

Aus dem Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH

(Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

UV-induzierte Signaltransduktion

in der Haut des Menschen



Habilitationsschrift

zur Erlangung der *Venia legendi* für das Fach

Molekulare Medizin

an der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Dr. rer. nat. Susanne Grether-Beck

Düsseldorf 2005

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung 8
1.1	Aufbau der Haut 8
1.2	UV-Belastung der Haut 9
1.3	Interzelluläres Adhäsionsmolekül als Modell für Signaltransduktion 11
1.4	Stand der Forschung zu Beginn der Arbeit 12
2	Arbeitshypothese, Ziel und Arbeitsprogramm 14
3	Material und Methoden 15
3.1	Material 15
3.2	Zellen 15
3.3	Methoden 16
3.3.1	Isolierung von primären Keratinozyten des Menschen 16
3.3.2	Kultur von primären Keratinozyten 16
3.3.3	Bestrahlung 16
3.3.4	Isolierung von Gesamt-RNS aus Zellkultur 16
3.3.5	RT-PCR 17
3.3.6	Nachweis von ICAM-1 Protein auf der Zelloberfläche 17
3.3.7	Isolierung von Nuklearextrakten 18
3.3.8	Nachweis der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mittels Gelretardierung 18
3.3.9	Transfektion und Reporteranalysen 18
3.3.10	Bestimmung von Ceramiden 18
3.3.11	Bestimmung von Sphingolipiden und Glycosphingolipiden 19
3.3.12	Bestimmung der Sphingomyelinase-Aktivität 19
3.3.13	Bestimmung der Ceramidsynthase-Aktivität 20
3.3.14	Bestimmung der Enzymaktivität von Serin-Palmitoyltransferase 20
3.3.15	Analyse der Liposomen mit HPLC/MS 20
3.3.16	Nachweis von Viabilität und Apoptose 21
3.3.17	Immunfällung und Western Blot 21
3.3.18	Nachweis der Reduktion von Cytochrom C <i>in vitro</i> 21
3.3.19	Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehaltes 22
4	Ergebnisse 23
4.1	Identifizierung des UVA-responsiven Elementes des ICAM-1 Promotors 23
4.2	Singulett-Sauerstoff als „Second-Messenger“ bei der UVA-induzierten Signaltransduktion 26
4.3	Bedeutung der Ceramide für die UVA-induzierte Signaltransduktion 30
4.4	Bedeutung von Singulett-Sauerstoff für die UVA-induzierte Ceramid-Bildung 33
4.5	Ceramid-Bildung in Sphingomyelin-haltigen Liposomen 36
4.6	Wirkung von Ceramiden auf die Mitochondrien 39
4.7	Niedrige Konzentrationen an Ceramiden induzieren Cytochrom C Freisetzung ins Zytoplasma ohne zur Induktion von Apoptose zu führen 41
4.8	Cytochrom C Freisetzung ist notwendig für die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 und die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression 46

4.9	Cytochrom C induzierte Oxidation von AP2 verstärkt seine DNS-Bindungs-fähigkeit	51
4.10	Zeitlicher Verlauf der UVA-induzierten ICAM-1 mRNA Expression und der Ceramid-Bildung	54
4.11	UVA-induzierte Ceramid-Bildung wird durch nicht-enzymatische und enzymatische Mechanismen vermittelt	55
4.12	Die Bedeutung der späten Ceramidantwort in der UVA-induzierten Genexpression	59
4.13	Wirkung von Ceramiden auf die Ceramidsynthese und die Aktivierung von Serin-Palmitoyltransferase	61
4.14	Wirkung von Vitamin E, Ectoin und Cholesterol auf die UVA-induzierte und Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung	63
5	Diskussion	65
5.1	Der Effekt von UVA beruht auf einer AP2-Bindestelle	65
5.2	Die Wirkung des Singulett-sauerstoffs wird durch Deletion der AP2-Bindestelle aufgehoben	67
5.3	Ceramide als „Second Messenger“ in der UVA-induzierten Expression von ICAM-1	68
5.4	Singulett-sauerstoff ist Mediator der UVA-induzierten Ceramid-Bildung	69
5.5	Nicht-enzymatische Ceramid-Bildung	70
5.6	Haben Ceramide bei der Aktivierung von AP2 eine Funktion?	73
5.7	Biphasische Synthese von Ceramid als „Second Messenger“ der UVA-induzierten Genexpression	76
5.8	Ceramid-vermittelter autokriner Ceramidloop als Element der UVA-induzierten Signaltransduktion	77
6	Zusammenfassung	81
7	Literatur	82
8	Danksagung	92
9	Lebenslauf	93

Die dieser Habilitationsschrift zugrunde liegenden Daten wurden in folgenden Arbeiten publiziert:

I. Originalarbeiten

Grether-Beck S, Timmer A, Felsner I, Brenden H, Krutmann J (2005) Solar UVA radiation-induced signaling involves a ceramide-mediated autocrine loop leading to de novo synthesis. *J Invest Dermatol* im Druck

Schieke S, Ruwiedel K, Gers-Barlag H, **Grether-Beck S**, Krutmann J (2005): Molecular crosstalk of the ultraviolet (UV)A and UVB responses at the level of the mitogen-activated protein kinases. *J Invest Dermatol* im Druck

Timmer A, Brammertz D, **Grether-Beck S** (2004): Quantification of signaling ceramides in primary keratinocytes. *Planar Chromatography CSB* 93: 2-4

Warskulat U, Reinen A, **Grether-Beck S**, Krutmann J, Häussinger D (2004): The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in Maintaining Cell homeostasis. *J Invest Dermatol* 123: 516-521

Schieke SM, v Montfort C, Buchzyk D, Timmer A, **Grether-Beck S**, Krutmann J, Holbrook N, Klotz L-O (2004): Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic Res* 38: 729-737

Yamauchi R, Morita A, Yasuda Y, **Grether-Beck S**, Klotz L-O, Tsuji T, Krutmann J (2004): Different susceptibility of malignant versus nonmalignant human T cells toward ultraviolet A-1 radiation-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 122: 477-483

Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Krutmann J (2003): Mitochondrial cytochrome C release mediates ceramide-induced AP-2 activation and gene expression in human cells. *J Biol Chem* 278: 47498-47507

Schieke S, Stege H, Kurten V, **Grether-Beck S**, Sies H, Krutmann J (2002): Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase ½ activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 119: 1323-1329

- Stege H, Budde MA, **Grether-Beck S**, Richard A, Rougier A, Krutmann J (2002): Evaluation of the capacity of sunscreens to protect lupus erythematoses patients by employing the photoprovocation test. *Eur J Dermatol* 12: VII-IX
- Stege H, Budde MA, **Grether-Beck S**, Richard A, Rougier A, Ruzicka T, Krutmann J (2002): Sunscreens with high SPF values are not equivalent in protection from UVA induced polymorphous light eruption. *Eur J Dermatol* 12:IV-VI
- Grether-Beck S**, Bonizzi G, Felsner I, Timmer A, Schmitt-Brenden H, Sies H, Johnson JP, Piette J, Krutmann J (2000): Non-enzymatic triggering of the ceramide signaling cascade by solar ultraviolet A radiation. *EMBO J* 19: 5793-5800
- Stege H, Budde MA, **Grether-Beck S**, Krutmann J (2000): Evaluation of the capacity of sunscreens to photoprotect Lupus erythematosus patients by employing the photoprovocation test. *Photoderm Photoimmunol Photomed* 16: 256-259
- Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, **Grether-Beck S**, Krutmann (2000): Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1790-1795
- Berneburg M, **Grether-Beck S**, Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J (1999): Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 274: 15345-15349
- Ahrens C, Grewe M, Berneburg M, **Grether-Beck S**, Quilliet X, Mezzina M, Sarasin A, Lehmann AR, Arlett CF, Krutmann J (1997): Photocarcinogenesis and inhibition of intercellular adhesion molecule 1 expression in cells of DNA-repair-defective individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6837-6841
- Stege H, Berneburg M, Humke S, Klammer M, Grewe M, **Grether-Beck S**, Boedeker R, Diepgen T, Dierks K, Goerz G, Ruzicka T, Krutmann J (1997): High-dose UVA1 radiation therapy for localized scleroderma [see comments]. *J Am Acad Dermatol* 36: 938-944
- Morita A, Grewe M, **Grether-Beck S**, Olaizola-Horn S, Krutmann J (1997): Induction of proinflammatory cytokines in human epidermoid carcinoma cells by in vitro ultraviolet A1 irradiation. *Photochem Photobiol* 65: 630-635

Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M, **Grether-Beck S**, Ruzicka T, Kapp A, Klotz L-O, Sies H, Krutmann J (1997): Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* 186: 1763-1768

Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Schmitt H, Grewe M, Jahnke A, Johnson JP, Briviba K, Sies H, Krutmann J. (1996): Activation of transcription factor AP2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen- induced expression of the human intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14586-14591

Grether-Beck S, Igloi G, Pust S, Schilz E, Decker K, Brandsch R (1994): Structural analysis and molybdenum dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol Microbiol* 13: 926-936

Grether-Beck S, Oelze J (1987): The development of the photosynthetic apparatus and energy transduction in malate-limited phototrophic cultures of the *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol* 149: 70-75

II. Übersichtsarbeiten

Krutmann J, Mang R, **Grether-Beck S** (2003): Analysis of cytokine profile in human skin. *Methods Mol Biol* 215: 23-27

Krutmann J, **Grether-Beck S** (2002): Ultraviolet A radiation induced signaltransduction in human keratinocytes. In *Biologic effects of light* (MF Holick, ed) Kluver Academic Publishers, Boston, pp 289-296

Grether-Beck S, Krutmann J (2000): Ultraviolet A radiation-induced gene expression in human keratinocytes. *Methods in Enzymology* 319: 280-289

Grether-Beck S, Buettner R, Krutmann J. (1997): Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: Molecular and photobiological mechanisms. *Biol Chem* 378: 1231-1236

III. Patente

Grether-Beck S, Krutmann J (2000): Verwendung von n-Oleoylethanolamin zur Behandlung der Schuppenflechte (Psoriasis). DE-PS 10037046.2-41, Europäisches Patent EP 1 305 016 B1

Grether-Beck S, Krutmann J (2004): Utilization of sterols and their derivatives in cosmetic preparations for UVA protection. Internationale Patentanmeldung WO 03/041675 A3

IV. Buchbeitrag

Mitarbeit an der Übersetzung von Buchkapiteln aus „Molekularbiologie der Zelle“ 4. Auflage (Lothar Jaenicke, Hrg) 2003 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA

DNA und Chromosomen pp221-269

Kontrolle der Genexpression pp433-538

Das Zytoskelett pp1056-1138

V. Preise

Grünenthal-Förderpreis Haut und Umwelt 1998

Heinz Maurer-Preis für Dermatologische Forschung 2002 im Bereich Grundlagenforschung

1 EINLEITUNG

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist mit einem Gewicht von 10 bis 14 kg und einer Oberfläche von etwa zwei Quadratmetern das schwerste und größte Organ des Menschen. Trotz ihrer geringen Dicke von nur wenigen Millimetern erfüllt die Haut so lebenswichtige Funktionen wie die Regulation des Flüssigkeits- und des Wärmehaushaltes. Weitere wichtige Funktionen umfassen den mechanischen Schutz und den Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Druck, Stoß, UV-Strahlen und Schmutz. Die Haut wehrt Krankheitserreger ab und dient als Sinnesorgan zur Wahrnehmung von externen Reizen wie Berührung, Hitze und Kälte.

Die Haut (Cutis) besteht aus der außen liegenden, nur ein Zehntel bis ein Viertel Millimeter dicken Epidermis (Oberhaut) und der darunter liegenden, 2 Millimeter dicken Dermis (Lederhaut, Corium). Die Grenzfläche dazwischen ist durch Papillen stark in der Oberfläche vergrößert und ermöglicht durch zahlreiche Blutkapillaren einen intensiven Stoffaustausch. Hauptbestandteil der Dermis sind proteinoide Bindegewebsfasern, die durch Glycosaminoglycane und Mukopolysaccharide verknüpft sind. Die Dermis, die gegen den inneren Organismus nicht so eindeutig abgegrenzt ist wie nach außen, zeigt mit zunehmender Tiefe einen ansteigenden Anteil an Fettzellen und geht so fast unmerklich in das Unterhautfettgewebe (Subcutis) über. Anhangsgebilde wie Haare und Nägel gehören anatomisch betrachtet zur Epidermis. Abb. 1 zeigt einen schematischen Querschnitt durch die Cutis.

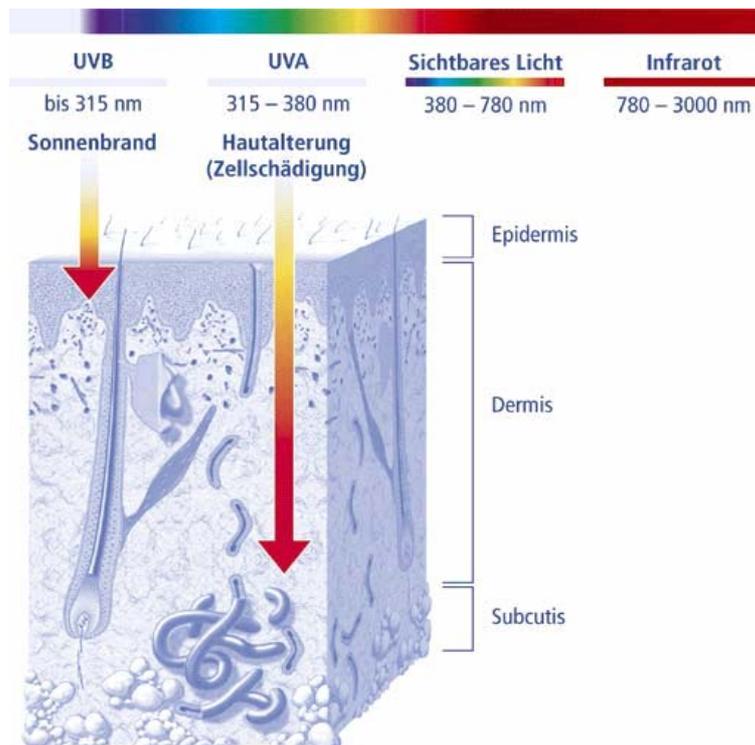


Abb.1: Querschnitt durch die Cutis des Menschen mit dem Penetrationsvermögen von ultravioletter Strahlung

1.2 UV-Belastung der Haut

Zugleich ist auch das Penetrationsvermögen der elektromagnetischen Strahlung im Bereich zwischen kurzwelligem Ultraviolett und langwelligem Infrarot über dem Hautquerschnitt eingezeichnet (Abb. 1). Die ultraviolette Strahlung umfasst mit 4,3 % nur einen kleinen Teil der elektromagnetischen Strahlung, der der Mensch auf der Erde ausgesetzt ist, während sichtbares Licht mit 51,8 % und Infrarot A und B mit 43,9 % zu Buche schlägt (Cobarg, 1995; Hellige *et al.*, 1995; Kochevar *et al.*, 1999). Während das kurzwellige, energiereiche UVC (200-280 nm) von der Ozonschicht in der Stratosphäre vollständig absorbiert wird, können sowohl das UVB (280-315 nm) als auch das UVA (315-400 nm) die schützende Ozonschicht zumindest teilweise durchdringen (de Gruijl, 1999; 2000) und somit die Haut des Menschen erreichen.

Die Strahlenbelastung durch die im Vergleich zur langwelligeren UVA-Strahlung energiereichere UVB-Strahlung wird teilweise durch die Ozonschicht reduziert. Nur etwa 1-10 % der gesamten UV-Belastung auf der Erdoberfläche werden durch UVB-Strahlung verursacht (Matsui & DeLeo, 1995), während mehr als 90 % der Belastung der UVA-Strahlung zuzurechnen sind (Jean *et al.*, 2001). Die Gesamtbelastung durch UV-Strahlen auf der Erdoberfläche variiert in Abhängigkeit von Jahreszeit,

Tageszeit, geografischen Lage und Wettersituation. So beträgt die innerhalb von 1 bis 2 Stunden an einem Sommertag zur Mittagszeit messbare UVA-Dosis zwischen dem 30-35° nördlichen Breitengrad (z. B. Memphis, TN, USA oder New Orleans, LA, USA) 300 KJ/m² (Frederick & Alberts, 1992). In Austin (MN, USA), das auf 43° (40'0'') nördlicher Breite liegt, erzielt man die gleiche Dosis von 300 KJ/m² im August während einer Bestrahlungsdauer von 5 Stunden und 42 Minuten (Bode & Dong, 2003). Die Beobachtung, dass schon relativ geringere UVA-Dosen von 50-200 KJ/m² bei täglicher Bestrahlung über einen Zeitraum von 8 Tagen morphologische Veränderungen in der Haut hervorrufen (Lavker *et al.*, 1995), unterstreicht, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis von 300 KJ/m² UVA von physiologischer Bedeutung für die Gesundheit der Haut des Menschen ist.

Die kurzwellige UVB-Strahlung dringt nur bis in die Basalmembran der Epidermis ein und stellt die Hauptursache für Sonnenbrand (Sonnenerkennung; Coles *et al.*, 1986), DNS-Schädigung (Cyclobutanpyrimidin-Dimere; Ravanat *et al.*, 2001) und die Entstehung von Hautkrebs dar (de Gruijl *et al.*, 2001).

