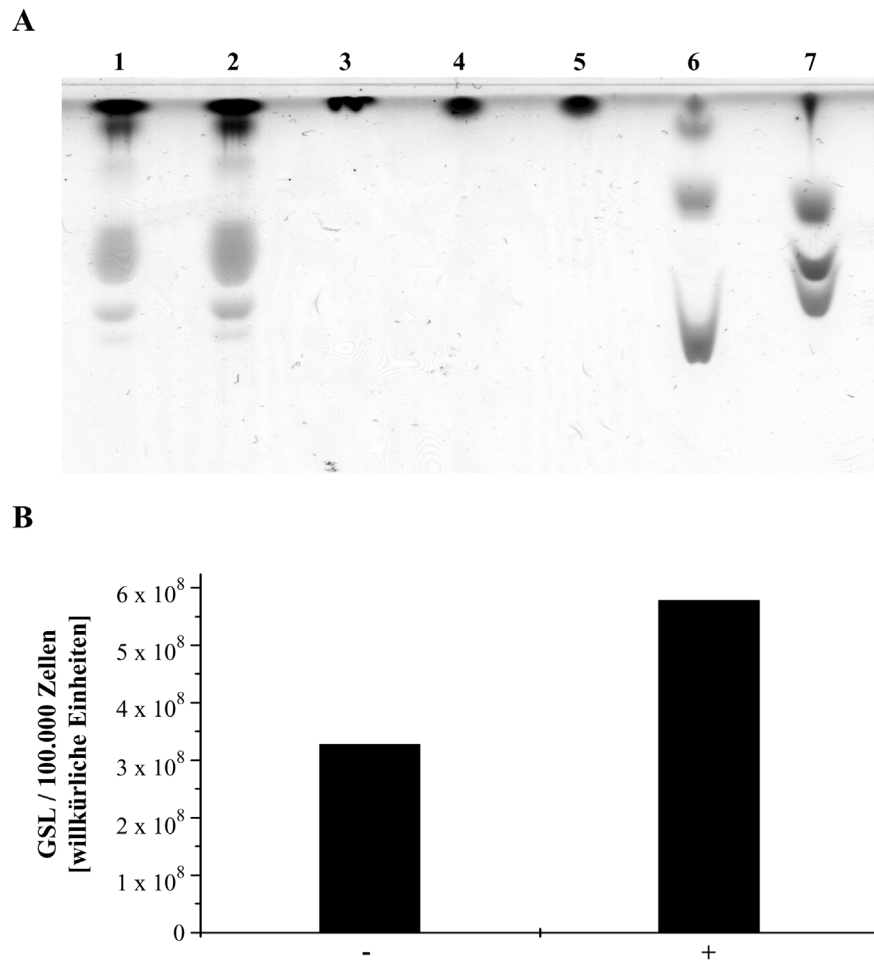


Abbildung 23: Chromatographische Auftrennung der Glykosphingolipide aus dem Glukosylceramid-Synthase überexprimierenden Klon MK12 (A) und densitometrische Auswertung des Glykosphingolipidgehaltes (B). Spur 1: Lipid aus MK12-Zellen (nicht induziert). Spur 2: Lipid aus MK12-Zellen (induziert mit 4 μ M Doxycyclin für 24 h). Spur 3: Ceramid. Spur 4: Glucosylceramid. Spur 5: Galaktosylceramid. Spur 6: Laktosylceramid-Mix (von oben: Laktosylceramid, GM3, GD3). Spur 7: Monosialylgangliosid-Mix (von oben: GM3, GM2, GM1). Die Densitometrische Auswertung der Glykosphingolipide (B) zeigt eine Verdopplung des Glykosphingolipid-Gehaltes in den Doxycyclin behandelten Zellen (+). GSL = Glykosphingolipide

1.13 Einfluß der Überexpression der Glukosylceramid-Synthase auf die Apoptoserate

Der Einfluß der Überexpression der Glukosylceramid-Synthase auf die Ceramid-induzierte Apoptose wurde untersucht, indem die Zellen in einer Dichte von 50.000 Zellen/ml ausgesät wurden. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden kultiviert, wobei die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase durch die Behandlung mit

4 μM Doxycyclin induziert wurde oder nicht. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich für weitere 24 Stunden mit 30 μM oder 50 μM C₈-Ceramid behandelt. Als Kontrolle dienten Ethanol-behandelte Zellen. Während der ganzen Zeit wurde kein Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt (siehe Kapitel 6.1.3). Die Apoptoserate der induzierten Zellen wurde mit der Apoptoserate von nicht induzierten Zellen verglichen. Lösemittel-behandelte Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden als % der Kontrolle berechnet. Die Apoptoserate stieg dabei bei 30 μM C₈-Ceramid auf 130 ± 17 % der Kontrolle in Zellen ohne induzierte Genexpression und auf 143 ± 24 % der Kontrolle in Doxycyclin-behandelten Zellen. Bei 50 μM C₈-Ceramid betrug die Apoptoserate 177 ± 25 % der Kontrolle in Zellen ohne Doxycyclin-Behandlung und 217 ± 33 % der Kontrolle bei induzierten Zellen. Ein zytotoxischer Effekt des Ceramids konnte nicht nachgewiesen werden.

