

1 Diskussion

Die Rolle der Sphingolipide bei der Signalübermittlung ist in den letzten Jahren zunehmend in das Forschungsinteresse gerückt. Neben Ceramid, das zu einer Hemmung des Zellwachstums, zu einer gesteigerten Differenzierung und vor allem zur Apoptose führt, sind auch seine beiden Gegenspieler, Sphingosin-1-phosphat und Glukosylceramid, die eine anti-apoptotische Wirkung haben, besonders untersucht worden.

Glukosylceramid wird aus Ceramid und UDP-Glukose durch die Aktivität der UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase (Glukosylceramid-Synthase), gebildet. Diese Reaktion ist die Schrittmacherreaktion für die meisten höheren Glykosphingolipide. Dabei handelt es sich um amphiphatische Moleküle, die mit ihrem Ceramid-Rest in der äußeren Plasmamembran verankert sind und hier u. a. am Aufbau der Glykokalix beteiligt sind. Die Synthese dieser Moleküle findet im Golgi-Apparat statt, wobei Glukosylceramid auf der zytosolischen Seite synthetisiert wird, alle weiteren Glykosphingolipide werden im Gegensatz dazu im Lumen gebildet (Coste *et al.*, 1986).

Neben der Beteiligung der Glykosphingolipide an der Glykokalix, konnte auch gezeigt werden, daß sich ihre Expression durch die Transformation von Zellen zu Krebszellen ändert (Hakomori, 1981). Für das maligne Melanom beim Menschen konnte 1986 gezeigt werden, daß die Malignität mit der Menge des Gangliosids GM2 korreliert (Thurin *et al.*, 1986). Lavie *et al.* (1996), konnten erstmals zeigen, daß die Glukosylceramid-Synthase einen direkten Einfluß auf die Chemotherapie-Resistenz von Krebszellen hat. Der Gehalt an Glukosylceramid korrelierte hier mit der Adriamycin-Resistenz von MCF-7-Brustkrebszellen. Die einzigen Daten, die bislang einen Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf das maligne Melanom vermuten lassen, stammen von sechs Patienten, bei denen gezeigt werden konnte, daß die Menge an Glukosylceramid mit der Ansprechrate auf die Chemotherapie korrelierte. Eine geringe Menge an Glukosylceramid entsprach dabei einer guten Ansprechrate (Lucci *et al.*, 1998).

1.1 Charakterisierung der humanen Glukosylceramid-Synthase in der humanen Melanomzelllinie Mel-HO

Die Glukosylceramid-Synthase ist als integrales Membranprotein der Golgi-Apparat-Membran beschrieben (Futerman und Pagano, 1991). Für Melanomzellen liegen bislang keine Daten darüber vor. Ich habe in meiner Arbeit die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in verschiedenen Fraktionen der Mikrosomen-Isolierung untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß die Aktivität im Pellet der 10.000 xg- und der 100.000 xg-Fraktion am größten ist. Dies bestätigt, daß es sich bei der Glukosylceramid-Synthase um ein Membranprotein und nicht um ein zytosolisches Protein handelt. Durch die Zentrifugation bei 100.000 xg werden auch die Membranen vieler kleinerer Zellorganelle sedimentiert. Im Pellet der 100.000 xg-Fraktion ist daher auch die größte Aktivität zu messen. Diese ist signifikant höher als im Pellet der 10.000 xg-Fraktion ($p \leq 0,05$). Die weitere Charakterisierung der Glukosylceramid-Synthase in Melanomzellen erfolgte durch Untersuchungen zur Abhängigkeit des Enzyms von der Proteinmenge und der Menge der beiden Substrate. Für die Abhängigkeit der Reaktion von der eingesetzten Proteinmenge wurden minimal 1 µg und maximal 100 µg Protein eingesetzt. Bereits bei 1 µg Protein konnte dabei die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase nachgewiesen werden. Die Aktivität stieg dann bis zu einer Proteinmenge von 30 µg an, da mit der steigenden Proteinkonzentration auch eine größere Menge Enzym am Umsatz beteiligt ist. Wird die Konzentration an Protein weiter erhöht, nimmt die Aktivität jedoch wieder ab. Neben der absoluten Menge an Protein, die für die Messung eingesetzt wird, spielt auch die Konzentration eine wichtige Rolle. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase steigt nur solange an, bis die kritische Konzentration überschritten ist. Oberhalb dieser kritischen Konzentration von 1,2 µg/µl kommt es vielleicht zum Ausfallen der Proteine und damit zu Löslichkeitsproblemen, so daß die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wieder abnimmt. Zuletzt wurde noch die Abhängigkeit der Reaktion von der Menge der eingesetzten Substrate untersucht. Auch hier konnte sowohl für UDP-Glukose als auch für C₈-Ceramid zunächst eine Aktivitätssteigerung gemessen werden, die dann für UDP-Glukose ab einer Konzentration von 130 µM und für C₈-Ceramid ab 6 nmol (0,24 mM) konstant bleibt. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann nicht weiter steigen, da bei den eingesetzten Substratmengen jeweils die Sättigung erreicht ist. Es sind also in

dem Ansatz keine freien Bindungsstellen des Enzyms für weiteres Substrat mehr vorhanden.