Im Gegensatz dazu dringen die längerwelligen UVA-Strahlen bis tief in das dermale Gewebe und können sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis zu irreversiblen Veränderungen führen, etwa einer Induktion von Schäden an der DNS (8-Oxoguanin; Kielbassa *et al.*, 1997) oder einer vorzeitigen Hautalterung (Krutmann, 2000; 2001). Zudem können phototoxische und photoallergische Reaktionen durch UVA-Strahlen in Kombination mit Arzneimitteln oder Inhaltsstoffen von Pflanzen, Sonnenschutz- oder Pflegeprodukten auftreten (Epstein, 1983; 1999).

Neben der Induktion von DNS-Schäden führen Veränderungen von Signalmolekülen nach UV-Bestrahlung zu einer Veränderung in den Genexpressionsmustern der Hautzellen. Zu Beginn der 90er Jahre wurde angenommen, dass die Prozesse der Signaltransduktion, wie sie bis dahin für UVC-Strahlung eingehend beschrieben worden waren, auch für die anderen, längerwelligen und damit energieärmeren UV-Bereiche Gültigkeit besäßen. Neuere Beobachtungen zeigten allerdings, dass nicht nur verschiedene Dosen und Expositionszeiten zur Induktion der Genexpression in Abhängigkeit von der verwendeten Wellenlänge benötigt werden, sondern sich die zellulären Antworten auf die verschiedenen Wellenlängen unterscheiden. So wurde erst kürzlich eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2, p38 und der Jun N-terminalen Kinase beschrieben (Kabuyama *et al.*, 2001). Ein Großteil der bisherigen Studien wurde unter Verwendung von Quecksilberdampfniederdruck-

lampen mit einem spektralen Emissionsmaximum bei 254 nm (UVC) durchgeführt (Karin & Herrlich, 1989). Die untersuchten Zellen – hauptsächlich Fibroblasten oder Tumorzelllinien – waren bei den eingesetzten Dosen von mehr als 20 J/m² dabei zwar weiterhin metabolisch aktiv aber nicht mehr teilungsfähig.

Die Entdeckung des Ozonloches in der Stratosphäre über der Antarktis 1985 und der damit verbundenen erhöhten Strahlenbelastung durch UVB hatte intensive Forschungsaktivitäten zur Folge. Auch über der Nordhalbkugel wird seit Jahren eine zunehmende Ausdünnung der Ozonschicht beobachtet. Allerdings sind die Ozonverluste von Jahr zu Jahr und auch regional sehr unterschiedlich. Über den mittleren nördlichen Breiten hat die Ozonkonzentration in den letzten 30 Jahren im Mittel um 10 % abgenommen. Am Hohenpeißenberg (Meteorologisches Observatorium, Bayern) liegt der Ozonverlust bei einer Größenordnung von 2 % pro Jahrzehnt (Claude *et al.*, 2003) und im gleichen Zeitraum kommt es zu einem Anstieg der UV-Strahlung um 15 %. Der größte Anstieg erfolgt im Frühjahr, also gerade in der Jahreszeit, in der Menschen und Pflanzen sonnenunbewusst und ohne die natürlichen, noch nicht aktivierten, Schutzmechanismen besonders UV-empfindlich sind (Stroh, 2002).

1.3 Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 als Modell

Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden an primären Keratinozyten aus der Haut des Menschen durchgeführt. Das Studienmodell war die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1). Eine gesteigerte Expression dieses Moleküls auf der Oberfläche epidermaler Keratinozyten ist ein Charakteristikum entzündlicher, UV-responsiver Dermatosen wie z.B. der Psoriasis vulgaris, der atopischen Dermatitis oder dem kutanen T-Zelllymphom (Krutmann *et al.*, 1990). ICAM-1 wirkt als Gegenrezeptor für das auf Leukozyten exprimierte LFA-1 Molekül, und durch LFA1-/ICAM-1 vermittelte Zelladhäsion ist von zentraler Bedeutung für die Ausbildung und Aufrechterhaltung eines entzündlichen Infiltrats in der menschlichen Haut. In gesunder Haut exprimieren Keratinozyten keine oder nur sehr wenige ICAM-1 Moleküle auf ihrer Oberfläche. In entzündlicher Haut kommt es jedoch durch Stimulation der Keratinozyten mit proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IFN- γ , TNF- α oder TNF- β zu einer Induktion der Expression ICAM-1-spezifischer mRNA und der ICAM-1 Proteinexpression. In zwei unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass die zytokininduzierte ICAM-1 Expression durch eine Bestrahlung der

Keratinocyten mit sublethalen Dosen von UVB- aber auch von UVA1-Strahlung (340-400 nm) gehemmt werden konnte (Krutmann, 1994; Norris *et al.*, 1990). Analoge Befunde konnten auch *in vivo* erhoben werden. So ließ sich die durch intrakutane Interferon- γ -Injektion induzierte Keratinocyten-ICAM-1-Expression in menschlicher Haut durch eine vorhergehende Bestrahlung mit therapeutisch relevanten UVB-Dosen auf der mRNA- und der Proteinebene hemmen (Roza *et al.*, 1996; Stege *et al.*, 1996). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte nur dann eine Hemmung der ICAM-1-Expression beobachtet werden, wenn die Bestrahlung vor Zytokinstimulation durchgeführt wurde. Zudem zeigte sich, dass die UVB-induzierte Hemmung der ICAM-1-Induzierbarkeit in diesen Zellen von transientser Natur war, da 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit UVB die ICAM-1 mRNA- und Proteinexpression sowohl in kultivierten Keratinocyten (Khan *et al.*, 1993) als auch in UV-bestrahlter Haut deutlich aufreguliert werden konnte (Krutmann & Grewe, 1995; Stege *et al.*, 2000). Da eine erneut durchgeführte UVB-Bestrahlung mit einer Reinduktion der Hemmung der ICAM-1-Induzierbarkeit einherging, weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass zur Erzielung eines optimalen antientzündlichen Effektes repetitive UVB-Bestrahlungen erforderlich sind. Die diesem antientzündlichen Effekt zugrunde liegenden Mechanismen sind z. Z. noch weitestgehend unbekannt. Da die Hemmung der zytokininduzierten ICAM-1-Expression nicht von der Natur des verwendeten Zytokins abhängt (Khan *et al.*, 1993), handelt es sich vermutlich nicht um die Modulation der durch ein spezifisches Zytokin hervorgerufenen Signaltransduktionskette, sondern sehr wahrscheinlich um einen universell die transkriptionelle Regulation induzierbarer Gene betreffenden Mechanismus.

Bestimmte phototherapeutisch relevante immunmodulatorische Effekte, z.B die Induktion von IL-10 oder die Hemmung der Zytokin-vermittelten ICAM-1 Expression, können sowohl durch UVB- als auch durch UVA1-Strahlung ausgelöst werden (Krutmann *et al.*, 1992). Verschiedene Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass die hierfür verantwortlichen photobiologischen Mechanismen sich grundlegend unterscheiden. So sind für UVB-induzierte immunmodulatorische Effekte, ähnlich wie für UVB-induzierte antiproliferative Effekte, die Induktion von DNS-Schäden, insbesondere die Ausbildung von Thymindimeren, ursächlich verantwortlich (Roza *et al.*, 1996; Stege *et al.*, 2000). Hier konnte gezeigt werden, dass die nach UVB-Bestrahlung menschlicher Haut zu beobachtende Hemmung der durch IFN- γ -Stimulation induzierte ICAM-1 Expression in Keratinocyten mit der Bildung von

Thymindimeren in der DNS dieser Zellen einhergeht. Durch topische Applikation eines in Liposome eingeschlossenen DNS-Reparaturenzyms war es möglich, nicht nur die Zahl der UVB-induzierten Thymindimere in der bestrahlten Haut zu reduzieren, sondern auch die Hemmung der Induzierung von ICAM-1 aufzuheben (Stege *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu beruhen UVA-, und zwar insbesondere UVA1-induzierte immunmodulatorische Effekte primär auf oxidativen Mechanismen (Krutmann *et al.*, 1992). Hierbei kommt nach bisherigen Untersuchungen vor allem der Generation von Singulett-Sauerstoff - wie für die UVA1-induzierte Expression der Kollagenase I in dermalen Fibroblasten gezeigt (Wlaschek *et al.*, 1995) - eine herausragende Rolle zu.

1.4 Stand der Forschung zu Beginn der Arbeit

Neben der Induktion von DNS-Schäden - insbesondere Thymindimeren - wurde zu Beginn dieser Arbeiten auch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, die Stabilisierung von p53 und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie AP1 oder NF κ B als Elemente von UVC- und/oder UVB-induzierten Signaltransduktionskaskaden diskutiert (Schreck *et al.*, 1992; Herrlich *et al.*, 1994; Holbrook & Fornace, 1994; Herrlich *et al.*, 1997). Zudem konnte in enukleierten Zellen sowohl für UVB (Devary *et al.*, 1993) als auch für UVA (Vile *et al.*, 1995) eine Aktivierung von NF κ B im Zytosol nachgewiesen werden.

2 ARBEITSHYPOTHESE, ZIEL UND ARBEITSPROGRAMM

Die im folgenden ausgeführte Arbeitshypothese basierte auf der Beobachtung, dass die UVA-induzierte Signaltransduktion in epidermalen Keratinozyten sich deutlich von der Signaltransduktion nach Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht unterscheidet. So konnte für die Transkriptionsfaktoren AP1 - am Beispiel der Kollagenase I - und NF κ B eine herausragende Bedeutung für die UVC- und UVB-induzierte Genexpression nachgewiesen werden (Herrlich *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu gab es zu Beginn dieser Untersuchungen keine Hinweise darauf, auf welchen Mechanismen die UVA-induzierte Genexpression basiert.

Ziel der Arbeit ist es daher, die der UVA-induzierten Signaltransduktionskaskade zugrunde liegenden Mechanismen in den epidermalen Keratinozyten der Haut des Menschen am Modell der Induktion des Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) zu charakterisieren und Strategien zu entwickeln, die es erlauben, unerwünschte Effekte von UVA-Strahlung auf die Haut zu unterbinden.

Im Einzelnen wurden folgende Schwerpunkte erarbeitet:

- Identifizierung des UVA-responsiven Elements in der Promoter-Region des Gens für den Entzündungsmarker ICAM-1 und Charakterisierung der an der Induktion der Genexpression beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies
- Charakterisierung daran beteiligter sekundärer Botenstoffe in der Zellmembran
- Bedeutung der Cytochrom C Freisetzung bei der Ceramid-induzierten Signaltransduktion für die Aktivierung von Transkriptionsfaktor AP2
- Funktionelle Bedeutung des zweiten Ceramidanstiegs für die biphasische Genexpression

3 MATERIALIEN & METHODEN

3.1 Material

Die Zellkulturmedien und Penicillin/Streptomycin wurden von Biochrom (Berlin) oder Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Diverse Hemmstoffe wie Vitamin E (α -Tocopherylsuccinat), Rotenon, Thenoyltrifluoroacetone, Antimycin A, und Lipide wie Cholesterol wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Verbindungen wie C2- und C6-Ceramide, Sphingomyelin, Ganglioside wie GM1, Bonkrekinsäure, Carboxyatractylosid, Camptothecin, n-Oleoylethanolamin und Natriumazid wurden von Merck Biosciences (Bad Soden) geordert. MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid wurde von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Proteinaseinhibitoren wurden als Cocktail zugesetzt (Complete, Boehringer, Mannheim, Deutschland).

Singulett-Sauerstoff wurde durch thermischen Zerfall des Endoperoxids des Dinatriumsalzes von 3,3'-(1,4-Naphthyliden-)dipropionat (NDPO₂) bei 37°C in einer Dunkelreaktion erzeugt. NDPO₂ stand freundlicherweise durch Kooperation mit dem Teilprojekt B1 im SFB 503 (Prof. Dr. H. Sies) zur Verfügung. Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von Operon Biotechnologies GmbH (Köln) synthetisiert. Zytokine wie Interferon- γ , IL-1 α und TNF- α wurden von R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bezogen. Liposomen wurden von der Firma AGI Dermatics (Freeport, NY, USA) unter Verwendung von Lipiden der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) hergestellt. Radiochemikalien wurden von Amersham Buchler (Freiburg, Deutschland) geliefert.

Sämtliche Chemikalien waren für Zellkultur getestet oder entsprachen der höchsten kommerziell erhältlichen Reinheit.

3.2 Zellen

Die folgenden Zelllinien wurden von der American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen:

Epidermoide Ösophaguszellen KB

HeLa-Zellen

monoplastische Leukämiezellen U937.

Osteosarcoma-Zellen rho0 (Chomyn *et al.*, 1992), die durch Behandlung mit Ethidiumbromid- für mitochondriale DNS depletierte wurden, wurden freundlicherweise von G. Hofhaus (Institut für Biochemie, HHU Düsseldorf) und transformierte embryonale Nierenzellen 293 (Graham *et al.*, 1977) von J. P. Johnson (Immunologie, LMU München) zur Verfügung gestellt. Primäre Keratinozyten und Fibroblasten des Menschen wurden aus bei Zirkumzisionen gewonnenem Vorhautmaterial präpariert.

3.3 Methoden

3.3.1 Isolierung von primären Keratinozyten des Menschen

Die Präparation der Keratinozyten und Fibroblasten erfolgte nach allgemein bekannten Standardbedingungen (Übersichtsarbeiten dazu: Karasek 1983; Fusenig, 1986; Fuchs *et al.*, 1988).

3.3.2 Kultur von primären Keratinozyten

Die Keratinozyten wurden nach der Isolierung unter Verwendung der o.g. Standardprozeduren in serumfreiem Keratinozytenmedium (Biochrom und Invitrogen) auf Plastikschalen ohne Biomatrices bis zur 5. Passage kultiviert.

3.3.3 Bestrahlung der Keratinozyten

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in Phosphat-gepuffertes Salzlösung (PBS), um die in Folge der Photooxidation von Tryptophan durch Riboflavin erzeugte zusätzliche Belastung mit H₂O₂ zu vermeiden (Mahns *et al.*, 2003). Als UVA-Quelle fand eine Ganzkörperliege Sellas 24.000 (System Dr. Sellmeier, Sellas GmbH, Gevelsberg, Deutschland) Verwendung. Die Bestimmung der Bestrahlungsdosis erfolgte unter Nutzung des UVAMETER Typ II (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland). Die Bestrahlungsstärke betrug 150 mW/cm² UVA1 bei einem Abstand zwischen UV-Röhre und Bestrahlungsgut von 30 cm (Grether-Beck *et al.*, 1996; Grether-Beck *et al.*, 2000). Zur Bestrahlung mit UVB wurde ein Eigenbau mit 4 Röhren des Typs Philips TL 20W/12RS (Philips Licht, Hamburg, Deutschland) benutzt. Die Strahlendosis wurde mit einem IL-1700 Forschungsradiometer und einem SEE 240 UVB Photodetektor (International Light, Newburyport, MA, USA) bei einer Bestrahlungsstärke von 24x10⁻⁵ W/cm² bei einem Abstand zwischen UVB-Röhre und Bestrahlungsgut von 20 cm ermittelt (Grewe *et al.*, 1995).

3.3.4 Isolierung von Gesamt-RNS aus Zellkultur

Gesamt-RNS wurde mittels eines Chromatographieverfahrens (RNeasy Total RNA KIT; Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Nach photometrischer Quantifizierung der

RNS mit dem Eppendorf Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde unter Einsatz von 100 ng RNS eine cDNS-Synthese unter Verwendung von einem GeneAMP RNA[®] Core Kit (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

3.3.5 RT-PCR

Die Expression von ICAM-1 wurde entweder mit konventioneller PCR und anschließender Quantifizierung per Ionenaustauschchromatographie (Ahrens *et al.*, 1997) oder per Real-Time PCR in einem Opticon1 System (MJ Research, Waltham, MA, USA) unter Verwendung von SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Als Referenzgen diente ein unter den Versuchsbedingungen konstant exprimiertes Haushaltsgen wie β -Actin.

Gen	Sequenz	Referenz
ICAM-1	5'-TGACCAGCCCAAGTTGTTGG-3' ^a	Staunton <i>et al.</i> , 1988
	5'-ATCTCTCCTCACCAGCACCG-3' ^a	
	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3' ^b	
	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' ^b	
SPTLC1	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA-3' ^b	Weiss & Stoffel, 1997
	5'-TGTTCACCGTGACCACAAC-3' ^b	
SPTLC2	5'-AGCCGCCAAAGTCCTTGAG-3' ^b	Weiss & Stoffel, 1997
	5'-CTTGTCCAGGTTTCCAATTTCC-3' ^b	
β -Actin	5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' ^a	Vandekerckhove & Weber, 1978; Ponte <i>et al.</i> , 1984
	5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG-3' ^a	
	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3' ^b	
	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' ^b	

Tabelle 3.1: Für die Bestimmung der Genexpression eingesetzte Primer:

^aPrimersequenzen für konventionelle PCR wurden mit PC/Gene[®] (Intelligenetics Inc, Mountain View, CA, USA) generiert, ^bPrimersequenzen für Real-Time PCR wurden mit Primer Express[™] 2.0 Software (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) generiert.

Die Quantifizierung der konventionellen RT-PCR erfolgte mittels HPLC durch Ionenaustauschchromatografie in Verbindung mit einem on-line UV-Spektrometer bei A₂₆₀ (Henninger *et al.*, 1993; Ahrens *et al.*, 1997). Die relative Quantifizierung der Real-Time PCR erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ – Methode (Livak & Schmittgen, 2001).