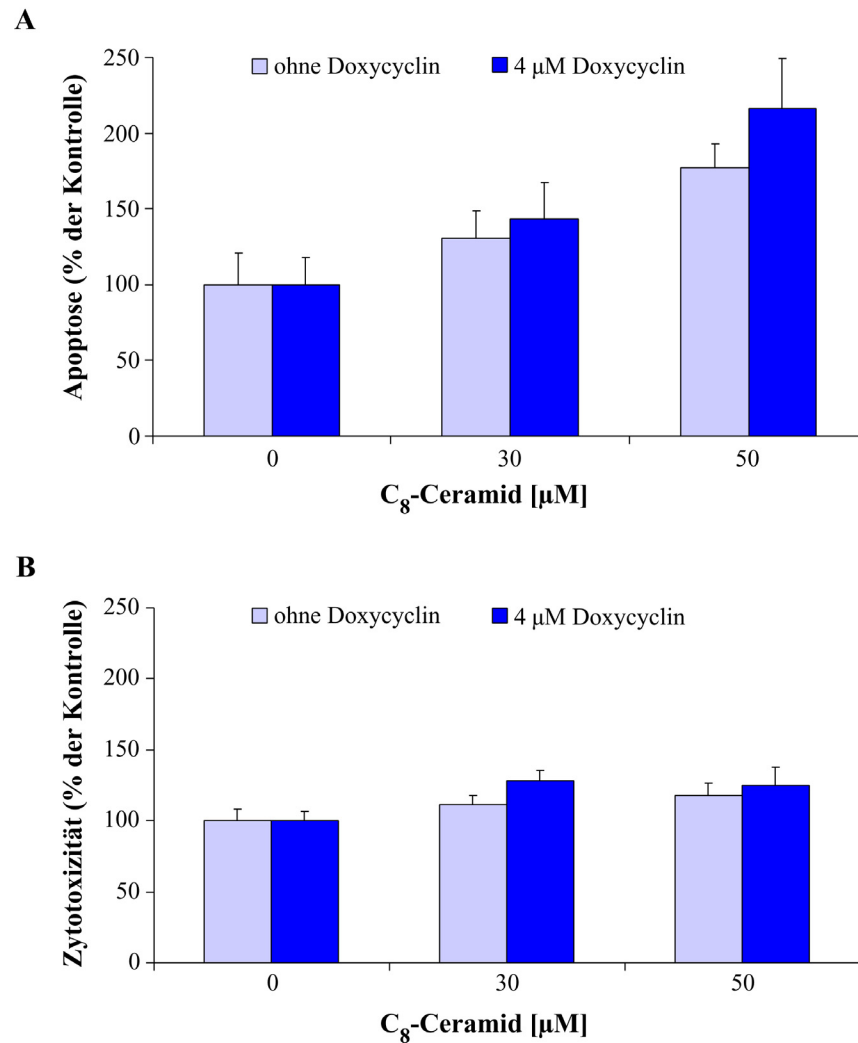


Abbildung 24: Einfluß der Überexpression der Glukosylceramid-Synthase auf die Ceramid-induzierte Apoptose (A) und Zytotoxizität (B). Die Zellen wurden zur Induktion der Genexpression für 24 Stunden mit Doxycyclin vorbehandelt, anschließend wurden sie für weitere 24 Stunden mit C₈-Ceramid und Ethanol als Lösemittelkontrolle behandelt. Ein zytotoxischer Effekt konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Die Apoptoserate der Zellen stieg konzentrationsabhängig an. Ein Einfluß der Überexpression der Glukosylceramid-Synthase konnte nicht gezeigt werden. Lösemittel-behandelte Zellen wurden auf 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden als % der Kontrolle berechnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung für n = 4.

1.14 Einfluß von D,L-*threo*-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) auf das Wachstum der humanen Melanomzelllinie Mel-HO

D,L-*threo*-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) ist ein Inhibitor der Glukosylceramid-Synthase der zweiten Generation (Olshefski und Ladisch, 1998). Die Hemmung der Glukosylceramid-Synthase führt zu einer Verminderung der Glykosphingolipide, zum anderen zu einem Anstieg an intrazellulärem Ceramid. Ceramid ist ein Signalmolekül, das das Wachstum der Zellen hemmt, die Differenzierung und die Apoptose fördert (Geilen *et al.*, 2001). Um den Einfluß des Inhibitors auf die Proliferation zu untersuchen, wurden Mel-HO-Melanomzellen in einer Dichte 25.000 von Zellen/ml ausgesät und 24 Stunden kultiviert (siehe Kapitel 6.1.3). Danach wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von PPPP für weitere 24 Stunden behandelt. Kontrollzellen wurden nur mit Lösemittel behandelt. Dabei zeigte sich, daß die Proliferation der Zellen bei einer Konzentration von 4 μM auf $(78 \pm 13) \%$ der Kontrolle sinkt ($p \leq 0,05$). Mit steigender Konzentration sinkt sie weiter bis auf $(22 \pm 4) \%$ der Kontrolle ($p \leq 0,01$) bei 10 μM (Abbildung 25).