Neben C₈-Ceramid, wurden noch weitere Ceramide als Substrat getestet: Die beiden Dihydro-Ceramide Dihydro-C₈-Ceramid (DH-C₈-Ceramid) und Dihydro-C₂-Ceramid (DH-C₂-Ceramid), denen die *trans*-4,5 Doppelbindung im Sphingosingerüst fehlt, das kurzkettige C₂-Ceramid und natürliches, langkettiges Ceramid. Die kurzkettigen Ceramid-Analoga unterscheiden sich dabei in der Kettenlänge der Fettsäure von natürlichem Ceramid. In Mel-HO-Melanomzellen sind sowohl die Dihydro-Analoga, als auch das kurzkettige C₂-Ceramid als Substrat für die Glukosylceramid-Synthase nicht geeignet. Zwischen C₈-Ceramid und natürlichem Ceramid konnte dagegen kein Unterschied in der Aktivität gemessen werden. Diese Daten decken sich mit den Messungen für andere Zelllinien, die gezeigt haben, daß eine minimale Kettenlänge von fünf Kohlenstoffatomen als Acylkette im Ceramid notwendig ist, um eine meßbare Aktivität zu erhalten. Diese Daten zeigen außerdem, daß die *trans*-4,5-Doppelbindung im Sphingosinrückgrat von Ceramid in Mel-HO-Zellen essentiell ist. Im Gegensatz zu anderen Arbeitsgruppen, die mit DH-C₈-Ceramid eine Aktivität von ca. 25 % im Vergleich zu C₈-Ceramid gemessen haben (Paul *et al.*, 1996), sinkt die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in Melanomzellen auf unter 8% im Vergleich zu C₈-Ceramid. Die Struktur des Lipid-Substrates ist also in verschiedenen Zelltypen von unterschiedlicher Bedeutung. Für die volle Enzymaktivität ist aber in jedem Fall eine nicht zu kurze Kettenlänge und die Doppelbindung des Sphingosins wichtig.

Shayman und Abe (2000), haben gezeigt, daß die Zugabe von 2 mM Nikotin-Adenin-Dinukleotid (NAD) die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase steigert. Dieser Effekt liegt in der Hemmung von Nukleotid-Pyrophosphatasen, von denen bekannt ist, daß sie die Reaktionen verschiedener Glukosyltransferasen durch Spaltung der Nukleotidzucker, die diesen Enzymen als Substrat dienen, hemmen. Die Untersuchung des Einflusses von nikotinhaltigen Nukleotiden in Mel-HO-Melanomzellen hat dabei keine Wirkung auf die *In-vitro*-Aktivität gezeigt. In Melanomzellen werden Nukleotid-Pyrophosphatasen möglicherweise nicht oder nur in sehr geringer Menge exprimiert, so daß diese Enzyme auf den *In-vitro*-Assay keinen Einfluß haben; Daten hierzu liegen jedoch bislang nicht vor. Ein weiterer Unterschied zwischen den gemessenen und den publizierten Daten besteht darin, daß diese Daten in Nierenzellen gezeigt haben, daß eine Erhöhung der Proteinmenge nicht zu einer Steigerung der *In-vitro*-Aktivität geführt

haben. Die Aktivität stieg in diesen Zellen erst durch die Zugabe von Nukleotiden (Shukla und Radin, 1990). Die *In-vitro*-Enzymaktivität in Melanomzellen läßt sich dagegen durch die Proteinmenge beeinflussen.

1.2 Expression und *In-vitro*-Aktivität der humanen Glukosylceramid-Synthase in verschiedenen humanen Melanomzelllinien und primären humanen Melanozyten

Die Expression und Aktivität der Glukosylceramid-Synthase wurde in den letzten Jahren als ein Mechanismus identifiziert, der eine Chemotherapie-Resistenz bei Krebszellen auslösen kann (Lavie *et al.*, 1996). Für das maligne Melanom liegen bislang nur sehr wenige Daten von sechs Patienten über diesen Mechanismus vor (Lucci *et al.*, 1998). Diese Daten lassen einen Zusammenhang zwischen dem Erfolg der Chemotherapie und Glukosylceramid-Synthase vermuten. Um diesen Mechanismus in meiner Arbeit näher zu untersuchen, wurde von der Firma Eurogentec (Köln, D) zunächst ein polyklonaler Antikörper hergestellt. Dafür wurden aus der Proteinsequenz des Enzyms zwei Peptide ausgewählt, die einem Bereich nahe des N-Terminus (Aminosäuren 33-45) und dem C-terminalen Ende (Aminosäuren 383-394) entsprechen. Vergleiche dieser Peptide mit anderen Proteinsequenzen mittels BLAST haben gezeigt, daß die entsprechenden Sequenzen nur in der Glukosylceramid-Synthase vorkommen. Die Charakterisierung des Antikörpers (SA-7061) erfolgte durch einen Sandwich-ELISA, bei dem die beiden Peptide als Antigen eingesetzt wurden. Dabei hat sich gezeigt, daß das SA-7061-Antiserum in jeder Verdünnung signifikant besser bindet, als das Präimmunserum. Mit steigender Verdünnung des SA-7061-Antiserums während der Kopplung an die Mikrotiterplatte läßt sich dabei zunächst eine zunehmend besser Bindung nachweisen, die ab einer Verdünnung von 1:500 bis zu der maximal eingesetzten Verdünnung von 1:10.000 konstant bleibt. Die größere Signalstärke durch die Verdünnung des Antiserums kommt möglicherweise dadurch zustande, daß bei einer zu großen Menge an gekoppeltem Antikörper, diese aus sterischen Gründen nicht mehr so gut in der Lage sind, an das Antigen zu binden. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, daß es zwar noch zur uneingeschränkten Antigenbindung kommt, das Antiserum bei der zweiten Inkubation diese jedoch aufgrund der Menge und eventuell vorhandenen räumlichen Nähe nicht mehr richtig erkennen kann.