3.3.6 Nachweis von ICAM-1 Protein auf der Zelloberfläche

Die Oberflächenexpression von ICAM-1 auf den Keratinozyten wurde mittels Immunfluoreszenz in einem FACScan[™]II Flow Cytometer (BD PharMingen,

Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung von anti-ICAM-1 monoklonaler Antikörper 84H10 (Dianova, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen.

3.3.7 Isolierung von Nuklearextrakten

Nuklearextrakte wurden nach dem Protokoll von Dignam *et al.* (1983) isoliert.

3.3.8 Nachweise der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren mittels Gelretardierungsexperimenten

Die isolierten Nuklearextrakte wurden nach Inkubation mit der radioaktiv markierten Sonde, die die Konsensus-Sequenz für die AP2 Bindestelle aus dem ICAM-1 Promotor - 5-`GACCCTCTCGGCCCGGGCACCT-3` (Stade *et al.*, 1990) - trägt, auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.3.9 Transfektionen und Reporteranalysen

Transiente Transfektionen wurden durch Verwendung des Polykations Polybrene vermittelt (Jiang *et al.*, 1991). Reportergenkonstrukte mit verschiedenen großen Deletionen innerhalb des ICAM-1 Promotors basierend auf dem Reportergen Luziferase wurden von JP Johnson (Immunologie, LMU München) zur Verfügung gestellt (Stade *et al.*, 1990; van der Stolpe *et al.*, 1994). Zum Nachweis der Reportergenaktivität wurde ein kommerziell erhältliches Luziferase-Reportergensystem (Serva, Heidelberg, Deutschland) benutzt. Die Reportergenaktivität wurde als relative spezifische Aktivität basierend auf dem Proteingehalt (Bradford, 1976) als Vielfaches der Aktivität von transient transfizierten aber unbestrahlten Zellen angegeben. Als Kontrolle für die Effizienz der Transfektion wurde standardmäßig eine Kontrolltransfektion mit dem β -Galactosidase-Reportergensystem (Serva, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

3.3.10 Bestimmung von Ceramiden

Zu Beginn der Studien wurde die Ceramidbestimmung nach einer über 3 Tage erfolgten metabolischen Markierung der zu untersuchenden Zellen mit [³H] Palmitinsäure konventionell über Dünnschichtchromatographie im Glastank durchgeführt. Hierzu wurde Zellmaterial basierend auf 500 μ g Protein einer Lipidextraktion nach Folch (1957) unterzogen: Nach einer milden alkalischen Hydrolyse erfolgte die Auftrennung des verbliebenen, in Chloroform/Methanol (2:1; V/V) gelösten Lipidextraktes auf analytischen Dünnschichtplatten (Kieselgel) in 2 sukzessiven Läufen mit den Lösungsmittelgemischen Chloroform/Methanol/H₂O (100:42:6, V/V) und Chloroform/Methanol/Essigsäure (94:1:5, V/V). Zur Identifizierung der Ceramide wurden kommerzielle Ceramidstandards (Sigma,

Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Die Lipidflecken wurden mittels einer unspezifischen Jodfärbung sichtbar gemacht, ausgekratzt und mit Flüssigszintillationsmessung quantifiziert.

Für die absolute Quantifizierung von Ceramiden und Sphingomyelin wurden die Lipidextrakte auf 20 x 10 cm 60F254s Kieselgelplatten (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit dem Probenautomaten II (CAMAG; Berlin, Deutschland) automatisiert aufgetragen. Die dünnschichtchromatographische Trennung erfolgte über das automatisierten Stufenentwicklungsverfahren (Automated Multiple Development = AMD) in AMD2-Trennkammern der Firma CAMAG (CAMAG; Berlin, Deutschland) in einem 7 Stufen umfassenden Lösungsmittelgradienten mit Methanol/Dichlormethan/n-Hexan (V/V/V: 100/0/0; 10/90/0, 9/91/0; 8/92/0; 3/97/0; 2/98/0; 0/0/100). Für die Quantifizierung wurde eine postchromatographische Derivatisierung mit Manganchloridlösung in einer CAMAG Chromatogramm Immersionstauchkammer III angeschlossen. Die bläulichen Banden wurden mit dem TLC Scanner III unter Verwendung der CATS Software 4.06 bei 550 nm densitometrisch mit einer Kalibrierungskurve, die 4 Standardproben (Peakhöhe) von 50-1000 ng umfasste, ausgewertet.

3.3.11 Bestimmung von Sphingolipiden und Glycosphingolipiden

Sphingolipide und Glycosphingolipide wurden mit dem oben beschriebenen automatisierten Stufenentwicklungsverfahren aufgetrennt. Der Gradient bestand hierbei aus 19 Stufen unter Verwendung der Lösungsmittel Methanol /Dichlormethan/n-Hexan (V/V/V): 100/0/0; 80/20/0; 78/22/0; 74/24/0; 69/31/0; 62/38/0; 54/46/0; 47/53/0; 40/60/0; 33/67/0; 25/75/0; 18/82/0; 11/89/0; 7/93/0; 4/96/0; 2/98/0; 1/99/0; 0/100/0; 0/0/100).

Für die Isolierung der hydrophilen Glycosphingolipide wurde die wässrige Phase der Extraktion nach Folch (1957) über ein Säulenchromatographieverfahren unter Verwendung von Oasis HLB Extraktionssäulen (Waters GmbH, Eschborn, Germany) nach dem Protokoll des Herstellers aufgetrennt und mit Chloroform/Methanol (2:1, V/V) eluiert.

3.3.12 Bestimmung der Sphingomyelinase Aktivität

Zur Bestimmung der sauren Sphingomyelinase Aktivität wurden Proteinextrakte der zu testenden Zellen mit Proteinase-Inhibitorcocktail (Complete, Boehringer, Mannheim, Deutschland) versetzt. Zellysate (100 µg Protein) wurden für 1 h bei

37°C in einem Puffer aus 250 mM Natriumacetat (pH 5,0), 1 mM EDTA und 0,2 mCi/ml [Cholinmethyl-¹⁴C] Sphingomyelin inkubiert.

Zur Bestimmung der neutralen Sphingomyelinase Aktivität wurden Proteinextrakte für 2 h bei 37°C in einem Puffer aus HEPES (pH 7,4), 1 mM MgCl₂ und 0,2 mCi/ml [Cholinmethyl-¹⁴C] Sphingomyelin inkubiert. Das freigesetzte radioaktive Phosphocholin wurde mit 2:1 (V/V) Chloroform/Methanol extrahiert und mittels Flüssigszintillationsmessung quantifiziert (Bose *et al.*, 1995; Mansat *et al.*, 1997).

3.3.13 Bestimmung der Ceramidsynthase-Aktivität

Die Aktivität der Ceramidsynthase wurde aus mikrosomalen Membranfraktionen, die mit dem Protokoll von Liu (1994) isoliert wurden, nach Harel & Futerman (1993) bestimmt.

3.3.14 Bestimmung der Enzymaktivität von Serin-Palmitoyltransferase

Die Enzymaktivität von Serin-Palmitoyltransferase wurde aus mikrosomalen Extrakten (Grether-Beck *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1994) nach einem von Williams *et al.* (1984) und Dickson *et al.* (2000) beschriebenen Protokoll bestimmt. Hierbei macht man sich zunutze, dass das wasserlösliche Substrat Serin (L-[3-¹⁴C]) in ein lipidlösliches Produkt 3-Ketosphinganin umgesetzt wird, welches sich leicht durch eine Extraktion nach Folch (1957) abtrennen lässt. Dies erlaubt die Produktbestimmung durch Flüssigszintillationsmessung ohne weitere Reinigungsschritte.

3.3.15 Analyse der Liposomen mit HPLC/MS

Zum Nachweis der nicht-enzymatischen Hydrolyse durch UVA-Bestrahlung wurden die von AGI Dermatics (Freeport, NY, USA) aus Sphingomyelin des Eidotters (Fettsäurezusammensetzung: C2 5,6%; C16 83,9%; C18 6,3%; C24 4,2%) hergestellten Liposomen nach der Behandlung mit PBS gewaschen, mit Ultraschall aufgebrochen und einer Extraktion nach Folch (1957) unterzogen. Die untere Phase wurde mit Chloroform/Methanol/H₂O (3:48:47; V/V/V) gewaschen und unter N₂-Schutzgas eingedampft. Die Extrakte wurden in Chloroform/Methanol gelöst und über eine Chromcart 125/2 Nucleosil 100-5 C₁₈AB Säule (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) mittels HPLC aufgetrennt. Eine massenspektroskopische Analyse wurde mit dem Quattro Tandemmassenspektrometer (Micromass, Elstree, Großbritannien) mit internen Standards für C2-, C16-, C18- und C24-Ceramide durchgeführt.

3.3.16 Nachweis von Viabilität und Apoptose

Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde mit dem MTT-Test kolorimetrisch nachgewiesen (Mosmann, 1983). Die Bildung blauer Formazankristalle aus dem gelblichen Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) infolge der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen wurde mit einem Mikroplattenlesegerät (Labsystems, Global Medical Instruments Inc, Albertsville, MI, USA) bei 550 nm gemessen (Knaapen *et al.*, 2002).

Die nukleosomale Fragmentierung wurde mit dem Cell Death Detection ELISA^{plus} (Roche Applied Science) bestimmt. Aktivierung von Caspase 3 wurde fluorimetrisch mit einem Enzymtest (FIENA, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) analysiert. Caspase 8 und 9 wurden mittels der kolorimetrischen Aktivitätstests von R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) gemessen.

3.3.17 Immunfällung und Western Blot

Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol wurde in Zellextrakten, die nach dem Verfahren von Dignam (1983) isoliert wurden, untersucht. Die isolierte cytosolische Fraktion wurde darauf hin überprüft, ob bei der Fraktionierung die Mitochondrien beschädigt worden waren. Hierzu wurde in einem Western Blot die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein des mitochondrialen Markers Cytochrom C Oxidase (Capaldi *et al.*, 1995) als spezifische Bande mit der Größe 18 kDa (Taanman *et al.*, 1996) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Klon 12C4 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) kontrolliert. Zum Nachweis von Cytochrom C wurde eine Immunfällung (Bonifacino *et al.*, 2001) mit dem monoklonalen Maus-anti-human-Cytochrom C Antikörper (MAB898; R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Das Immunpräzipitat wurde auf einem SDS Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit dem anti-Holocytochrom C-Antikörper (Klon 2CYTC-199, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) identifiziert.

3.3.18 Nachweis der Reduktion von Cytochrom C in vitro

Die Oxidation von AP-2 durch Cytochrom C (Pferdeherz, Reinheit 95%, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde *in vitro* mittels Messung der Absorptionsänderung bei A_{550} mit einem DU-70 Spektrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) bestimmt (Ghafourifar *et al.*, 1999). 10 μ M Cytochrom C Lösung in 0,1 M HEPES, pH 7,0 (Fisher *et al.*, 1973) wurde in Gegenwart oder Abwesenheit von steigenden Mengen des rekombinanten humanen

Transkriptionsfaktors AP-2 (Promega, Heidelberg, Deutschland) oder von Rinderserumalbumin (Qualitätsgrad: Molekularbiologie) inkubiert. Die Berechnung der Menge an reduziertem Cytochrom C erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Verwendung eines Extinktionsfaktors von $19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei 550-540 nm (Dutton *et al.*, 1975).

3.3.19 Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehaltes

Für die Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehaltes wurde der 5,5'-dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)glutathiondisulfid (GSSG) Reduktase Recyclingtest für GSSG (Sacchetta *et al.*, 1986) verwendet.

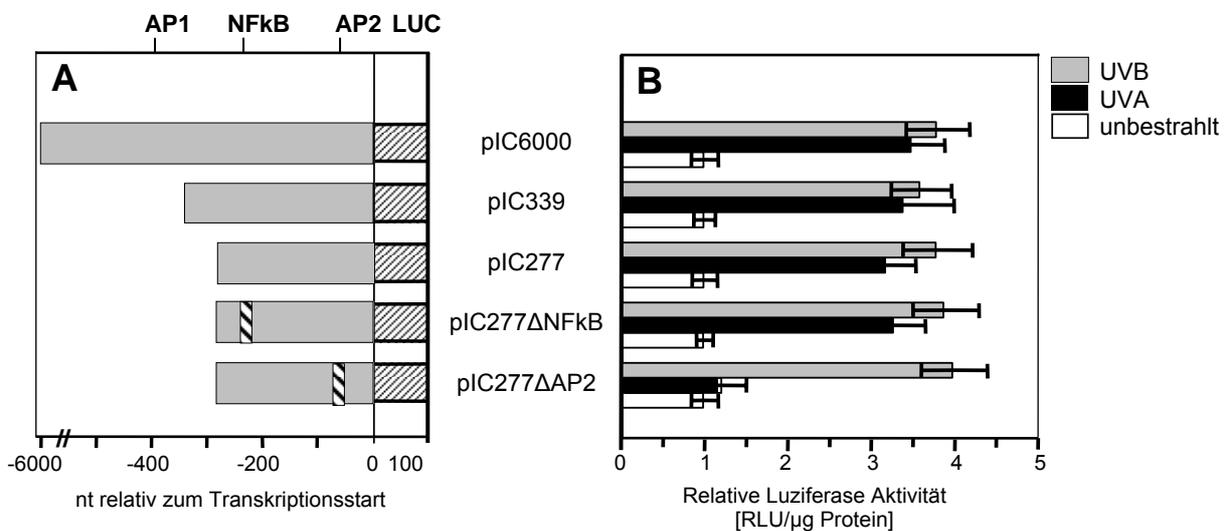
4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung des UVA-responsiven Elements des ICAM-1 Promotors

Es war bekannt, dass Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (UVB) als Folge der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie etwa AP1 oder NFκB zu einer erhöhten Genexpression führt (Karin und Herrlich, 1989). Im Gegensatz dazu waren die Mechanismen, die zu einer durch UVA induzierten Genexpression führen, bisher wenig verstanden.

Zur Identifizierung eines UVA-responsiven Elementes innerhalb des ICAM-1 Promotors wurden Reportergenkonstrukte entworfen, die vor der für Luziferase codierenden Sequenz Teile des ICAM-1 Promotors aus dem Bereich zwischen -6000 und -277 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart enthielten (Abb. 4.1A).

Abbildung 4.1: Promotorkonstrukte und ihre UV-induzierte Aktivität



A Die auf dem ICAM-1 Promotor basierende Reportergenkonstrukte enthalten die Region zwischen -6000, -339 bzw. -277 und dem Transkriptionsstart mit putativen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie AP1, NFκB und AP2. Die Deletionen in den Konstrukten pIC277ΔNFκB und pIC277ΔAP2 sind schraffiert wiedergegeben.

B Reportergenaktivität nach transien-ter Transfektion in 293-Zellen und Bestrahlung mit UVA oder UVB im Vergleich zu transfizierten, aber nicht bestrahlten Zellen.

Die Konstrukte enthalten Bereiche des ICAM-1 Promotors, die etliche Konsensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren aufweisen. Mit diesen Konstrukten wurden transformierte Nierenzellen der Linie 293 transient transfiziert. Anschlie-

ßend wurde die UV-induzierte Reporterogenaktivität als relative spezifische Aktivität bezogen auf die ebenfalls transient transfizierte, aber nicht bestrahlte Kontrolle gemessen (Abb. 4.1B).

Wie aus der Aktivierung des Reportergens ersichtlich ist, wirken die identifizierten Konsensussequenzen *in vivo* als Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Bestrahlung sowohl mit UVA als auch UVB führte in den mit den Konstrukten pIC6000, pIC339, pIC277 oder pIC277 Δ NFKB transient transfiziert Zellen zur Induktion von Reporterogenaktivität. Hingegen führte die Deletion der AP2-Bindestelle im Konstrukt pIC277 Δ AP2 nach transients Transfektion in 293-Zellen zum Verlust der UVA-induzierten Reporterogenaktivität, während die durch UVB induzierte Aktivität voll erhalten blieb. Eine Deletion des Bereiches, der eine Konsensussequenz für eine NFKB-Bindestelle trug, führte dagegen weder zu einem Verlust der UVA-induzierten noch der UVB-induzierten Reporterogenaktivität.

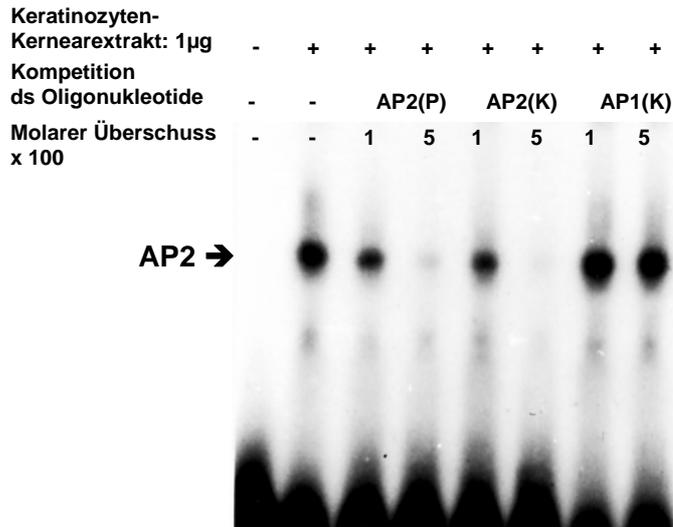
Identische Ergebnisse wurden nach transients Transfektion primärer humaner Keratinozyten mit den Konstrukten pIC277, pIC277 Δ NFKB und pIC277 Δ AP2 erzielt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Aktivierung der auf dem ICAM-1 Promotor basierenden Reporterogenaktivität in normalen humanen Keratinozyten nach transients Transfektion und Bestrahlung mit UVA oder UVB im Vergleich zu transfizierten, aber unbestrahlten Kontrollzellen.