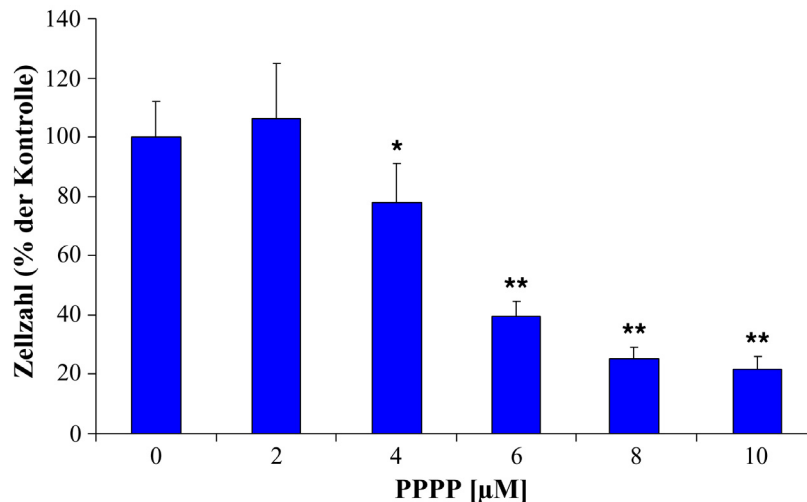


Abbildung 25: Einfluß von D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) auf das Wachstum der humanen Melanomzelllinie Mel-HO. Nur mit Lösemittel behandelte Zellen dienten als Kontrolle und wurden auf 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden als Prozent der Kontrolle berechnet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ bezogen auf die Kontrolle.

1.15 Hemmung der Glukosylceramid-Synthase durch D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP)

Die Konzentration an D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) die benötigt wird, um die Glukosylceramid-Synthase zu hemmen, wurde bestimmt, indem steigende Konzentrationen von PPPP bei der Bestimmung der *In-vitro*-Aktivität eingesetzt wurden (6.5.1). Die Konzentrationen an PPPP betragen dabei 0,05 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM, 2nM und 5 nM. Mit steigender Konzentration des Inhibitors nahm die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase ab. Bei einer eingesetzten PPPP-Konzentration von 0,05 nM betrug sie 29693 ± 2240 [pmol*mg⁻¹*h⁻¹]. Bei der maximalen Konzentration von 5 nM betrug die Enzym-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase dagegen nur noch 2769 ± 400 [pmol*mg⁻¹*h⁻¹]. Aus der Linearisierung der Daten durch halblogarithmische Auftragung läßt sich die halb-inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von PPPP abschätzen. Sie betrug $1,41 \pm 0,06$ nM.

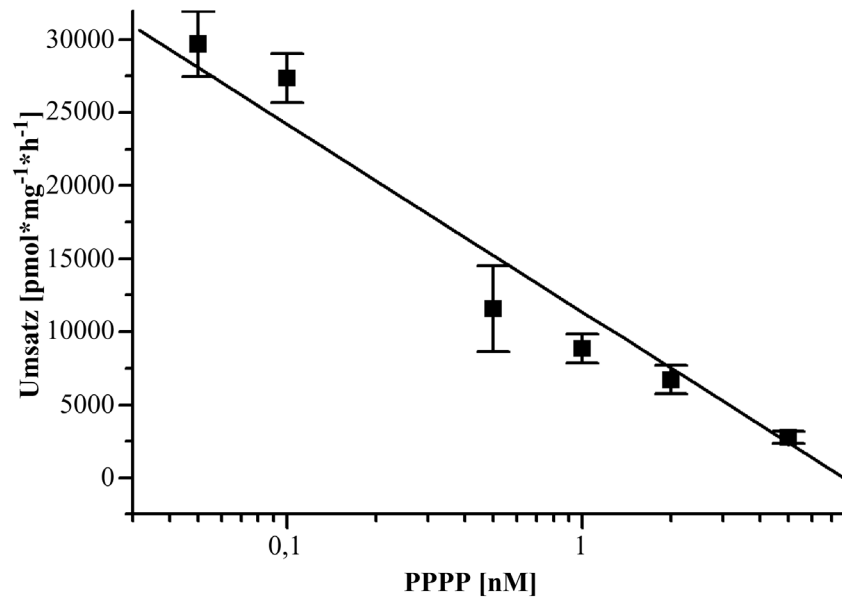


Abbildung 26: Halb-inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP). Die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen von PPPP gemessen. Die Konzentrationen wurde dabei zwischen 0,05 nM und 5 nM variiert. Der ermittelte IC₅₀-Wert für PPPP betrug dabei $1,41 \pm 0,06$ nM. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung für $n = 4$.