Um die Ergebnisse zu stützen, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, daß nur in einer der fünf mitgeführten Kontrollen eine Bindung durch das Antiserum SA-7061 zu messen ist, die signifikant höher ist als die Bindung des Präimmunserums. Bei dieser Kontrolle handelt es sich um einen Ansatz, bei dem das Antiserum nicht an die Mikrotiterplatte gekoppelt wurde. Die Bindung hier zeigt, daß die Ausbildung eines Sandwich-Komplexes aus Antiserum, Antigen und weiterem Antiserum für das Gelingen des Versuches nicht notwendig ist. Die Bildung des Komplexes führt jedoch zu einem stärkeren Signal. In der nächsten Kontrolle wurde der sekundäre Antikörper weggelassen. Ein Signal ist hier nicht nachzuweisen, da ohne die Peroxidase die Farbreaktion, die als Nachweis dient nicht abläuft. Eine weitere Kontrolle wurde ohne Antigen inkubiert. In dieser Probe ist ein leichtes Signal bei beiden Seren nachzuweisen, es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen dem Präimmunserum und dem SA-7061-Antiserum. Das Signal in dieser Kontrolle kann durch die Kopplung der Seren an die Mikrotiterplatte erklärt werden. Antikörper die an die Platte gebunden sind, werden durch den sekundären Antikörper erkannt, was zu einem schwachen Signal führt. Diese Kontrolle kann daher gut genutzt werden, um den Anteil des Signals zu identifizieren, der nicht mit der Bindung des untersuchten Antikörpers an sein Antigen zusammenhängt. Bei der vorletzten Kontrolle wurden das Präimmunserum bzw. das SA-7061-Antiserum weggelassen. Ein Signal ist hier nicht nachweisbar. Bei der letzten Kontrolle wurde ein Peptid aus der Sequenz der humanen Phospholipase D1 verwendet, um die Spezifität zu testen (Müller-Wieprecht *et al.*, 1998). Trotz der erhöhten Signalstärke in dieser Kontrolle konnte keine signifikant höhere Bindung gegenüber dem Präimmunserum gemessen werden. Das SA-7061-Serum bindet also in jeder der eingesetzten Verdünnungen besser als das Präimmunserum. Eine optimale Signalstärke im Sandwich-ELISA wird durch Verdünnungen von 1:500 bis 1:10.000 während der Kopplung an die Mikrotiterplatte erreicht. Eine Optimierung der Seren-Verdünnungen während der Ausbildung des Sandwich-Komplexes, sowie die Optimierung der Verdünnung des sekundären Antikörpers wurden nicht durchgeführt.

Mit Hilfe des hergestellten Antikörpers konnte gezeigt werden, daß sich die Expression der Glukosylceramid-Synthase in humanen primären Melanozyten auf Proteinebene von der Expression von Mel-HO-Melanomzellen unterscheidet. Die Expression des Enzyms in Melanozyten war in Western-Blot-Experimenten bei gleicher Proteinmenge deutlich geringer als in Mel-HO-Zellen. Dieser Unterschied kann jedoch

nicht auf eine unterschiedliche Genexpression in Melanozyten und Melanomzellen zurückgeführt werden. RT-PCR-Experimente mit RNA-Proben aus verschiedenen Melanozytenpräparationen im Vergleich zu unterschiedlichen RNA-Isolierungen aus Mel-HO-Zellen haben gezeigt, daß die Glukosylceramid-Synthase in Melanozyten und Melanomzellen zwischen verschiedenen Präparationen bzw. Passagen der jeweiligen Zellen unterschiedlich exprimiert wird. Ein Unterschied in der mRNA-Expression zwischen Melanomzellen und Melanozyten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Expressionsunterschiede auf Proteinebene zwischen Melanozyten und Melanomzellen liegen daher nicht an der unterschiedlichen Genexpression der Glukosylceramid-Synthase, sondern möglicherweise an der unterschiedlichen Stabilität der Glukosylceramid-Synthase-mRNA in den beiden Zelltypen. Die Unterschiede in der Proteinexpression korrelieren jedoch mit der gemessenen *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in beiden Zelltypen. Die Aktivität des Enzyms betrug in Melanozyten weniger als die Hälfte der Aktivität, die in Mel-HO-Melanomzellen gemessen werden konnte. Eine unterschiedliche Enzymaktivität von Mel-2A- und A-375-Melanomzellen im Vergleich zu Mel-HO-Zellen konnte nicht festgestellt werden. Die Glukosylceramid-Synthase wird offenbar in Melanozyten und Melanomzellen unterschiedlich reguliert, was zu einer gesteigerten Proteinexpression und dadurch auch zu einer erhöhten Aktivität des Enzyms *in-vitro* führt.

Trotz der erhöhten Proteinexpression und *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in Melanomzellen ist keine erhöhte Menge an Glukosylceramid in Mel-HO-Melanomzellen im Vergleich zu humanen Melanozyten feststellbar. Die Lipidextraktion zeigt eine vergleichbare Menge des Glykosphingolipids in beiden Zelltypen. Die Melanomzellen haben allerdings einen größeren Gehalt an komplexeren Glykosphingolipiden wie Lactosylceramid und dem Gangliosid GM3. Das gebildete Glukosylceramid wird also weiter umgesetzt. Die gesteigerte Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in den Melanomzellen könnte einen entscheidenden Schritt für die Entartung der Zellen und die Umgehung der Immunabwehr des Körpers darstellen, da kürzlich gezeigt werden konnte, daß die Glykosphingolipide GM3 und GD3, die von Melanomzellen gebildet werden, die Funktion und phänotypische Differenzierung von dendritischen Zellen Dosis-abhängig hemmen (Peguet-Navarro *et al.*, 2003). Auffallend ist, daß auch Melanozyten bereits einen sehr großen Gehalt an GM3 im Vergleich zu anderen Glykosphingolipiden haben. Dieser Pool erleichtert

möglicherweise die Entartung der Zellen, da nur noch eine geringe Erhöhung notwendig ist.