Exposition	Relative spez. Luziferase-Aktivität [RLU/ μ g Protein]	
	pIC277 Δ NFKB	pIC277 Δ AP2
Kontrolle	1,0 \pm 0,12	1,0 \pm 0,15
UVA (30 J/cm ²)	3,1 \pm 0,58	1,3 \pm 0,26
UVB (100 J/m ²)	2,8 \pm 0,28	3,4 \pm 0,40

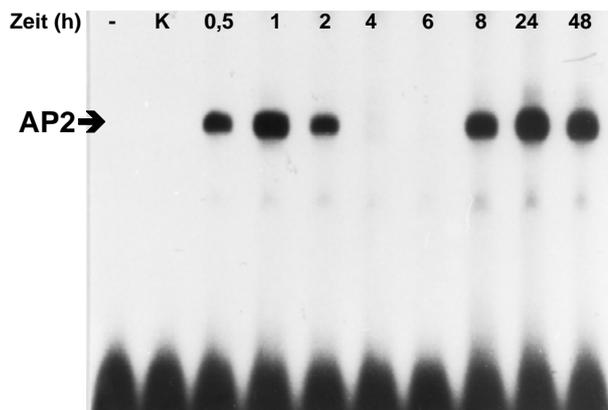
Um die funktionelle Bedeutung der vermuteten AP2-Bindestelle für die UVA-Antwort in den Keratinozyten zu testen, wurden die Zellen nach UVA-Bestrahlung auf die Aktivierung von AP2 untersucht (Abb. 4.2A). Hierzu wurden aus primären Keratinozyten 2 Stunden nach UVA-Bestrahlung Kernextrakte gewonnen und durch Gelretardierung auf das Vorhandensein von Proteinen überprüft, die an die AP2-Sequenz spezifisch binden. In UVA-bestrahlten Zellen konnte ein Protein nachgewiesen werden, das in der Lage ist, an ein synthetisches doppelsträngi-

Abbildung 4.2: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung von AP2 in Kernextrakten UVA-bestrahlter (30 J/cm^2) Keratinozyten und UVA-induzierte ICAM-1 mRNA Expression

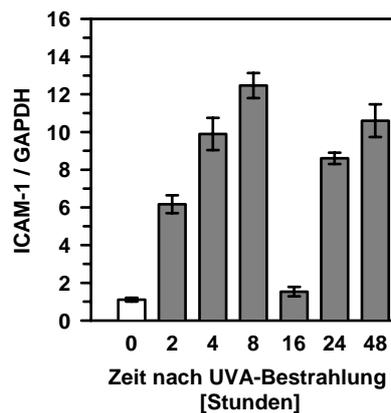


A Spezifität des ICAM-1 Promotor-Konstrukts für AP2

Die kompetitierenden Oligonukleotide enthielten Sequenzen gemäß des ICAM-1 Promotors (P); der AP2-Konsensus-Sequenz des SV40 (K); oder einer Konsensussequenz für AP1 (AP1).



B Zeitlicher Verlauf der durch UVA-Bestrahlung (30 J/cm^2) induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 in primären Keratinozyten. Die Kontrolle (K) waren unbestrahlte, transfizierte Zellen; (-) ist das freie Oligonukleotid.



C Zeitlicher Verlauf der UVA-induzierten Expression der ICAM-1 mRNA in primären Keratinozyten nach Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA.

Die Expressionswerte in unbestrahlten Keratinozyten sind als Zeitpunkt 0 genommen. Alle Daten sind als \pm SD der relativen Expression der ICAM-1 mRNA, bezogen auf das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), angegeben.

ges Oligonukleotid mit der AP2-Sequenz des ICAM-1 Promotors (AP2P) zu binden. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn statt der AP2-Sequenz des ICAM-1 Promotors eine Konsensussequenz aus dem SV 40-Promotor verwendet wurde (AP2K). Durch 100- bis 500-fachen Überschuss nicht-radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotids (AP2P oder AP2K) konnte die radioaktive Sonde (AP2P) spezifisch verdrängt werden. Dies gelang nicht, wenn zur Kompetition eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor AP1 verwendet wurde.

Der zeitliche Verlauf der UVA-induzierten Aktivierung von AP2 wurde in einem Rahmen zwischen 30 Minuten und 48 Stunden verfolgt (Abb. 4.2B). Kernextrakte wurden von primärer Keratinozyten bereitet, die zu den angegebenen Zeitpunkten nach UVA-Bestrahlung geerntet wurden und wie oben beschrieben auf ihre Fähigkeit untersucht, das AP2-Oligonukleotid zu binden. Dabei wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass die UVA-induzierte Aktivierung von AP2 einen biphasischen Verlauf zeigt, wobei einem ersten frühen Maximum zwischen 30 Minuten und 2 Stunden ein zweiter, später Anstieg zwischen 8 und 48 Stunden nach der UVA-Bestrahlung folgt (Abb. 4.2B). Ein ähnliches biphasisches Aktivierungsmuster wurde auch beobachtet, wenn die UVA-induzierte Expression von ICAM-1 mRNA analysiert wurde. Auf der Ebene der mRNA zeigte sich das erste, frühe Maximum zwischen 4 und 8 Stunden nach Bestrahlung und der zweite, spätere Anstieg erfolgte nach 24 Stunden (Abb. 4.2C).

4.2 Singulett-Sauerstoff als Second-Messenger bei der UVA-induzierten Signaltransduktion

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff hat bei der UVA-induzierten Expression einiger Gene eine Schlüsselfunktion. Dies konnte für die Hämoxygenase (Basu-Modak *et al.*, 1993) sowie für die interstitiellen Kollagenase des Menschen (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Wlaschek *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte daher die Frage geklärt werden, ob Singulett-Sauerstoff auch bei der beobachteten UVA-induzierten Expression von ICAM-1 in Keratinozyten eine wichtige Funktion inne hat. Dazu wurde die UVA-induzierte Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Keratinozyten gemessen. Die nachfolgenden Experimente wurden in Gegenwart von Reagenzien (Kaiser *et al.*, 1990) durch-

geführt, die Singulett-Sauerstoff quenchen (Natriumazid, Vitamin E) oder seinen Effekt verstärken (Deuteriumoxid). Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Oberflächenexpression von ICAM-1 wurde 24 Stunden nach Bestrahlung untersucht. Um Unterschiede zwischen den beiden UV-

Tabelle 4.2: Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Keratinozyten nach UV-Bestrahlung

Zugabe	ICAM-1 Expression [Fluoreszenzintensität]		
	Kontrolle	UVA (30 J/cm ²)	UVB (100 J/m ²)
keine	6 ± 4	120 ± 14	140 ± 22
NaN ₃	20 ± 2	10 ± 2	140 ± 28
Vitamin E	15 ± 6	10 ± 1	130 ± 20
D ₂ O	7 ± 4	180 ± 10	125 ± 20
Mannit	12 ± 6	115 ± 20	135 ± 8
Katalase	15 ± 5	125 ± 10	130 ± 15
Superoxiddismutase	5 ± 5	90 ± 20	100 ± 20

Wellenlängenbereichen aufzuzeigen, wurde der Effekt sowohl von UVA als auch von UVB getestet.

In unbehandelten Zellen wurde eine Steigerung der Oberflächenexpression von ICAM-1 um etwa das 20-fache sowohl nach der Bestrahlung mit UVA als auch mit UVB gefunden. Dagegen wurde bei einer Bestrahlung mit UVA in Gegenwart des Singulett-Sauerstoff-Scavengers Natriumazid die Induktion der ICAM-1 Expression fast vollständig gehemmt. Unter den gleichen Versuchsbedingungen blieb die durch UVB-Bestrahlung induzierte Oberflächenexpression im Wesentlichen unverändert hoch. Eine vergleichbare Hemmung der durch UVA induzierten, nicht aber der durch UVB induzierten Oberflächenexpression von ICAM-1 wurde auch in Keratinozyten beobachtet, die 24 Stunden vor der Bestrahlung mit Vitamin E behandelt worden waren. Genau entgegengesetzt verhielten sich Zellen, die vor Bestrahlung mit Deuteriumoxid behandelt worden waren. Hier wurde nach UVA-Bestrahlung, nicht aber nach UVB-Bestrahlung eine Verstärkung der ICAM-1 Oberflächenexpression beobachtet. Die Gegenwart von Mannitol (Auslöschung des Hydroxyl-Radikals), Katalase (Disproportionierung von Hydrogenperoxid) oder Superoxiddismutase (Disproportionierung von Superoxid-Anionen) während der Bestrahlung hatte weder eine Wirkung auf die durch UVA noch durch UVB induzierte Oberflächenexpression von ICAM-1. Im Folgenden wurden die Reagenzien, die die UVA-induzierte Oberflächenexpression von

ICAM-1 beeinflussten, auf ihre Fähigkeit untersucht, die UVA-induzierte Aktivierung des ICAM-1 Promotors zu modulieren (Tabelle 4.3). Auch im Gelretardierungsexperiment konnte gezeigt werden, dass durch Koinkubation mit Natriumazid die UVA-induzierte AP2-Aktivierung fast vollständig unterbunden wurde. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation unbestrahlter Zellen mit H₂O₂ nicht zur Aktivierung von AP2 und der Hydroxylquencher Mannit hatte keine Wirkung auf die UVA-induzierte Aktivierung von AP2 (Abb. 4.3A).

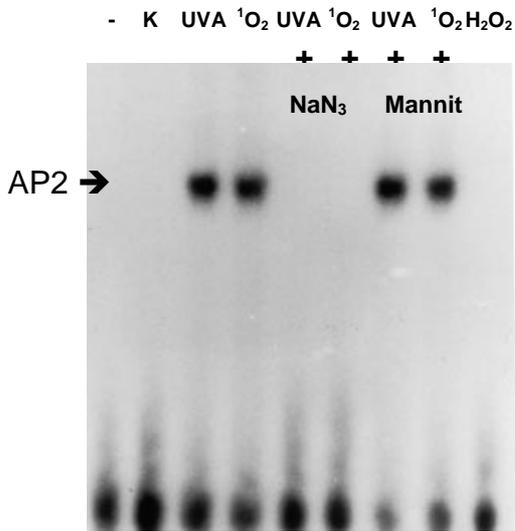
Tabelle 4.3: Aktivierung des ICAM-1 Promotors in UVA-bestrahlten 293-Zellen

Exposition	Relative spez. Luziferase-Aktivität [RLU/ μ g Protein]		
	pIC277	pIC277 Δ NFKB	pIC277 Δ AP2
Kontrolle	1,0 \pm 0,12	1,0 \pm 0,15	1,0 \pm 0,18
UVA	3,0 \pm 0,59	3,0 \pm 0,30	1,1 \pm 0,22
UVA + NaN₃	1,3 \pm 0,19	1,0 \pm 0,10	1,3 \pm 0,16
UVA + Vitamin E	1,2 \pm 0,24	0,9 \pm 0,18	1,1 \pm 0,23
UVA + D₂O	3,6 \pm 0,21	3,8 \pm 0,15	1,0 \pm 0,30

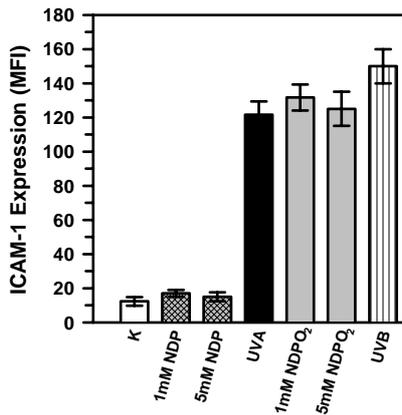
Bestrahlung von 293-Zellen in Gegenwart von NaN₃ oder nach Vorinkubation mit Vitamin E (α -Tocopherylsuccinat) verringert die Induktion des ICAM-1 Promotors durch UVA auf etwa Hintergrundniveau, hingegen führt eine Bestrahlung in Gegenwart von D₂O zu einem leichten aber konsistenten Anstieg der UVA-induzierten Promotoraktivierung.

Die Fähigkeit von Natriumazid und Vitamin E (α -Tocopherylsuccinat) zur Hemmung und von Deuteriumoxid zur Verstärkung der UVA-induzierten ICAM-1 Oberflächenexpression, Promotoraktivierung und Aktivierung von AP2 deutet auf eine wichtige Rolle von Singulett-Sauerstoff in diesem System hin. Auf Grund dieser Beobachtungen untersuchten wir zunächst, ob diese UVA-induzierten Effekte durch Stimulation unbestrahlter Zellen mit Singulett-Sauerstoff nachgeahmt werden konnten. Singulett-Sauerstoff wurde durch thermale Zersetzung von NDPO₂ erzeugt (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Wlaschek *et al.*, 1995; Di Mascio *et al.*, 1989). Wie aus Abb. 4.3B zu ersehen ist, führte die Bildung von Singulett-Sauerstoff zu einer erhöhten ICAM-1 Oberflächenexpression in unbestrahlten Keratinozyten, sehr ähnlich in der Stärke wie nach UVA- oder UVB-Bestrahlung. Wie bei der ICAM-1 Expression beobachtet führt Singulett-Sauerstoff auch zu einer Induktion der Promotoraktivität in unbestrahlten Zellen (Abb. 4.3C). Eine signifikante Induktion der ICAM-1 Promotoraktivität wurde in mit dem Konstrukt pIC277 transient transfizierten 293-Zellen verzeichnet, die entweder mit UVA o-

Abbildung 4.3: Wirkung von UVA und Singulett-Sauerstoff auf die AP2 Aktivierung, die ICAM-1 Oberflächenexpression und die ICAM-1 Promotoraktivität in primären Keratinozyten.



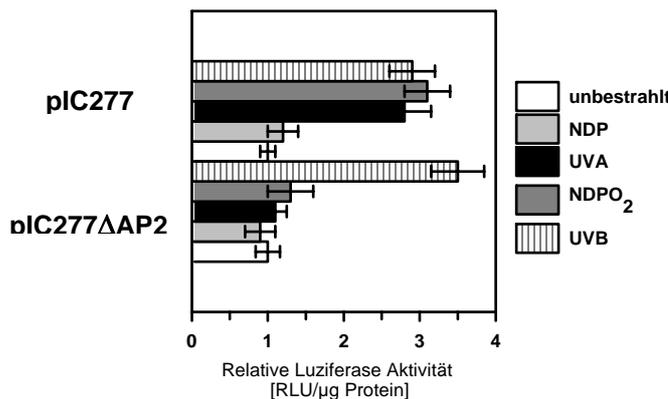
A Gelretardierungsexperiment mit Nuklearextrakten von unbestrahlten primären (K), UVA-bestrahlten (UVA), Singulett-Sauerstoff (1O_2)- oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-behandelten Keratinozyten in Gegenwart oder Abwesenheit von Natriumazid (NaN_3) oder Mannit. Die Ernte erfolgte 2 h nach Stimulation. Hier ist eins von 2 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



B Oberflächenexpression von ICAM-1 auf primären Keratinozyten.

Die Zellen waren unbehandelt (K), mit NDP oder NDPO₂ behandelt oder einer Bestrahlung mit UVA (30 J/cm²) oder UVB (100 J/m²) unterzogen worden. Die Analyse erfolgte 24 h nach der Stimulation. Die Daten sind als \pm SD der relativen ICAM-1 Oberflächenexpression von 4 Experimenten wiedergegeben.

(MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität)



C ICAM-1 Promotoraktivierung in 293-Zellen nach transienter Transfektion mit den bezeichneten ICAM-1 Promotorkonstrukten: Die Zellen wurden entweder unbestrahlt belassen, mit NDPO₂ oder NDP (1 mM für 1 h) behandelt oder einer Bestrahlung mit UVA (30 J/cm²) oder UVB (100 J/m²) unterzogen. Die Daten sind als \pm SD der relativen spezifischen Luciferase Aktivität bezogen auf den Proteingehalt von 4 Experimenten gemittelt.

der UVB bestrahlt oder mit Singulettisauerstoff stimuliert worden waren. Die Deletion der AP2-Konsensussequenz aus pIC277, das Konstrukt pIC277 Δ AP2, hatte die Hemmung der UVA- und der Singulettisauerstoff-induzierten nicht aber der UVB-induzierten Promotoraktivität zur Folge (Abb. 4.3C). Die Stimulation der Zellen mit NDP konnte keine ICAM-1 Oberflächenexpression oder Promotoraktivität induzieren (Abb. 4.3C).

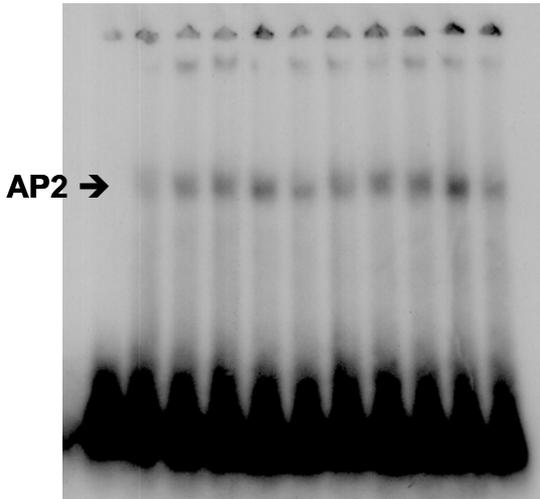
Diese Experimente weisen auf eine Funktion von AP2 in der durch Singulettisauerstoff induzierten Promotoraktivierung von ICAM-1 hin. Entsprechend führte eine Stimulation von Keratinozyten mit aus dem Zerfall von NDPO₂ entstandenen Singulettisauerstoff zu einer Aktivierung von AP2 im Gelretardierungsexperiment (Abb. 4.3A).

4.3 Bedeutung der Ceramide für die UVA-induzierte Signaltransduktion

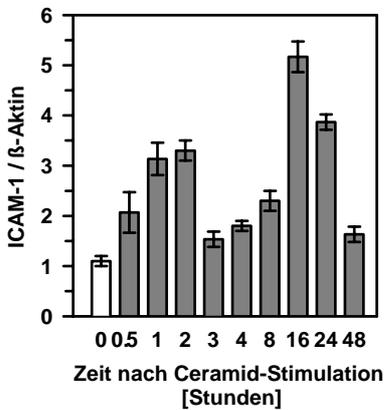
Um die Rolle von Ceramiden in diesem System zu untersuchen wurden Keratinozyten mit zellgängigen Ceramiden wie C2- und C6-Ceramid stimuliert und anschließend auf die Aktivierung von AP2 und die Expression von ICAM-1 mRNS untersucht. Die Zugabe von exogenen Ceramiden erhöhte die DNS Bindungsaktivität von AP2 in Nuklearextrakten, die aus Ceramid-stimulierten Zellen isoliert worden waren (Abb. 4.4A). Die Bindung von AP2-Oligonukleotiden konnte mit spezifischem Kompetitor in 100-fachem molarem Überschuss verdrängt werden, nicht aber mit einem Kontroll-Oligonukleotid, das eine Konsensussequenz für AP1 enthielt (Grether-Beck *et al.*, 1996; Daten nicht gezeigt). Die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 zeigte einem biphasischen Verlauf mit einem ersten frühen Maximum zwischen 1 und 2 Stunden nach der Stimulation und einem darauf folgenden zweiten Anstieg nach 24 Stunden und ging mit einer biphasischen Aufregulation der ICAM-1 mRNS einher (Abb. 4.4B). Um die funktionelle Bedeutung der AP2 Aktivierung für die Ceramid-vermittelte ICAM-1 Expression zu analysieren, wurde die ICAM-1 Promotoraktivierung in Keratinozyten untersucht, die mit auf dem ICAM-1 Promotor basierenden Reportergenkonstrukten transient transfiziert waren. Die Reportergenkonstrukte basieren auf dem Luziferasereporter, welches mit verschiedenen zwischen -6000 und -34 Nukleotiden vor dem Transkriptionsstart befindlichen Anteilen des ICAM-1 Pro-

Abbildung 4.4: Rolle der Ceramide in der UVA-induzierten ICAM-1 Expression in primären Keratinozyten des Menschen

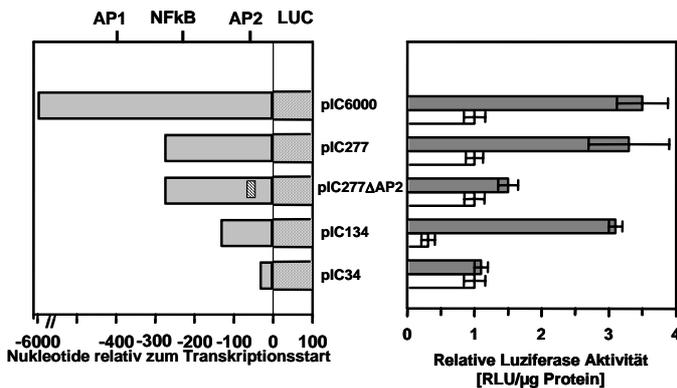
Stunden K 0 0,5 1 2 3 4 8 16 24 48



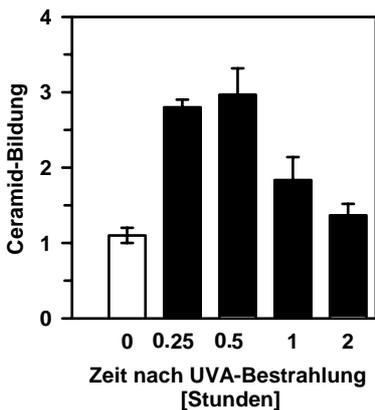
A: Zeitlicher Verlauf der Ceramid-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 nach Stimulation mit 10 μ M C2-Ceramid. Kernextrakte wurden wie in 3.3.7 beschrieben zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation isoliert und mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid gegen AP2 analysiert (3.3.8). K bezeichnet Extrakte aus unstimulierten Keratinozyten.



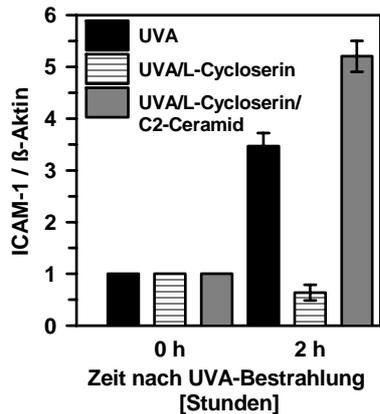
B: Zeitlicher Verlauf der ICAM-1 mRNA Expression nach Stimulation mit 10 μ M C2-Ceramid. Die Expression von ICAM-1 mRNA wurde mit differentieller RT-PCR basierend auf der Expression des Haushaltsgens β -Aktin bestimmt. 0 bezeichnet die Expression in unstimulierten Zellen.



C: C2-Ceramid-induzierte Aktivität des Reportergens in transient transfizierten primären Keratinozyten, wiedergegeben als relative spezifische Luciferase-Aktivität [RLU/ μ g]. Die Aktivität von unstimulierten, transfizierten Zellen wurde auf 1 gesetzt.



D: UVA-induzierte Ceramid-Bildung in primären Keratinozyten wurde mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie ermittelt. Die Daten wurden als Zähler pro Minute basierend auf 500 μ g Protein bestimmt und sind als Vielfaches der unstimulierten Kontrolle angegeben.



E: Wirkung von L-Cycloserin auf die UVA-induzierte ICAM-1 mRNA Expression. Die UVA-induzierte ICAM-1 mRNA Expression wurde mit differentieller RT-PCR in nur UVA-behandelten (schwarzer Balken), zusätzlich für 3 Tage mit L-Cycloserin (1mM) vorbehandelten (weißer Balken mit Querstrich) und in vorbehandelten, UVA-bestrahlten und C2-Ceramid stimulierten (grauer Balken) Keratinozyten bestimmt.

motors ligiert sind. Bei Keratinozyten, die mit pIC6000 oder pIC277 transfiziert waren, führte die Stimulation mit Ceramiden zu einer drei- bis vierfachen Promotoraktivierung (Abb. 4.4C). Die Deletion der mutmaßlichen AP2-Bindestelle in Konstrukt pIC277 hatte den Verlust der Ceramid-induzierten ICAM-1 Promotoraktivierung zur Folge. Konstrukt pIC134, das eine AP2-Bindestelle enthält, aber über keine NFκB-Bindestelle verfügt, konnte noch aktiviert werden. Das pIC34 Konstrukt hingegen enthielt nur eine basale TATA-Box und zeigte keine Induktion der Promotoraktivierung durch Stimulation mit Ceramiden oder UVA (Daten nicht gezeigt).

Beide Ceramid-induzierten Effekte, die biphasische AP2 Aktivierung, die ICAM-1 mRNA Induktion wie auch die Hemmung der ICAM-1 Reportergenaktivität nach einer Deletion der AP2 Bindestelle waren in identischer Form in Keratinozyten nach einer UVA-Bestrahlung beobachtet worden (Grether-Beck *et al.*, 1996). Deshalb untersuchten wir, ob UVA-Bestrahlung zur Bildung von Ceramiden in Keratinozyten führt. Die Belichtung mit UVA-Dosen, die in der Lage waren, AP2 zu aktivieren und ICAM-1 mRNA Expression zu induzieren, führte zu einem dreifachen schon 15 Minuten nach der Bestrahlung messbaren und nach 30 Minuten maximalen Anstieg des Gehalts an Ceramiden in Keratinozyten des Menschen (Abb. 4.4D). Um die Bedeutung der UVA-induzierten Bildung von Ceramiden für die UVA-induzierte ICAM-1 Expression zu untersuchen, wurden Keratinozyten mit L-Cycloserin behandelt, welches als Substratanalogon für Serin dient, die Serin-Palmitoyltransferase zu hemmen vermag und damit letzten Endes die Sphingomyelinsynthese zum Erliegen bringt. Eine Vorbehandlung mit L-Cycloserin unterdrückte die UVA-induzierte Aufregulation von ICAM-1 mRNA vollständig (Abb. 4.4E). Diese Hemmwirkung war spezifisch, da sie durch die Zugabe von exoge-

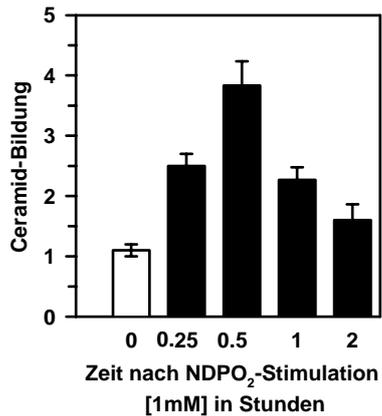
nen Ceramiden überkommen werden konnte (Abb. 4.4 E). Zudem konnte L-Cycloserin in gleichen Konzentrationen die Interferon- γ -induzierte ICAM-1 mRNA Expression in diesen Zellen nicht hemmen (Daten nicht gezeigt).

4.4 Bedeutung von Singulett-Sauerstoff für die UVA-induzierte Ceramid-Bildung

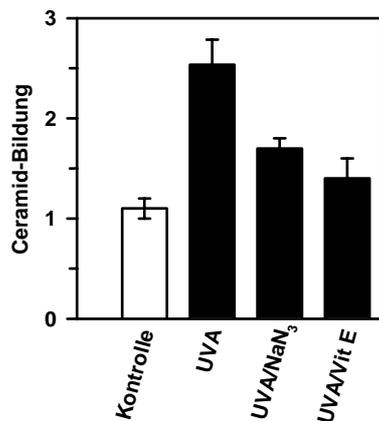
Die UVA-induzierte AP2 Aktivierung und die ICAM-1 mRNA Expression werden durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff vermittelt (Grether-Beck *et al.*, 1996). Beide Effekte wurden durch die Zugabe von Singulett-Sauerstoffquenchern wie Vitamin E oder Natriumazid ausgelöscht und in unbestrahlten Keratinozyten durch die Verwendung eines Singulett-Sauerstoff generierenden Systems beispielsweise infolge thermischer Zersetzung des Dinatriumsalzes von 3,3'-(1,4-Naphthyliden)dipropionat imitiert. Deshalb untersuchten wir, ob die UVA-induzierte Ceramid-Bildung durch Singulett-Sauerstoff vermittelt wurde. Ebenso wie eine UVA-Bestrahlung führte eine Behandlung mit NDPO₂ zu einer Ceramid-Bildung in primären Keratinozyten des Menschen (Abb. 4.5A). Die zeitlichen Verläufe der UVA-induzierten und der NDPO₂-vermittelten Ceramid-Bildung folgten demselben Muster, das bis zu 30 Minuten nach der Stimulation ein Maximum erreichte und dann stetig bis zum Erreichen des Hintergrundniveaus absank (vergleiche hierzu Abb. 4.5A und Abb. 4.4D). Die Zugabe von Singulett-Sauerstoffquenchern wie Natriumazid oder Vitamin E konnte sowohl die UVA-induzierte als auch die NDPO₂-vermittelte Ceramid-Bildung auf das Hintergrundniveau absenken (Abb. 4.5B, C). Die Hemmung der UVA-induzierten Ceramid-Bildung durch Vitamin E war dosisabhängig in einem Bereich zwischen 10 μ M (12% Hemmung) und 25 μ M (87% Hemmung, Daten nicht gezeigt).

Ceramide können auf verschiedenen Wegen gebildet werden: Die Neusynthese der Ceramide wird durch die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zur Bildung von 3-Ketodihydrosphinganin initiiert (Bose *et al.*, 1995; Ballou *et al.*, 1996; Hannun, 1996, Spiegel *et al.*, 1996). Nach der Reduktion zu Dihydrosphinganin und der darauf folgenden Umsetzung von Dihydroceramid durch die Ceramidsynthese wird das Ceramid durch die Oxidation von Dihydroceramid durch Einführung einer Doppelbindung an der Position 4,5 in *trans* gebildet. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dieser Reaktion ist die Ceramidsynthase

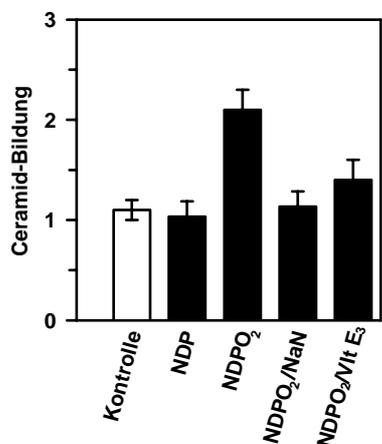
Abbildung 4.5: Singulett-Sauerstoff-vermittelte Bildung von Ceramiden in primären Keratinozyten.



A: Zeitlicher Verlauf der Ceramid-Bildung nach einer 30-minütigen Vorstimulation mit 1 mM NDPO₂. Die Ceramid-Bildung in unstimulierten Keratinozyten wurde auf 1 gesetzt. Die Messungen wurden wie in 3.3.10 beschrieben als Dreifachbestimmungen durchgeführt.



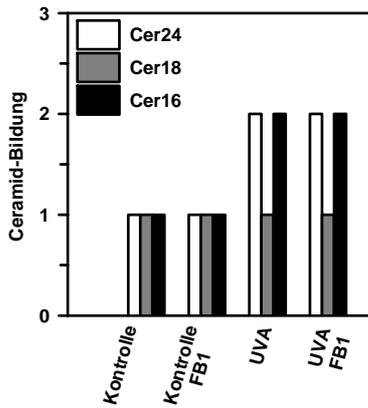
B: Die Wirkung von Singulett-Sauerstoffquenchern Natriumazid (50 mM während der Bestrahlung) und Vitamin E (25 µM als α-Tocopherylsuccinat während einer 24-stündigen Vorinkubation) auf die UVA-induzierte Ceramid-Bildung. Die Ceramid-Bildung wurde 30 Minuten nach der Bestrahlung mit 30 J/cm² gemessen. Das in der unbehandelten Kontrolle vorhandene Ceramid wurde auf 1 gesetzt.



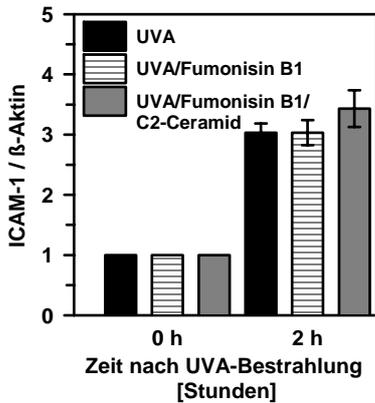
C: Die Wirkung von Singulett-Sauerstoffquenchern Natriumazid (50 mM während der Bestrahlung) und Vitamin E (25 µM als α-Tocopherylsuccinat während einer 24-stündigen Vorinkubation) auf die NDPO₂-induzierte Ceramid-Bildung. Die Ceramid-Bildung wurde 30 Minuten nach der Behandlung mit 1 mM NDPO₂ bzw. 1 mM NDP gemessen. Das in der unbehandelten Kontrolle vorhandene Ceramid wurde auf 1 gesetzt.

(Sphinganin-Acyltransferase), die spezifisch durch die Zugabe des natürlichen Inhibitors Fumonisin B1 gehemmt werden kann (Merrill *et al.*, 1993). Die Zugabe von Fumonisin B1 zu Keratinozyten während und nach einer Bestrahlung mit UVA oder während und nach einer NDPO₂-Behandlung (Daten nicht gezeigt) konnte weder die Ceramid-Bildung (Abb. 4.6A) noch die ICAM-1 mRNA Expression (Abb. 4.6B) verhindern. Zudem konnten die beiden Stimuli die Ceramid-synthase Aktivität nicht induzieren (Abb. 4.6D).

Abbildung 4.6: Die Bedeutung der Aktivierung von Ceramidsynthese und Sphingomyelinase für die Ceramid-Bildung in primären Keratinozyten.