Bcl-2 ist ein Oncoprotein, das eine antiapoptotische Wirkung hat. Es wurde 1993 durch Fesus erstmals beschrieben und ist inzwischen der Namensgeber für eine ganze Proteinfamilie, die nicht nur antiapoptotische Mitglieder hat. Die Überexpression dieses Proteins in verschiedenen Zellen führt zu einer gesteigerten Resistenz der Zellen gegenüber dem Fas-Ligand- oder dem Ceramid-induzierten Zelltod (Müller-Wieprecht *et al.*, 2000; Raisova *et al.*, 2002). Genauso wie bei Bcl-2, ist auch bei Glukosylceramid eine antiapoptotische Wirkung beschrieben. Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Resistenz der Zellen, die durch Bcl-2 vermittelt wird, und der Glukosylceramid-Synthase herzustellen, wurde die *In-vitro*-Aktivität des Enzyms in Bcl-2-überexprimierenden Bro-Melanomzellen untersucht. Die Bcl-2-Expression läßt sich in dieser Zelllinie durch die Zugabe von Doxycyclin induzieren. Dabei wurde die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase von Zellen ohne induzierte Bcl-2-Expression mit Zellen verglichen, die 24 Stunden mit 4 µM Doxycyclin behandelt wurden. Dabei hat sich gezeigt, daß die Überexpression von Bcl-2 in Bro-Melanomzellen keinen signifikanten Einfluß auf die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase hat. Durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine ist ein solcher Einfluß durch direkte Interaktion nicht möglich. Bcl-2 ist in der äußeren mitochondrialen Membran zu finden, wogegen die humane Glukosylceramid-Synthase ein integrales Protein der Golgi-Membran ist. Die Resistenz der Bro/Tet-On/Bcl-2-Zellen wird also nur durch die Expression des Bcl-2-Proteins vermittelt.

Der Vergleich der *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in der Ceramid- und Fas-Ligand-sensitiven Melanomzelllinie Mel-HO mit der resistenten Zelllinie Mel-2A hat zum gleichen Ergebnis geführt. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß sich die beiden Zelllinien in ihrem Verhältnis der Bcl-2 Proteine Bax und Bcl-2 unterscheiden. Die resistente Zelllinie wies dabei eine höhere Expression von Bcl-2 auf (Raisova *et al.*, 2001). Auch hier war in der resistenten Mel-2A-Melanomzelllinie die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase nicht höher.

1.3 Schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro-Melanomzellen

Die gesteigerte Aktivität der Glukosylceramid-Synthase führt in MCF-7^{Adr}-Brustkrebszellen zur Resistenz der Zellen gegenüber Adriamycin und anderen Apoptose auslösenden Stoffen (Lavie *et al.*, 1996). Die Überexpression des Enzyms in Adriamycin-sensitiven MCF-7-Zellen führte zu Resistenz dieser Zellen (Liu *et al.*, 1999a). Um zu überprüfen, ob die Überexpression der humanen Glukosylceramid-Synthase zu einer Apoptose-Resistenz in Melanomzellen führt, wurde das Gen zunächst aus dem Vektor pT7T3D-pac ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pTRE eingefügt. Dieser Vektor gehört zu einem durch Tetracyclin schaltbaren Überexpressionssystem (Clontech, Heidelberg, D). Der Erfolg dieser Umklonierung wurde durch den Verdau des entstandenen Konstruktes (pTRE/hUGCG) mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XbaI* überprüft. Die beiden Enzyme wurden dabei so gewählt, daß eine der Schnittstellen (*NotI*) in der Sequenz der humanen Glukosylceramid-Synthase liegt und die zweite Schnittstelle in der Sequenz des Vektors, so daß die Orientierung des Inserts überprüft werden kann. Bei einem richtigen Einbau führt der Verdau zu Fragmenten der Länge 3630 bp und 1611 bp, bei einem revers komplementären Einbau zu Fragmenten der Länge 4282 bp und 959 bp. Neben der Kontrolle der Orientierung des Zielgens im Expressionsvektor dient der Verdau auch der Überprüfung des Einbaus, da ein Vektor der nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten ist, sehr leicht religieren kann. Auch ein mehrfacher Einbau von Genen in den Vektor ist denkbar und muß ausgeschlossen werden.

Die Überprüfung der Klonierung mittels Restriktion ist jedoch ungenau. Die Größe der Fragmente im Agarosegel kann nur abgeschätzt werden. Mutationen, die während der Klonierung aufgetreten sind, können auf diese Weise nicht erkannt werden. Bro/Tet-On-Zellen (303AG7) wurden deshalb transient mit den Konstrukten transfiziert, die bei der Restriktionsanalyse positiv waren. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden entweder mit 4 µM Doxycyclin behandelt, um die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase zu induzieren oder blieben unbehandelt. Die Genexpression wurde nach weiteren 24 Stunden durch RT-PCR-Analyse untersucht. Als Vergleich dienten dabei Zellen, die nur mit dem leeren pTRE-Vektor transfiziert worden sind (Mock). Bei einer erfolgreichen Klonierung ist die Genexpression in den induzierten

Zellen höher als in den nicht induzierten. Als Kontrolle für die eingesetzte Menge an RNA wurde das Haushaltsgen Ribo S9 zusätzlich amplifiziert. Die Expression dieses Gens ist unabhängig von der Induktion oder anderen Einflüssen und kann daher sehr gut als Kontrolle verwendet werden. Obwohl alle für die transiente Transfektion eingesetzten Konstrukte ein positives Ergebnis bei dem Restriktionsverdau hatten, ist die Genexpression nicht in allen Fällen erhöht. Hinzu kommt, daß nicht alle eingesetzten Konstrukte ausschließlich durch die Zugabe von Doxycyclin eine gesteigerte Genexpression zeigten, sondern eine konstitutive Überexpression.