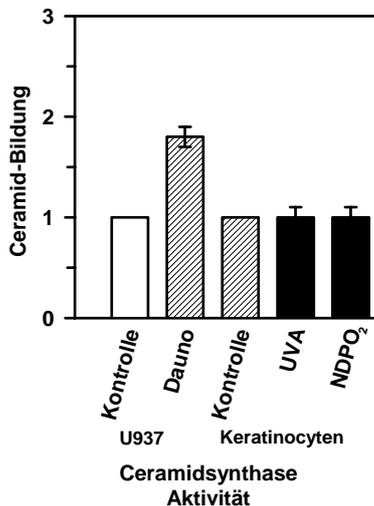
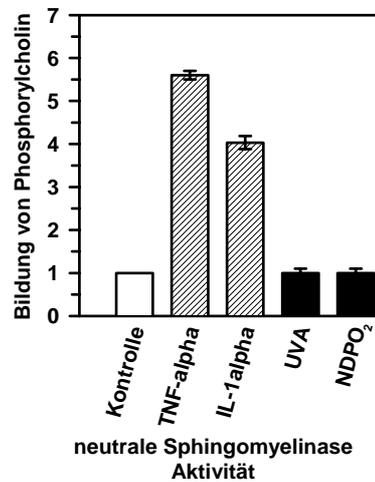
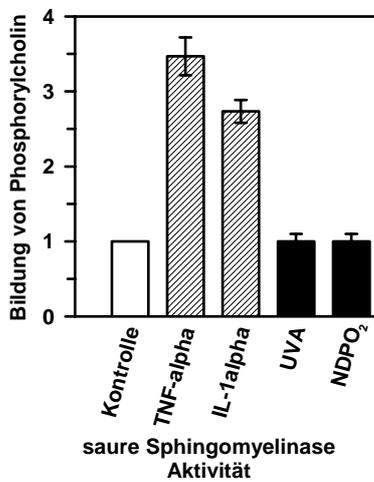


A: UVA-induzierte Ceramid-Bildung nach Lipidextraktion und massenspektroskopischer Analyse in Keratinozyten, die mit Fumonisin B1 (25 μ M) und/oder UVA (30 J/cm²) behandelt worden waren. Es wurden die häufigsten Ceramide gemäß der Fettsäureseitenkette, also C16-, C18- und C24-Ceramide, bestimmt.



B: UVA-induzierte Expression von ICAM-1 mRNA in Keratinozyten nach einer zusätzlichen Vorbehandlung mit Fumonisin B1 oder einer Kombination von Fumonisin B1 und C2-Ceramid.

C: Aktivierung von saurer und neutraler Sphingomyelinase in Keratinozyten, die für 30 Minuten entweder mit jeweils 1000 Einheiten/ml TNF- α oder IL-1 α , UVA 30 J/cm² oder 1 mM NDPO₂ stimuliert worden waren. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.



D: Die Aktivierung der Ceramidsynthese wurde *in vitro* in mikrosomalen Extrakten gemessen. Als positive Kontrolle diente die Stimulation von U937 Zellen mit 1 μ M Daunorubicin für 24 Stunden. Die Extrakte zur Bestimmung der Ceramidsyntheseaktivität in den Keratinozyten wurden 30 Minuten nach der Bestrahlung mit UVA (30 J/cm²) bzw. der Behandlung mit NDPO₂ (1 mM) geerntet.

Neben der Neusynthese aus Serin und Palmitoyl-CoA können Signaltransduzierende Ceramide auch aus Sphingomyelin katabol gebildet werden.

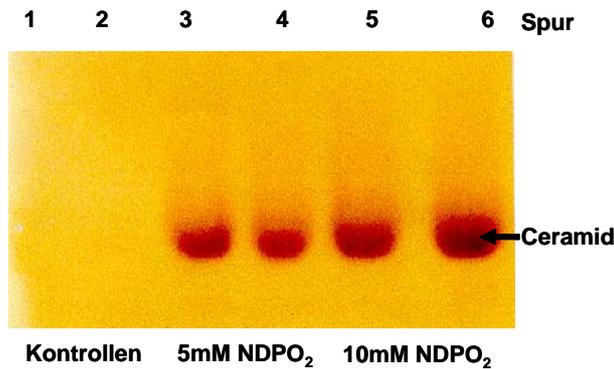
Hierbei wird das Sphingomyelin über Sphingomyelinasen zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert (Ballou *et al.*, 1996; Hannun, 1996; Spiegel *et al.*, 1996, Krönke, 1997). Die Aktivität von Sphingomyelinasen kann in Gegenwart einer Reihe von exogenen Stimuli wie etwa den proinflammatorischen Zytokinen Tumor-Nekrosisfaktor α (TNF- α) oder Interleukin-1 α (IL-1 α) aktiviert werden. Deshalb haben wir die Wirkung von einer UVA-Bestrahlung bzw. einer Singulett-sauerstoffbehandlung auf die Enzymaktivitäten der Sphingomyelinasen in primären Keratinozyten untersucht. Die Behandlung von Keratinozyten mit TNF- α oder IL-1 α hatte sowohl einen Anstieg der sauren als auch der neutralen Sphingomyelinase Aktivität zur Folge (Abb. 4.6C). Im Gegensatz dazu führte weder die UVA-Bestrahlung noch die Behandlung mit NDPO₂ zu einer Erhöhung der untersuchten Enzymaktivitäten über den Basislevel hinaus (Abb. 4.6C). Da beide Stimuli jedoch im gleichen Versuch zur Bildung von Ceramiden führten, muss hier eine alternative Art der Ceramid-Bildung vorliegen.

4.5 Ceramid-Bildung in Sphingomyelin-haltigen Liposomen

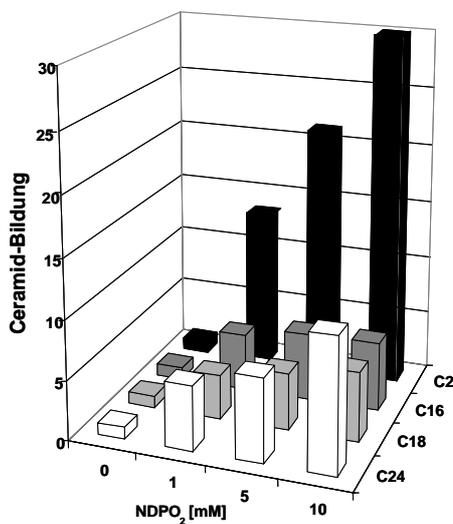
Da Singulett-sauerstoff direkt mit Plasmalogen-Lipiden reagieren kann (Morand *et al.*, 1988; Zoellner *et al.*, 1988; Anderson und Thompson, 1992), stellten wir die Hypothese auf, dass es sich bei der beobachteten Bildung von Ceramiden ebenfalls um einen nicht-enzymatischen Vorgang handeln könnte. Um diese Vermutung zu testen, haben wir Liposome, die nur aus dem Sphingomyelin des Eidotters bestanden und kein Protein enthielten, verwendet. Die Analyse mittels Hochleistungs-dünnschichtchromatographie deutete darauf hin, dass die Behandlung dieses enzymfreien Systems mit NDPO₂ oder UVA (Daten nicht gezeigt) zu einer dosisabhängigen Bildung von Ceramiden führte (Abb. 4.7A).

Die in unserer Studie verwendeten Liposomen enthielten eine Mischung aus verschiedenen Sphingomyelinen, die sich hinsichtlich der Länge ihrer Fettsäureseitenketten unterschieden. Eine Analyse der NDPO₂-behandelten Liposomen mittels HPLC / Massenspektroskopie ergab, dass diese Behandlung mit dem Singulett-sauerstoff generierenden System zu einem entsprechenden, dosisabhängigen Muster an C2-, C16-, C18- und C24-Ceramiden führte (Abb. 4.7B). Dieses

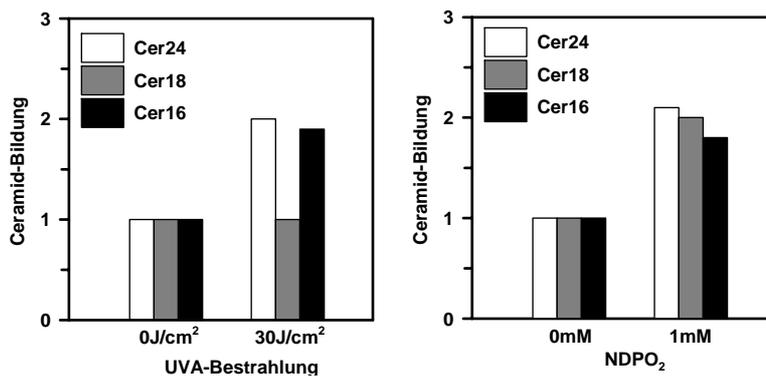
Abbildung 4.7: Singulett-Sauerstoff generiert Ceramide in aus Sphingomyelin bestehenden, enzymfreien Liposomen.



A: HPTLC der NDPO₂-induzierten Ceramid-Bildung in Liposomen, die mit 0 (Spur 1 und 2), 5 (Spur 3 und 4) oder 10 mM NDPO₂ (Spur 5 und 6) behandelt worden waren. Eine Färbung mit Jod macht die Lipidbanden sichtbar.



B: Analyse der NDPO₂-induzierten Ceramid-Bildung in Liposomen mittels HPLC / Massenspektroskopie. Liposome wurden mit den angezeigten Konzentration von NDPO₂ (0-10 mM) für 30 Minuten behandelt und anschließend wie in 3.3.10 beschrieben aufgearbeitet.



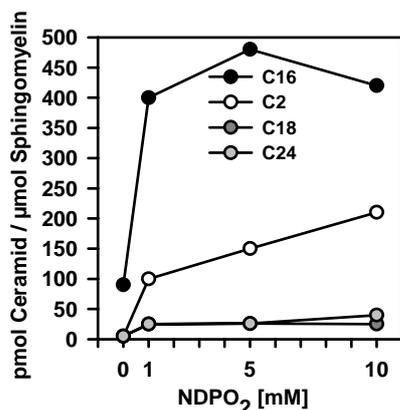
C: Analyse der Ceramidzusammensetzung in primären Keratinozyten hinsichtlich der Fettsäureseitenketten (Ceramid 16, 18 und 24) mit HPLC / Massenspektroskopie 30 Minuten nach Stimulation mit UVA (30 J/cm²) oder NDPO₂ (10 mM).

Ceramidprofil stimmte mit dem in NDPO₂-behandelten Keratinozyten erhaltenen Muster bis auf das Fehlen von C2-Ceramiden überein (Abb. 4.7C). Das Muster in UVA-behandelten Keratinozyten unterschied sich zusätzlich durch das Fehlen von C18-Ceramiden (Abb. 4.7C).

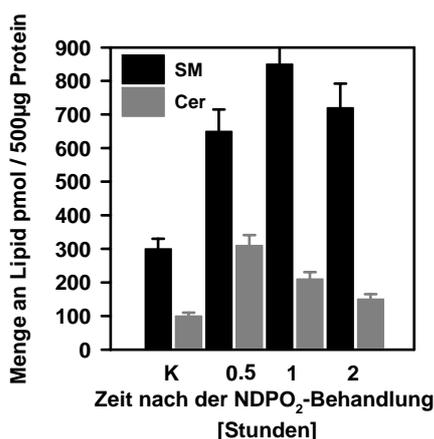
Ob die Menge an in Liposomen gebildetem Ceramid mit der *in vivo* in primären Keratinozyten gebildeten Menge übereinstimmt, ist eine wichtige Frage: Unbehandelte Liposomen enthielten entsprechend der HPTLC-Analyse ~10 Mol-% Ceramide; dies entspricht der basalen SpHINGOMYELINHYDROLYSE. Die Verteilung der Fettsäureseitenketten in dem für die Liposomen verwendeten SpHINGOMYELIN betrug 83,9% C16, 6,3% C18 und 4,2% C24 (siehe hierzu 3.3.15). Aufbauend auf diesen Informationen berechneten wir, dass die Behandlung von Liposomen mit 1 mM NDPO₂ zur Bildung von 400 pmol C16-, 90 pmol C2-, 26 pmol C18- und 23 pmol C24-Ceramiden führen sollte (Abb. 4. 8A).

Für C16-Ceramide entspräche dies einem 4,8-fachen Anstieg nach einer Stimu-

Abbildung 4.8: Absolute Mengen an Ceramid und SpHINGOMYELIN in Liposomen und Keratinozyten



A: Die absoluten Mengen an C2-, C16-, C18- und C24-Ceramid in pmol wurden in Liposomen nach Behandlung mit einer steigenden Konzentration an NDPO₂ (0, 1, 5 und 10 mM) wie in 3.3.15 beschrieben bestimmt. Die Daten werden als Bildung von Ceramid in pmol/μmol SpHINGOMYELIN in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an NDPO₂ wiedergegeben.



B: Zeitlicher Verlauf der absoluten Mengen an Ceramid in Keratinozyten nach Behandlung mit dem Singulett-Sauerstoffgenerator NDPO₂. Die Keratinozyten wurden unbehandelt belassen (K) oder mit 1 mM NDPO₂ für 30 Minuten behandelt, entsprechend der angegebenen Zeiten geerntet und wie in 3.3.15 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind als Histogramm dargestellt: Lipidmenge in pmol/500 μg Protein gegen die Zeit in Stunden.

lation mit NDPO₂. Entsprechend ergab sich der basale Gehalt an SpHINGOMYELIN in unbehandelten Keratinozyten als +120 pmol / 500 μg Protein. Ähnliche Lipidmengen waren für SpHINGOMYELIN und Ceramide in P388 Zellen beschrieben worden (Bose *et al.*, 1995). Nach Stimulation mit 1 mM NDPO₂ wurde ein 3-facher Anstieg der Bildung von C16-Ceramid verzeichnet (Abb. 4.8B).

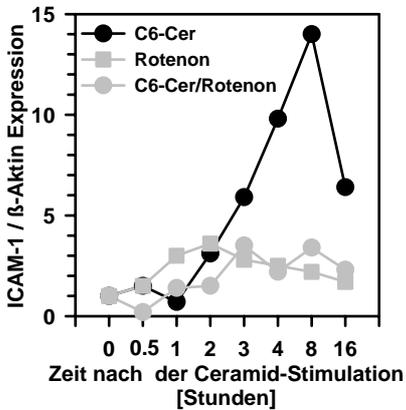
4.6 Wirkung von Ceramiden auf die Mitochondrien

Da sich die Ceramide als „second Messenger“ sowohl in der UVA- als auch in der Singulett-Sauerstoff-vermittelten Signaltransduktion erwiesen hatten, wurde im folgenden die Wirkung von zellpermeablen Ceramiden auf die weitere Signalkaskade unter besonderer Berücksichtigung ihres Effektes auf die Induktion der Genexpression untersucht. Neben der Regulation von Genexpression sind Ceramide für die Induktion von Apoptose bekannt (Kolesnick *et al.*, 1994; Hannun & Obeid, 1995). Dies erfolgt über die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma der Zelle (Hannun & Obeid, 2002) und die anschließende Aktivierung von Caspasen (Rippo *et al.*, 2000). Studien an isolierten Mitochondrien beschreiben einen Wirkung auf die Elektronentransportkette (Amarante-Mendes *et al.*, 1998), die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Freisetzung von Cytochrom C über die mitochondriale Megapore spielt (Kroemer *et al.*, 1997; Martinou, 1999). In diesem Zusammenhang ist es sehr wichtig, dass die von uns durchgeführten Stimulationen mit den zellpermeablen Ceramiden in Konzentrationsbereiches erfolgten, die 7-fach unter der zur Apoptoseinduktion notwendigen Menge von 70 μM lag (DiNardo *et al.*, 2000; Cutler & Mattson, 2001).

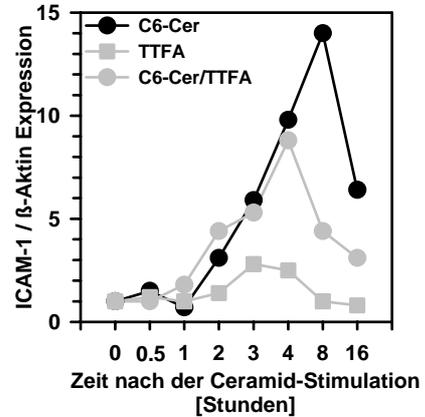
In den durchgeführten Untersuchungen wurde die funktionelle Bedeutung der Mitochondrien für die Ceramid-vermittelte Signaltransduktion analysiert. Da die UVA-Bestrahlung neben der hier erwünschten Bildung von Ceramiden auch noch andere Effekte wie etwa die Induktion der sogenannten „Common Deletion“ im mitochondrialen Genom zur Folge haben kann (Berneburg *et al.*, 1999), wurden die Keratinozyten hier nicht einer Bestrahlung mit UVA unterzogen sondern stattdessen mit kurzkettigen, synthetischen Ceramiden (C2- und C6-Ceramiden) behandelt. Diese zellpermeablen Ceramide waren schon in etlichen Veröffentlichungen für mechanistische Untersuchungen eingesetzt worden (Mathias *et al.*, 1991; Obeid *et al.*, 1993; Raines *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994).

Die Bedeutung der Mitochondrien für die Ceramid-induzierte ICAM-1 mRNA Expression wurde in primären Keratinozyten in der Gegenwart und Abwesenheit von Entkopplern der mitochondrialen Elektronentransportkette, die den Elektronenfluss zwischen den verschiedenen Komplexen der Atmungskette hemmen, gemessen. Die optimal wirksamen, nicht toxischen Konzentrationen für die Vorbehandlung der Zellen mit den Inhibitoren wurden in Dosiswirkungsstudien mit

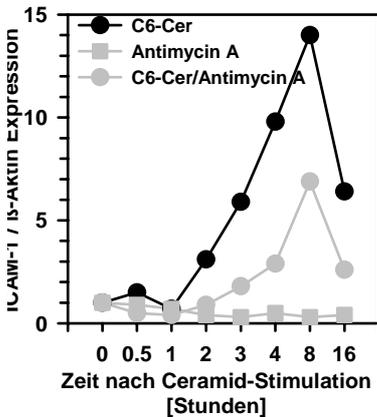
Abbildung 4.9: Hemmung der Ceramid-induzierten ICAM-1 mRNA Expression in Keratinozyten durch Inhibitoren für Komplex I (Rotenon), II (Thenoyltrifluoroacetone) und III (Antimycin A) der mitochondrialen Elektronentransportkette



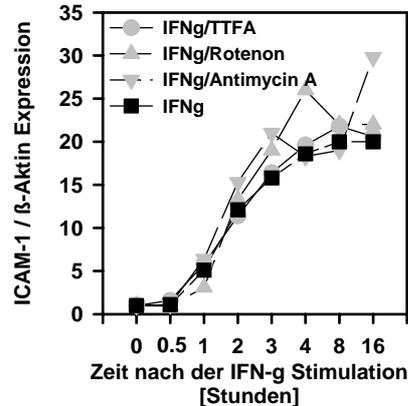
A: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten nach Stimulation mit 10 μ M C6-Ceramid, nach Vorinkubation mit 2,5 μ M Rotenon für 60 Minuten oder nach Kombinationsbehandlung mit Vorinkubation in Gegenwart von Rotenon und anschließender Stimulation mit Ceramid.