Die fehlende Expression kann auf eine Mutation zurückzuführen sein, die sich im Verlauf der Klonierung oder der Transfektion im Gen oder dem Expressionsvektor gebildet hat. Neben Mutationen kann auch die Menge an aufgenommenem Vektor einen Einfluß auf die Expression haben. Eine sehr geringe Menge an Vektor reicht möglicherweise nicht aus, die Expression der Glukosylceramid-Synthase so stark zu erhöhen, daß der Unterschied mittels PCR nachweisbar ist.

Die fehlende Regulation durch Doxycyclin in den Proben, mit konstitutiver Überexpression zeigt, daß der Promotor (hCMV^{*-1}/TRE) auch ohne die Aktivierung durch Doxycyclin aktiv ist. Eukaryontische Promotoren werden im Gegensatz zu prokaryontischen Promotoren nicht vollständig ausgeschaltet. In diesem Fall liegt also auch ohne die Aktivierung durch Doxycyclin eine hohe basale Genexpression vor. Auch hier spielt wahrscheinlich die Menge der Vektoren eine Rolle, die während der Transfektion von den Zellen aufgenommen werden. Eine sehr hohe Anzahl führt eventuell zu einer höheren basalen Expression, so daß eine weitere Induktion der Glukosylceramid-Synthase-Genexpression nicht möglich ist.

Drei Konstrukte, die nach der transienten Transfektion eine schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase gezeigt haben, wurden für die stabile Transfektion von Bro/Tet-On-Melanomzellen eingesetzt. Die Zellen wurden dazu 24 Stunden mit dem Konstrukt der Glukosylceramid-Synthase und Vektor pTK-Hyg kotransfiziert. pTK-Hyg ist ein Vektor der für die Hygromycin-B-Resistenz der Zellen kodiert. Die Kotransfektion mit diesem Vektor ist wichtig, da der Vektor pTRE keine Resistenzgene für eine Selektion in eukaryontischen Zellen trägt. Für die stabile Transfektion der Zellen wurden diese 24 Stunden nach Beginn der Transfektion für weitere 24 Stunden auf DMEM-Medium kultiviert. Anschließend wurden die beiden Selektionsantibiotika Geneticin und Hygromycin B zugesetzt. Dies führt dazu, daß nur die Zellen überleben, die mindestens den Vektor pTK-Hyg aufgenommen haben. Da

diese Resistenzgene für das Wachstum der Zellen unter Selektionsbedingungen notwendig sind, verlieren sie die aufgenommenen Vektoren nicht. Während der Zellteilung kann es zu Rekombinationsereignissen kommen, die dazu führen, daß die Zellen die Plasmid-DNA in ihre Chromosomen einbauen. Die zusätzlichen Gene können auf diese Weise bei der Zellteilung an beide Tochterzellen weiter gegeben werden.

Die Untersuchung der stabilen Klone erfolgte durch Messung der *In-vitro*-Aktivität, der Genexpression und der Proteinexpression. Als Kontrolle dienten bei allen Versuchen Zellen, die nur mit pTRE transfiziert worden sind. Verglichen wurde jeweils das Ergebnis ohne Induktion der Genexpression mit dem Ergebnis der durch 4 µM Doxycyclin induzierten Genexpression. Die Zellen, die unter den Selektionsbedingungen wachsen, unterscheiden sich in der Stärke ihrer Expression und Induzierbarkeit. Da eine Subklonierung dieser Zellen nicht erfolgreich war, wurden alle Untersuchungen an den Mischklonen durchgeführt.

Die Untersuchung der *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase hat dabei gezeigt, daß nur in zwei der drei getesteten Klone höhere Aktivität zu messen war. Dabei war nur in MK12-Zellen eine Induzierbarkeit der Aktivität gegeben. MK9-Zellen hatten keine höhere Aktivität als die als Kontrolle mitgeführten Bro/Tet-On/pTRE-Zellen. Da dieses Konstrukt zu einer erhöhten Genexpression bei der transienten Transfektion geführt hat, liegt hier offenbar ein Fehler bei der Translation in Protein vor. Möglicherweise hat das Gen der Glukosylceramid-Synthase bei diesem Konstrukt eine Mutation, die zu einem funktionsunfähigen Protein führt. In den MK12-Zellen liegt eine schaltbare Aktivität der Glukosylceramid-Synthase vor. Die Aktivität der nicht induzierten Zellen ist dabei geringfügig höher als die in den Vektor transfizierten Zellen, was auf eine geringe basale Genexpression schließen läßt, die unabhängig von Doxycyclin ist. Die Behandlung der Zellen mit 4 µM Doxycyclin führt nach 24 Stunden zu einer ca. 2-fachen *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase. Die Induktion der Genexpression führt bei diesem Konstrukt also nicht nur zu einer schaltbaren Überexpression der Glukosylceramid-Synthase, sondern auch zu einer induzierbaren Steigerung der Enzymaktivität. In den MK18-Zellen liegt eine konstitutive, nicht durch Doxycyclin regulierbare, gesteigerte Aktivität der Glukosylceramid-Synthase im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen vor. Sowohl in unbehandelten Zellen, als auch in Doxycyclin-behandelten Zellen liegt eine etwa 2,5-fach höhere *In-vitro*-Aktivität der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vor. Eine Regulierbarkeit durch

Doxycyclin wird möglicherweise durch die hohe basale Aktivität verhindert. Diese Aktivität stellt vermutlich bereits das Maximum dar und kann daher durch Doxycyclin nicht weiter gesteigert werden.

Alle weiteren Versuche wurden mit MK12-Zellen durchgeführt. Die Untersuchung der Genexpression der Glukosylceramid-Synthase zeigt dabei, daß auch auf Genebene eine schwache Erhöhung der Expression unter nicht induzierenden Bedingungen vorliegt. Die mRNA-Expression wird durch die Zugabe von Doxycyclin auf ca. 120 % der Grundexpression gesteigert. Dabei fällt auf, daß dies nicht proportional zu der erhöhten *In-vitro*-Aktivität ist. Die Menge an gebildeter mRNA ist jedoch nicht proportional zu der gebildeten Proteinmenge, so daß auch eine geringe Überexpression ausreicht um eine stärkere Proteinexpression und damit auch eine deutlich gesteigerte *In-vitro*-Aktivität zu bewirken. Dies bestätigt sich auch bei der Untersuchung der Proteinexpression der Glukosylceramid-Synthase. Auch hier liegt nach Behandlung der Zellen mit 4 µM Doxycyclin eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge vor.

Die Klonierung der humanen Glukosylceramid-Synthase hat also einen Mischklon ergeben, der eine induzierbare Genexpression der Glukosylceramid-Synthase aufweist. Dies führte zu einer gesteigerten Proteinexpression und dadurch auch zu einer erhöhten *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in Doxycyclin-behandelten MK12-Zellen.

Für die Untersuchung des Apoptoseverhaltens dieses Klons wurden die Zellen 24 Stunden lang entweder mit Doxycyclin behandelt oder nicht. Danach wurden die Zellen mit 30 µM C₈-Ceramid und 50 µM C₈-Ceramid für weitere 24 Stunden behandelt. Die Induktion der Genexpression wurde in dieser Zeit fortgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit Lösemittel behandelt worden sind. Die Apoptose wurde mittels ELISA-Technik gemessen. Der Vergleich der induzierten Zellen mit den nicht induzierten Zellen zeigt dabei, daß es keinen Unterschied gibt. Die Apoptoserate ist in beiden Fällen und bei beiden eingesetzten Ceramid-Konzentrationen vergleichbar hoch. Die Überexpression der humanen Glukosylceramid-Synthase hat in der humanen Melanomzelllinie Bro also keinen Einfluß auf die Ceramid-sensitivität.

Die Glukosylceramid-Synthase ist ein integrales Enzym der Golgi-Apparat-Membran (Futerman und Pagano, 1991). Die Synthese des Glukosylceramids findet auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates statt. Werden exogen Ceramid oder Ceramidanaloga zugesetzt, werden sie möglicherweise nicht zum Golgi-Apparat transportiert. Sie können daher nicht zu Glukosylceramid umgesetzt werden. Dieser

Zusammenhang konnte 2000 von Tepper *et al.* in Jurkat-T-Zellen gezeigt werden. Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase führte hier ebenfalls nicht zu einer Apoptoseresistenz, da nur Ceramid aus dem *De-novo*-Stoffwechsel umgesetzt wurde. Die Lipidextraktion aus dem Klon MK12 hat außerdem gezeigt, daß Glukosylceramid weiter umgesetzt wird, vor allem zu Laktosylceramid und dem Gangliosid GM3. Eine größere Menge an Glukosylceramid konnte in den Zellen mit induzierter Glukosylceramid-Synthase-Genexpression nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten, die von mir in Mel-HO-Melanomzellen gefunden wurden. Trotz der erhöhten *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in humanen Melanomzelllinien verglichen mit humanen Melanozyten, weisen Mel-HO-Zellen keine erhöhte Menge an Glukosylceramid auf, die Menge an Laktosylceramid und GM3 ist jedoch erhöht. Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase verändert also nicht das Glykosphingolipidmuster der Melanomzellen, sondern nur die Menge.

Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in der humanen Melanomzelllinie Bro hat also keinen anti-apoptotischen Einfluß. Exogen zugesetztes C₈-Ceramid wird entweder durch seine falsche subzelluläre Lokalisation nicht zu Glukosylceramid umgesetzt und löst daher die Apoptose in den Zellen aus, oder das Ceramid wird nach seiner Glukosylierung zu höheren Gangliosiden umgesetzt und verändert damit nicht das Glykosphingolipid-Muster der Zellen. Möglicherweise ist aber das Verhältnis einzelner Glykosphingolipide zueinander für die Apoptose-Resistenz der Zellen von Bedeutung.

1.4 Einfluß des Glukosylceramidsynthase-Inhibitors D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP)

D,L-threo-1-Phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol (PPPP) ist ein Inhibitor der Glukosylceramid-Synthase (Olshefski und Ladisch, 1998). Die Hemmung der Glukosylceramid-Synthase führt zu einem intrazellulären Ceramidanstieg, der auch zur Apoptose führen kann. Neben dem Einfluß des Inhibitors auf das Wachstumsverhalten von Mel-HO-Melanomzellen wurde auch die halb-inhibitorische Konzentration (IC₅₀) für die *In-vitro*-Enzymaktivität bestimmt.

Die Behandlung der Mel-HO-Melanomzellen mit dem Inhibitor erfolgte für 24 Stunden. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen gemessen, indem die Zellzahl mit Hilfe der Kristallviolett-Färbung bestimmt wurde (Gillies *et al.*, 1986).