B: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten nach Stimulation mit 10 μ M C6-Ceramid, nach Vorinkubation mit 20 μ M Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) für 60 Minuten oder nach der Kombinationsbehandlung mit Vorinkubation in Gegenwart von TTFA und anschließender Stimulation mit Ceramid.

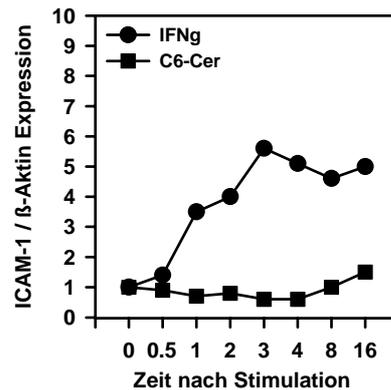


C: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten nach Stimulation mit 10 μ M C6-Ceramid, nach Vorinkubation mit 1 μ M Antimycin A für 60 Minuten oder nach der Kombinationsbehandlung mit einer Vorinkubation in Gegenwart von Antimycin A und anschließender Stimulation mit Ceramid.



D: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten nach Stimulation mit 1000 Einheiten/ml Interferon- γ (IFN γ) mit und ohne Vorinkubation für 60 Minuten in den Inhibitoren Thenoyltrifluoroacetone (TTFA; 20 μ M), Rotenon (2,5 μ M) oder Antimycin A (1 μ M).

E: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Rho0 Zellen nach Stimulation mit 1000 Einheiten/ml Interferon- γ (IFN γ) oder mit 10 μ M C6-Ceramid.



Keratinocyten ermittelt (Daten nicht gezeigt). Eine signifikante Hemmung der Ceramid-induzierten ICAM-1 mRNA Expression wurde in Zellen erzielt, die mit den Inhibitoren für die Komplexe I, II und III in der Elektronentransportkette behandelt worden waren. Als Inhibitor für den Komplex I wurde Rotenon (Driscoll *et al.*, 1998), für den Komplex II Thenoyltrifluoroacetone (Quillet-Mary *et al.*, 1997) und für den Komplex III Antimycin A (Suzuki *et al.*, 1999) verwendet (Abb. 4.9A-C).

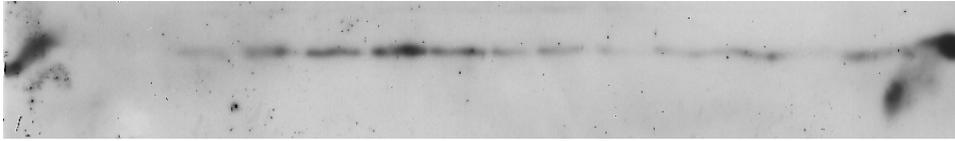
Diese Hemmwirkung war spezifisch, da identische Konzentrationen der Inhibitoren nicht in der Lage waren, die Interferon- γ -induzierte ICAM-1 mRNA Expression in Keratinocyten zu hemmen (Abb. 4.9D). Die Bedeutung der mitochondrialen Elektronentransportkette für die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression wurde mit Experimenten erhärtet, in denen epitheliale Rho0 Zellen verwendet wurden. In diesen Zellen wurde die mitochondriale DNS durch wiederholte Behandlung mit Ethidiumbromid depletiert (Chomyn *et al.*, 1992). Die in Rho0 Zellen konstitutive ICAM-1 Expression konnte nach Stimulation mit Interferon- γ deutlich induziert werden, während eine Stimulation mit zellpermeablen Ceramiden nicht dazu in der Lage war (Abb. 4.9E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression einer funktionell aktiven Elektronentransportkette bedarf.

4.7 Niedrige Konzentrationen an Ceramiden induzieren Cytochrom C Freisetzung ins Zytoplasma ohne zur Induktion von Apoptose zu führen

Die Inhibitoren der mitochondrialen Elektronentransportkette zeigten unterschiedliche Wirkung auf die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression, wobei Rotenon eine bessere Hemmung aufwies als Thenoyltrifluoroacetone oder Antimycin A. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Elektronenfluss proximal zum Ubichinon von besonderer Bedeutung für die Ceramid-vermittelte Regulation der Genexpression ist. Der Zufluss von Elektronen von Komplex I zum Ubichinon ist wichtig für den Transport von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Corsini *et al.*, 1996). Deshalb untersuchten wir, ob der Ceramid-vermittelten ICAM-1 Expression eine Cytochrom C Freisetzung einhergeht. Der Westernblot in Abb. 4.10A zeigt, dass es bei einer Stimulation von Keratinocyten mit zellpermeablen Ceramiden in Konzentrationen, die zur Aktivierung von AP2

Abbildung 4.10: Ceramid-induzierte Cytochrom C Freisetzung ohne Induktion von Apoptose

CytC - - 0 0.5 1 2 3 4 8 16 24 48h - CytC CytC



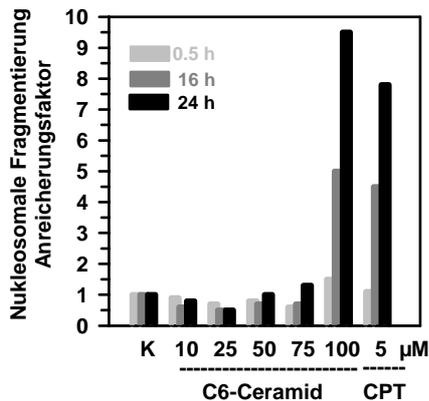
A: Immunpräzipitation von 100 μg zytosolischem Extrakt aus mit 10 μM C6-Ceramid induzierten primären Keratinozyten, die zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Stimulation geerntet und, wie in 3.3.17 beschrieben, aufgearbeitet wurden. 100 und 300 ng humanes rekombinantes Cytochrom C (Cyt C) dienen als Kontrolle. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.

Z1 Z2 Z3 M1 M2 M3

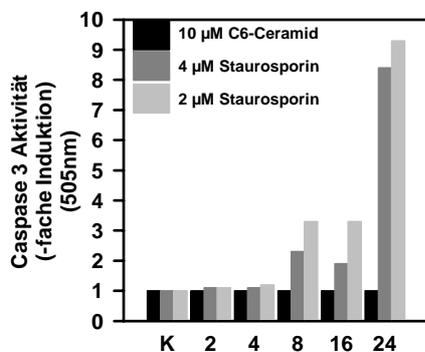


←Cox II

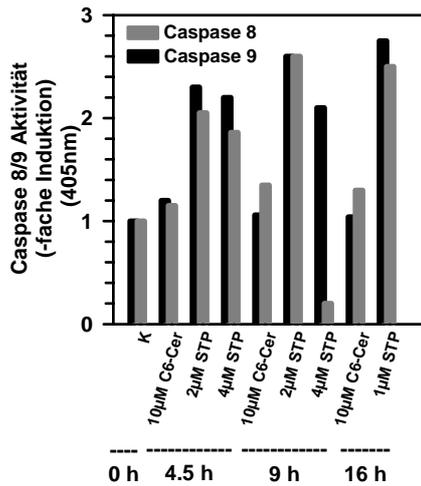
B: Mitochondriale (M) und zytosolische (Z) Fraktionen wurden routinemäßig auf mitochondriale Kontaminationen mit einem Nachweis auf Cytochrom C Oxidase Untereinheit II (Cox II) untersucht. Hier sind zytosolische (Z1-Z3) und mitochondriale (M1-M3) Fraktionen aus drei unabhängigen Isolierungen wiedergegeben.



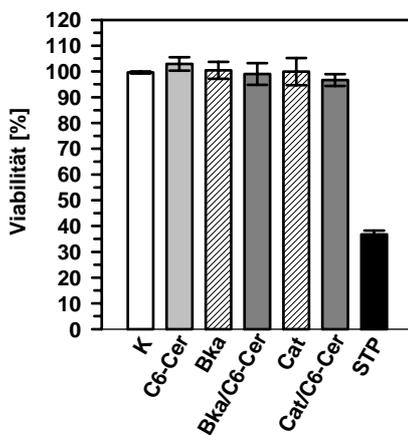
C: Nukleosomale Fragmentierung in Keratinozyten 30 Minuten, 16 oder 24 Stunden nach der Stimulation mit steigenden Konzentrationen von C6-Ceramid oder 5 μM Camptothecin (CPT). Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



D: Caspase 3 Aktivität in primären Keratinozyten nach Stimulation mit 10 μM C6-Ceramid, 2 oder 4 μM Staurosporin A. Nachweis erfolgt mit fluorimetrischem Immunabsorbensverfahren. Die Aktivität von unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Ergebnissen wiedergegeben.



E: Aktivität von Caspase 8 und 9 in primären Keratinozyten in einem kolorimetrischen Nachweisverfahren. Die Aktivität von unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Ergebnissen wiedergegeben. Die Aktivitäten in mit C6-Ceramid oder steigenden Mengen von Staurosporin (STP) stimulierten Keratinozyten wird als Vielfaches bezogen auf die unstimulierte Kontrolle angegeben.

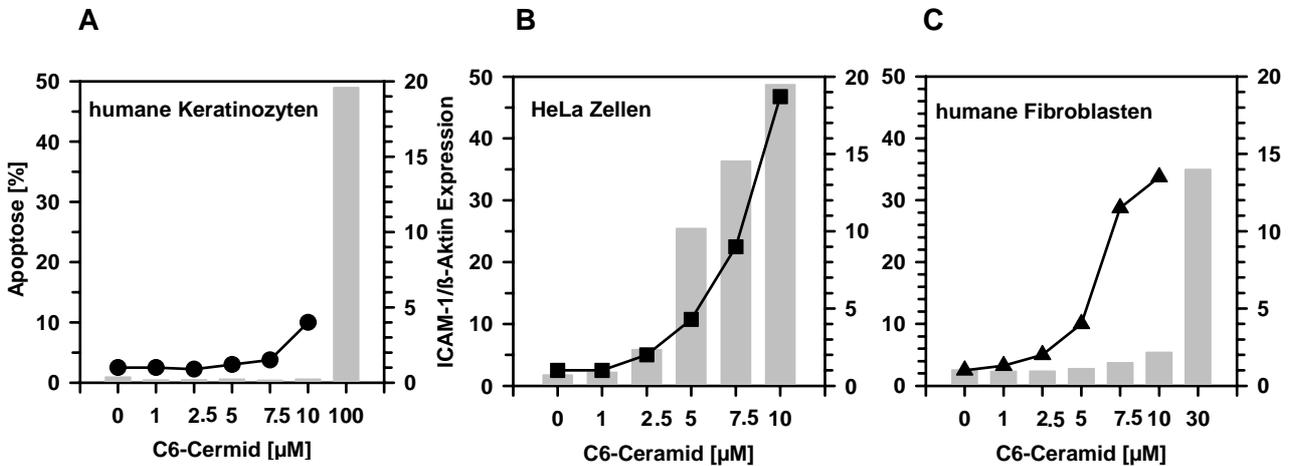


F: Viabilität der Keratinozyten 16 Stunden nach der Stimulation im MTT-Nachweis. Die Zellen wurden mit C6-Ceramid (10 µM) stimuliert, mit Inhibitoren für die mitochondriale Megapore (5 µM Bka oder 20 µM Cat) vorinkubiert oder mit C6-Ceramid nach Vorinkubation mit den Inhibitoren der Megapore behandelt. Staurosporin (4 µM) diente als Kontrolle für die Zytotoxizität. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.

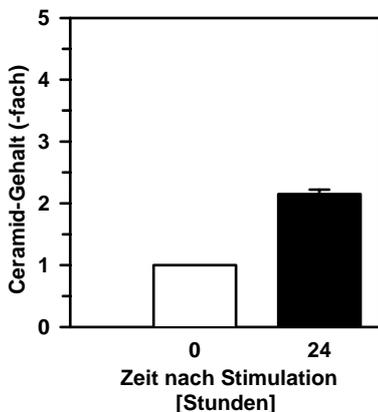
und zur Induktion von ICAM-1 Expression führen, zu einer zeitabhängigen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma kommt. Das Signal für Cytochrom C in den zytosolischen Fraktionen der Ceramid-stimulierten Keratinozyten wurde nicht durch eine mitochondriale Kontamination verursacht, denn das Markerenzym für Mitochondrien Cytochrom C-Oxidase Untereinheit II konnte in den gleichen Fraktionen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.10B).

Ein Anstieg des Holo-Cytochrom C wurde in zytosolischen Fraktionen aus Ceramid-stimulierten primären Keratinozyten frühestens 30 Minuten nach der Behandlung beobachtet und erreichte nach 2 Stunden in Maximum. Es ist hierbei wichtig anzumerken, dass unter den verwendeten Stimulationsbedingungen die Ceramide nicht zur Induktion von Apoptose führten. Dies wurde anhand von vier unabhängigen Apoptosenachweisen wie der nukleosomalen Fragmentierung, der Aktivierung von Caspasen 3, 8 und 9 und der TUNEL Methode untersucht (Abb. 4.10C-E und 4.11A). Die Beobachtung, dass die eingesetzten Konzentrationen von zellpermeablen Ceramiden nicht zur Induktion von Apoptose führten, beruhte

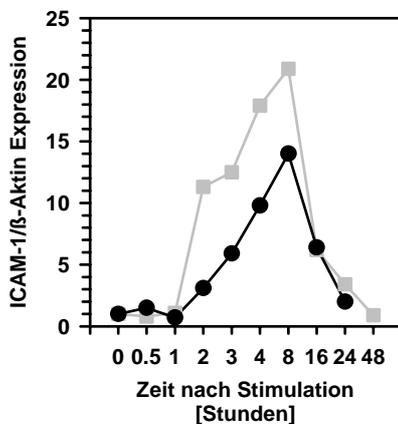
Abbildung 4.11: Induktion von ICAM-1 / β -Aktin Expression versus Induktion von Apoptose in primären Keratinozyten, HeLa-Zellen und dermalen Fibroblasten nach Stimulation mit Ceramiden.



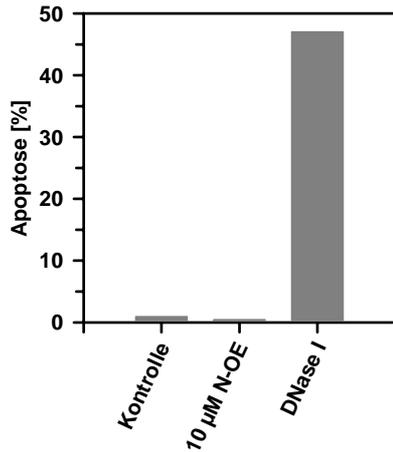
A-C: Humane primäre Keratinozyten (A), HeLa-Zellen (B) und humane primäre Fibroblasten (C) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an C6-Ceramid stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen hinsichtlich der ICAM-1 Expression (schwarze Kreise) und der Induktion von Apoptose mit dem TUNEL Nachweis (graue Balken) untersucht. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



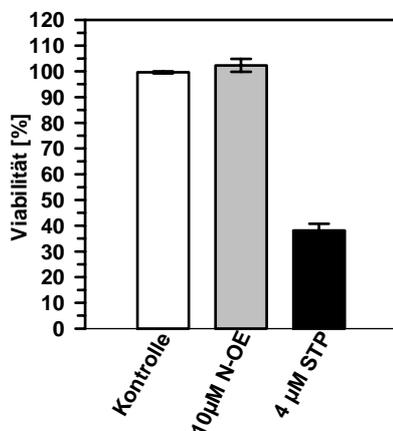
D: Primäre Keratinozyten wurden mit 10 μ M N-Oleylethanolamin (schwarzer Balken) für 24 Stunden stimuliert, die Ceramid-Bildung wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen (weißer Balken) gemessen. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



E: Primäre Keratinozyten wurden mit 10 μ M N-Oleylethanolamin (graue Quadrate) oder 10 μ M C6-Ceramid (schwarze Kreise) für die angegebenen Zeiträume stimuliert und die ICAM-1 / β -Aktin Expression bestimmt. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



F: Primäre Keratinozyten wurden mit 10 µM N-Oleoylethanolamin für 24 Stunden stimuliert und hinsichtlich der Induktion von Apoptose (TUNEL-Nachweis) analysiert. Als positive Kontrolle für die Induktion der Apoptose diente eine Behandlung mit Dnase I. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.