Dabei hat sich gezeigt, daß die Zellzahl bei einer PPPP-Konzentration von 4 μM bereits signifikant ($p \leq 0,05$) niedriger ist als in den Kontrollzellen. Eine weitere Steigerung der Konzentration führt zu einer weiteren Abnahme der Proliferation, die sich ab einer Konzentration von 8 μM PPPP nicht weiter ändert. Ab dieser Konzentration sind vermutlich alle Zellen tot. Die verbleibende Zellzahl von 20 % der Kontrolle ergibt sich wahrscheinlich durch Farbstoff, der unspezifisch an den Kunststoff der 24-Loch-Platte bindet, in denen die Zellen kultiviert werden. Der antiproliferative Einfluß des Inhibitors kann durch den Ceramidanstieg in den Zellen erklärt werden. Ceramid ist ein intrazelluläres Signalmolekül, das die Proliferation der Zellen hemmt, die Differenzierung und die Apoptose fördert (Obeid *et al.*, 1993; Geilen *et al.*, 1997). Ab einer eingesetzten PPPP-Konzentration von 4 μM ist die Glukosylceramid-Synthase ausreichend gehemmt, so daß es in der Zelle zu einem Anstieg an Ceramid kommt. Die konzentrationsabhängige Auslösung des antiproliferativen Effekts von PPPP läßt vermuten, daß in den Zellen ein Schwellenwert der Ceramidkonzentration überschritten werden muß. Je stärker also die Glukosylceramid-Synthase gehemmt wird, desto eher wird dieser Schwellenwert erreicht, was dazu führt, daß nach 24 Stunden weniger Zellen anzufärben sind.

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von PPPP wurde durch die Zugabe von steigenden PPPP-Konzentrationen zu dem *In-vitro*-Enzymassay ermittelt. Der IC_{50} -Wert gibt die Konzentration eines Hemmstoffes an, bei der nur noch 50 % der Enzymaktivität vorhanden ist. Die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase sank dabei von 29693 ± 2240 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] bei 0,05 nM auf 2769 ± 400 [$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] bei 5 nM PPPP. Der IC_{50} -Wert für PPPP betrug für die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase $1,41 \pm 0,06$ nM. Die Hemmung des Enzyms setzt also bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen ein, als die antiproliferative Wirkung. Der Grund hierfür liegt sicher daran, daß es sich bei der Messung des IC_{50} -Wertes von PPPP nicht um einen *In-vivo*-Versuch handelt wie bei der Messung der Proliferation. Da es sich bei diesem Hemmstoff jedoch um ein Ceramid-Analogon handelt, das seine Wirkung nicht durch eine dauerhafte Modifikation des Enzyms entfaltet, sondern durch temporäre Bindung an die Glukosylceramid-Synthase, kann der IC_{50} -Wert nicht durch die Behandlung der Zellen mit PPPP und anschließender *In-vitro*-Aktivitätsbestimmung ermittelt werden. Die hemmende Wirkung von PPPP geht durch die Aufarbeitung der Proteine verloren. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem IC_{50} -Wert des Inhibitors und den

Konzentrationen, die eine antiproliferative Wirkung verursachen, kann daher auf diese Weise nicht hergestellt werden. Es ist anzunehmen, daß die benötigte Konzentration bei *In-vivo*-Versuchen höher liegt. Hierbei muß zum einen das PPPP von der Zelle aufgenommen werden muß, zum anderen könnten auch noch andere Enzyme aus dem Sphingolipid-Stoffwechsel gehemmt werden.

Die Menge an PPPP, die tatsächlich von der Zelle aufgenommen wird, kann experimentell nur sehr schwer und ungenau bestimmt werden und hängt möglicherweise auch davon ab, wo die Zelle sich in ihrem Zellzyklus befindet. Eine genaue Bestimmung des IC₅₀-Wertes ist daher bei *In-vivo*-Experimenten nicht möglich.

Die „Nebenwirkungen“ des Hemmstoffes auf andere Enzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels führen unter Umständen zu einer Verstärkung der antiproliferativen Wirkung, falls weitere Enzyme gehemmt werden, die für eine Metabolisierung des Ceramids wichtig sind.

1.5 Schlußfolgerungen und Ausblick

Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, daß die Glukosylceramid-Synthase in humanen Mel-HO-Melanomzellen anders reguliert wird als in primären humanen Melanozyten. Die Unterschiede in der Regulation sind dabei jedoch nicht durch die verschiedene Regulierung der Genexpression der Glukosylceramid-Synthase in den beiden Zelltypen erklärbar. Möglicherweise führen Unterschiede in der Stabilität der mRNA zu der erhöhten Proteinexpression und daraus resultierend auch zu der gesteigerten *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase in den Melanomzellen. Interessanterweise führt diese gesteigerte Aktivität nicht zu einer größeren Menge von Glukosylceramid in Mel-HO-Melanomzellen. Die Untersuchung des Glykosphingolipidmusters von normalen humanen Melanozyten und von Mel-HO-Melanomzellen hat gezeigt, daß die Menge an Glukosylceramid in beiden Zelltypen vergleichbar ist. Die Melanomzellen haben jedoch mehr komplexere Glycosphingolipide, vor allem Laktosylceramid und GM3. Beide Lipide kommen jedoch im Vergleich zu anderen Glykosphingolipiden auch in primären Melanozyten in großer Menge vor. Kürzlich wurde gezeigt, daß GM3 und GD3 wichtig für das Melanom sind, um dem Immunsystem zu entkommen (Peguet-Navarro *et al.*, 2003). Der hohe Gehalt an GM3 in den Melanozyten erleichtert daher eventuell die Metastasierung der Zellen.

Durch die schaltbare Überexpression der Glukosylceramid-Synthase in Bro-Melanomzellen habe ich einen Mischklon (MK12) generiert, der eine ca. 1,2-fachen Überexpression des Enzyms auf RNA-Ebene und zu einer etwa 2-fachen Überexpression auf Proteinebene. Auch die *In-vitro*-Aktivität der Glukosylceramid-Synthase ist etwa 2-fach erhöht. Analog zu Mel-HO-Melanomzellen weisen auch MK12-Zellen keine erhöhte Glukosylceramid-Menge auf, im Vergleich zu Kontrollzellen, bei denen die Genexpression der Glukosylceramid-Synthase nicht mit Doxycyclin induziert worden ist. Auch hier wird das gebildete Glukosylceramid zu Laktosylceramid und GM3 weiter umgesetzt. Die Überexpression der Glukosylceramid-Synthase hat zudem keinen Einfluß auf das Apoptoseverhalten der Zellen. Im Gegensatz zu veröffentlichten Daten in MCF-7^{Adr}-Brustkrebszellen führt die Überexpression hier nicht zur Apoptose-Resistenz der Zellen (Cabot *et al.*, 1996). Die Glukosylceramid-Synthase hat also in den von mir untersuchten Mel-HO- und Bro-Melanom-Zellen möglicherweise nicht die gleiche Bedeutung für die Chemotherapie-Resistenz wie in den MCF-7-Zellen. Im Gegensatz zu den Brustkrebszellen findet in den Melanomzellen auch keine Anreicherung von Glukosylceramid in den untersuchten Melanomzellen statt, sondern eine Anreicherung an den komplexeren Glykosphingolipiden Laktosylceramid und GM3. Da vor allem die Ganglioside im Melanom jedoch für die Malignität und das Ausschalten der Immunabwehr wichtig sind, ist die Steigerung der Glukosylceramid-Synthase-Aktivität für das maligne Melanom beim Menschen sicherlich von entscheidender Bedeutung, da es sich hierbei um das Schrittmacherenzym der meisten Ganglioside handelt. (Thurin *et al.*, 1986; Peguet-Navarro *et al.*, 2003). Die von mir erzeugten Klone wiesen eine etwa 2-fach erhöhte Aktivität der Glukosylceramid-Synthase auf. Diese Menge reicht möglicherweise nicht aus, um den anti-apoptotischen Effekt des Glukosylceramides zu vermitteln, da es zu weiteren Glykosphingolipiden umgesetzt werden. Die Herstellung von Glukosylceramid-Synthase überexprimierenden Zellen, die eine stärker Überexpression aufweisen, könnte daher Aufschluß darüber geben, ob eine stärkere Aktivität des Enzyms zur Apoptose-Resistenz der Zellen führt. Eine stärkere Überexpression der Glukosylceramid-Synthase führt vielleicht auch zu einer Akkumulation von Glukosylceramid, wie es in anderen Zellen bereits beschrieben ist (Cabot *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 1999). Sollte es nicht zu einer gesteigerten Glukosylceramid-Menge kommen, könnte die Untersuchung des nachfolgenden Enzyms in der Glykosphingolipid-Biosynthese, der Laktosylceramid-Synthase, zeigen,

ob neben dem Schrittmacherezym der Gangliosidbiosynthese, auch die anderen Enzyme dieses Stoffwechselweges, z.B. durch die vorhandene Substrat-Menge reguliert werden. Es ist nicht auszuschließen, daß eine zusätzliche Steigerung der Glyksphingolipid-Biosynthese in den Melanomzellen auch eine Akkumulation von Glukosylceramid zur Apoptose-Resistenz von Melanomzellen führt. Durch die gesteigerte Biosynthese der Glykosphingolipide verbraucht die Zelle mehr Ceramid, das als Grundgerüst dient. Dieser verstärkte Umsatz des pro-apoptotisch wirkenden Ceramids könnte eine Apoptose-Resistenz in den Melanomzellen vermitteln, da die intrazelluläre Ceramidmenge zu niedrig bleibt, um apoptotisch wirken zu können. Von besonderem Interesse ist auch die Bedeutung von Laktosylceramid und GM3, da diese beiden Lipide auch in primären humanen Melanozyten die Haupt-Glykosphingolipide sind. Die Hemmung der Glukosylceramid-Synthase durch Anti-Sense-Strategien oder den Einsatz von Inhibitoren stellt daher für die Behandlung des malignen Melanoms eine Strategie dar, mit der die Progression des Tumors möglicherweise gehemmt werden kann, indem die Menge an Laktosylceramid und GM3 verringert wird. *N*-Butyldeoxynojirimicin (NB-DNJ), ein Inhibitor der Glukosylceramid-Synthase, befindet sich bereits in der klinischen Erprobung für die Behandlung von Morbus Gaucher, einer Glykosphingolipidose. Dieser Inhibitor könnte also relativ leicht auch für eine Tumor-Therapie verwendet werden, da bereits Patientendaten vorliegen.

Weitere Untersuchungen der Glukosylceramid-Synthase sollten sich auch mit der Regulation des Enzyms befassen, da hier möglicherweise einer der Schlüssel für die Entartung der Melanozyten zum Melanom zu finden ist. Über die Regulation des Enzyms liegen auch in anderen Zellen nur sehr wenige Daten vor. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Behandlung von Nervenzellen mit bFGF zu einer Aktivierung der Glukosylceramid-Synthase führt (Boldin und Futerman, 2000). Untersuchungen, die an Mäusen durchgeführt wurden haben gezeigt, daß hier für die Differenzierung der Haut und die Ausbildung der Haut-Barriere die Aktivität der Glukosylceramid-Synthase von besonderer Bedeutung ist (Chujor *et al.*, 1998). Die genaue Regulation ist bislang jedoch auch hier noch nicht erforscht, ein Einfluß von Wachstumsfaktoren kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Fehlregulation der Glukosylceramid-Synthase könnte daher nicht nur zur Entartung von Melanozyten führen, sondern auch zu anderen Hautkrankheiten führen, bei denen eine gestörte Barrierefunktion vorliegt. Neben dem Einfluß der Glukosylceramid-Synthase auf die Tumorentwicklung und die Differenzierung der Haut, stellt auch die Untersuchung der

komplexeren Glykosphingolipide und ihre Bedeutung für die Zellen. Vor allem die Bedeutung einzelner Ganglioside für die Zellen ist bislang noch nicht geklärt.