G: Die Viabilität der primären Keratinozyten wurde 24 Stunden nach der Stimulation mit N-Oleoylethanolamin mit dem MTT-Nachweis ermittelt. Staurosporin (4 µM) diente als Kontrolle für die Induktion von Zytotoxizität. Hier ist jeweils 1 von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wiedergegeben.

nicht auf dem Unvermögen der Keratinozyten, in den programmierten Zelltod zu gehen, da im selben Versuch sehr wohl Apoptose in diesen Keratinozyten durch die Gabe von Camptothecin, Staurosporin oder durch Ceramide in 10-fach höheren Konzentrationen induziert werden konnte (Abb. 4.10C-E und 4.11A). Darüber hinaus gab es keinen Hinweis auf Apoptose-unabhängigen Zelltod in den Ceramid-stimulierten Zellen, während Staurosporin eine signifikante Zytotoxizität aufwies (Abb. 4.10F). Daraufhin untersuchten wir die Frage, ob C6-Ceramide in der Lage sind, ICAM-1 Expression in anderen Zellen oder Zelltypen zu induzieren, ohne Apoptose hervorzurufen. Wie schon für Keratinozyten beobachtet, führt eine Stimulation von humanen dermalen Fibroblasten mit zellpermeablen Ceramiden in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und 10 µM zu einer konzentrationsabhängigen bis zu 15-fachen Induktion der ICAM-1 Expression, ohne gleichzeitig Apoptose auszulösen. Für die Induktion von Apoptose wurden dreifach höhere Konzentrationen von zellpermeablen Ceramiden benötigt (Abb. 4.11C).

Diese dreifach höheren Konzentrationen zur Induktion von Apoptose in Keratinozyten standen im Gegensatz zu den Effekten, die in der humanen von Epithelzellen abgeleiteten HeLa Zelllinie beobachtet wurden. Für die HeLa-Zellen konnten keine Unterschiede zwischen den Dosis-Wirkungskurven für die C6-Ceramid-induzierte ICAM-1 mRNA Expression und die C6-Ceramid-induzierte Apoptose (Abb. 4.11B) verzeichnet werden.

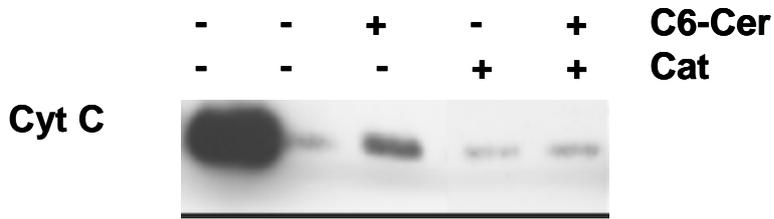
An diesem Punkt sollte nicht unerwähnt bleiben, dass die Aufregulation der ICAM-1 Expression in den Keratinozyten auch mit der Erhöhung der endogenen Ceramidspiegel nach Behandlung mit dem Inhibitor für die saure Ceramidase N-Oleoylethanolamin (Corsini *et al.*, 199 Pahan *et al.*, 1998) erzielt werden konnte. Wie in Abb. 4.11D zu sehen ist, erhöht eine Behandlung mit N-Oleoylethanolamin den endogenen Ceramidspiegel um den Faktor 2, und diese Erhöhung ging mit einer erhöhten ICAM-1 mRNA Expression einher (Abb. 4.11E). Der zeitliche Verlauf der C6-Ceramid-induzierten und N-Oleoylethanolamin-induzierten ICAM-1 Expression war im wesentlichen identisch, während das Ausmaß der ICAM-1 mRNA Antwort nach Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels das nach Zugabe von zellpermeablen Ceramiden überstieg. Hierbei ist zu beachten, dass die Behandlung der Keratinozyten mit N-Oleoylethanolamin nicht zur Induktion von Apoptose (Abb. 4.11F) oder zu einer Reduktion der Viabilität der Zellen (Abb. 4.11G) führte.

4.8 Cytochrom C-Freisetzung ist notwendig für die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 und die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression

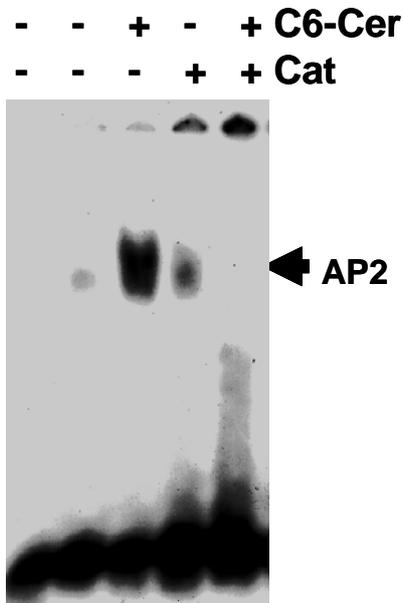
Die Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma erfolgt über die mitochondriale Megapore, die aus Proteinen der inneren mitochondrialen Membran einschließlich dem Adenin-Nukleotidtranslokator und aus Proteinen der äußeren mitochondrialen Membran wie dem spannungsabhängigen Anionenkanal (Kroemer *et al.*, 1997; Martinou, 1999) gebildet wird. Um die funktionelle Bedeutung der Ceramid-induzierten Cytochrom C-Freisetzung für die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 und die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression zu analysieren, wurden die primären Keratinozyten mit Carboxyatractylosid, einem Hemmstoff für den Adenin-Nukleotidtranslokator (Huber *et al.*, 1999)

oder Bonkretinsäure, das den spannungsabhängigen Anionenkanal zu hemmen vermag, behandelt (Huber *et al.*, 1999). Für beide Inhibitoren ist gezeigt worden, dass sie den Transport von Nukleotiden über den mitochondrialen ADP / ATP Transporter hemmen (Brustovetsky *et al.*, 1996; Gropp *et al.*, 1999). Wie erwartet enthielten zytosolische Extrakte von Zellen, die mit Ceramid stimuliert worden waren, und frei von mitochondrialen Kontaminationen waren (Daten nicht gezeigt), steigende Mengen an Holocytochrom C im Vergleich zu Extrakten von unstimulierten Zellen. Dieser Anstieg der Holocytochrom C-Freisetzung konnte gehemmt werden, wenn die Ceramid-stimulierten Zellen mit Carboxyatractylosid oder Bonkretinsäure vorbehandelt wurden (Abb. 4.12A und 4.13A). Die beobachteten höher molekularen Banden wurden schon früher beschrieben; sie entstehen durch die Bildung von Multimeren des Cytochrom C und durch die kurze Kette von IgG (Gallagher *et al.*, 2001). Wir sind uns bewusst, dass Ceramide die Bildung von Poren in Phospholipidmembranen induzieren können und damit die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran in isolierten Mitochondrien erhöhen können (Siskind & Colombini, 2000; Siskind *et al.*, 2002). Aus den in den Abbildungen 4.12A und 4.13A dargestellten Ergebnissen wird jedoch deutlich, dass in unserem System die Ceramid-induzierten Cytochrom C-Freisetzung durch eine Mitwirkung der mitochondrialen Megapore geschieht. Die Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung durch Bonkretinsäure oder Carboxyatractylosid war in beiden Fällen mit einer Hemmung der Ceramid-induzierten AP2-Aktivierung (4.12B und 4.13B) und einer Hemmung der Ceramid-induzierten ICAM-1 Expression (4.12C und 4.13C) verbunden. Diese inhibitorischen Effekte waren spezifisch, da gleiche Konzentrationen der Inhibitoren Bonkretinsäure oder Carboxyatractylosid nicht in der Lage waren, die Interferon- γ -induzierte ICAM-1 mRNA Expression zu hemmen (Abb. 4.14A,B). Ebenso konnte eine Behandlung mit Bonkretinsäure oder Carboxyatractylosid die Viabilität von Ceramid-stimulierten Keratinozyten vermindern (Abb. 4.10F). Zusammengenommen deuten diese Befunde darauf hin, dass die Translokation von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma für die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 und die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression notwendig ist.

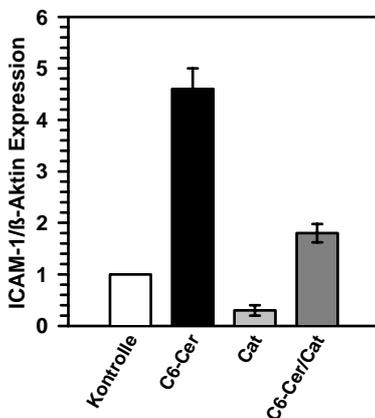
Abbildung 4.12: Der Hemmstoff Carboxyatractylosid (Cat) der mitochondrialen Megapore verhindert die Ceramid-induzierte Cytochrom C Freisetzung, die Ceramid-induzierte AP2 Aktivierung und die Ceramid-induzierte ICAM-1 mRNA Expression.



A: Immunfällung von Cytochrom C aus zytosolischen Extrakten von mit 10 μ M C6-Ceramid stimulierten Keratinozyten, von Keratinozyten nach Präinkubation mit 20 μ M Cat für 90 Minuten oder von Keratinozyten nach Präinkubation mit 20 μ M Cat für 90 Minuten und anschließender Stimulation mit 10 μ M C6-Ceramid. Die Zellen wurden direkt 30 Minuten bezogen auf die Stimulation mit C6-Ceramid geerntet. 100 ng humanes rekombinantes Cytochrom C diente als Kontrolle (Cyt C).

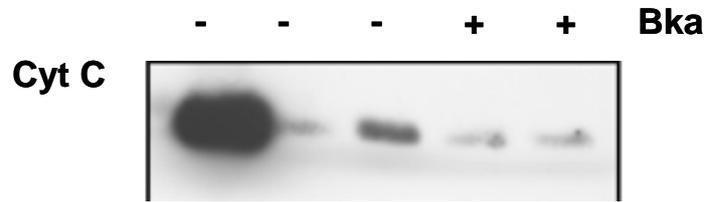


B: Gelretardierungsexperiment zum Nachweis der Aktivierung von AP2 mit nuklearen Extrakten von in gleicher Weise wie für die Immunfällung behandelten Zellen.

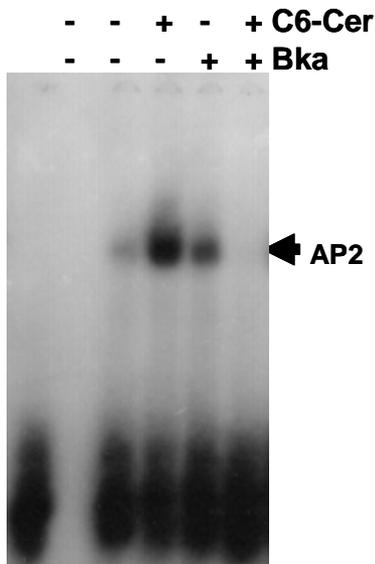


C: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten, die in gleicher Weise wie für die Immunfällung beschrieben, behandelt wurden. Die Zellen wurden jedoch 2 Stunden nach der Stimulation mit C6-Ceramid geerntet.

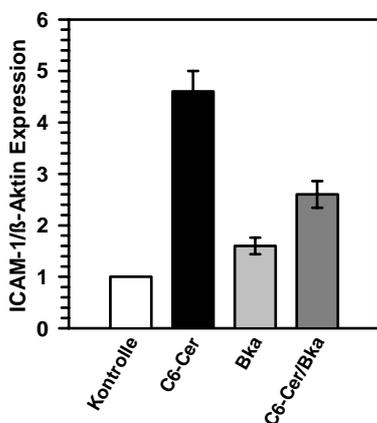
Abbildung 4.13: Der Hemmstoff der mitochondrialen Megapore Bonkretinsäure (Bka) verhindert die Ceramid-induzierte Cytochrom C Freisetzung, die Ceramid-induzierte AP2 Aktivierung und die Ceramid-induzierte ICAM-1 mRNA Expression.



A: Immunfällung von Cytochrom C aus zytosolischen Extrakten von mit 10 μ M C6-Ceramid stimulierten Keratinozyten, von Keratinozyten nach Präinkubation mit 5 μ M Bka für 90 Minuten oder von Keratinozyten nach Präinkubation mit 5 μ M Bka für 90 Minuten und anschließender Stimulation mit 10 μ M C6-Ceramid. Die Zellen wurden nach 30 Minuten Stimulation mit C6-Ceramid geerntet. 100 ng humanes rekombinantes Cytochrom C diente als Kontrolle (Cyt C).

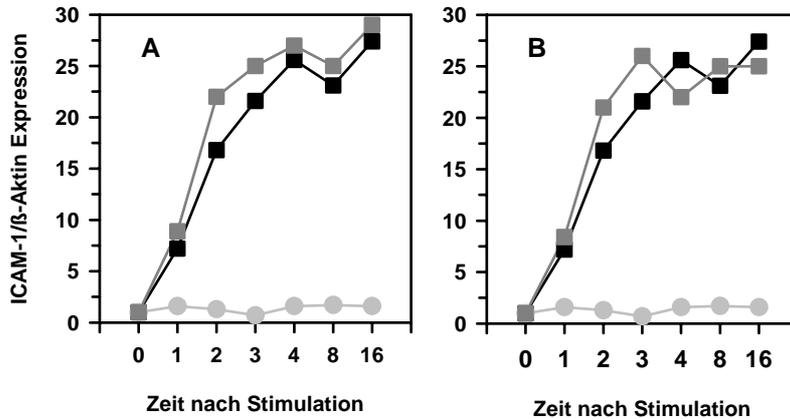


B: Gelretardierungsexperiment zum Nachweis der Aktivierung von AP2 mit nuklearen Extrakten von in gleicher Weise wie für die Immunfällung behandelten Zellen.



C: ICAM-1 / β -Aktin Expression in Keratinozyten, die wie für die Immunfällung beschrieben behandelt wurden. Die Zellen wurden jedoch 2 Stunden nach Stimulation mit C6-Ceramid geerntet.

Abbildung 4.14: Die Hemmung der mitochondrialen Megapore inhibiert nicht die Interferon γ -induzierte ICAM-1 Expression.



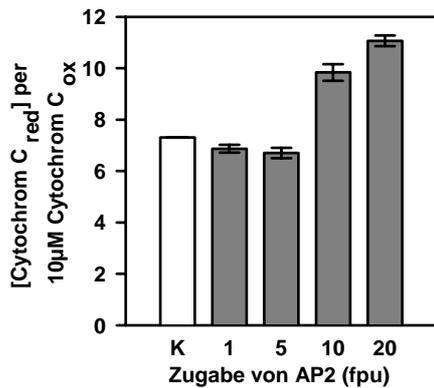
Die Interferon γ -induzierte ICAM-1/β-Aktin Expression (schwarze Quadrate) wurde in primären Keratinozyten nach Stimulation mit 1000U/ml in Gegenwart und Abwesenheit von Inhibitoren der mitochondrialen Megapore untersucht. **A:** Präinkubation mit 20 μM Cat für 90 Minuten (graue Kreise) oder nach der Kombination von Präinkubation mit Cat und anschließender Stimulation mit Interferon- γ (dunkelgraue Quadrate). **B:** Präinkubation mit 5 μM Bka für 90 Minuten (graue Kreise) oder nach der Kombination von Präinkubation mit Bka und anschließender Stimulation mit Interferon- γ (dunkelgraue Quadrate).

4.9 Cytochrom C-induzierte Oxidation von AP2 verstärkt seine DNS-Bindungsfähigkeit

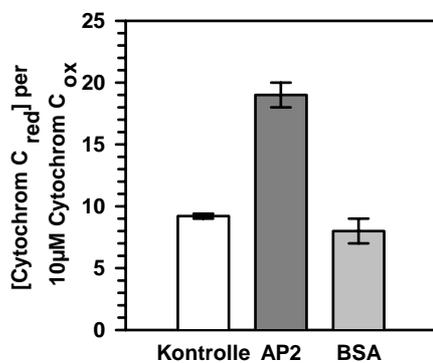
Um den Mechanismus zu studieren, der nach der Freisetzung von Cytochrom C für die Aktivierung von AP2 verantwortlich ist, haben wir *in vitro* Koinkubationsexperimente von Cytochrom C mit humanem rekombinantem AP2 durchgeführt. Die photometrische Analyse des Redoxzustandes von Cytochrom C deutet darauf hin, dass die Zugabe von steigenden Konzentrationen von humanem rekombinantem AP2 dosisabhängig zur Reduktion von Cytochrom C führte (Abb. 4.15A). Diese Redoxregulation wurde nicht induziert, wenn äquivalente Mengen an Rinderserumalbumin zu dem Cytochrom C zusetzt wurden (Abb. 4.15B). Redoxregulation ist einer der Wege, auf denen Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können (Piette *et al.*, 1997). Deshalb haben wir darauf hin die Bedeutung der Cytochrom C Koinkubation für die DNS-Bindungsfähigkeit von AP2 untersucht. Wie in Abb. 4.15C zu sehen ist, ist die DNS-Bindungsfähigkeit von humanem rekombinantem AP2 an seine vom ICAM-1 Promotor abgeleitete Erkennungssequenz deutlich erhöht, wenn das humane rekombinante AP2 zuerst in Gegenwart von Cytochrom C vorinkubiert wurde, um die Oxidation des AP2 zu ermöglichen. Tatsächlich war die DNS-Bindungsfähigkeit des oxidierten AP2 deutlich höher als die DNS-Bindungsfähigkeit der doppelten Menge an nicht oxidiertem AP2.

Um die *in vivo* Bedeutung des Redoxzustandes von AP2 für die Ceramid-induzierte Genexpression in primären Keratinozyten zu analysieren, verglichen wir zunächst Genexpressionsmuster in primären Keratinozyten mit den Mustern in der epidermoiden Keratinozytenlinie KB. Diese Zelllinie, die zuvor schon für Studien über zytokininduzierte ICAM-1 Expression als Modell verwendet wurde, unterscheidet sich hinsichtlich ihres Antioxidansstatus von primären Keratinozyten, sie besitzen einen vierfach höheren Glutathiongehalt (Abb. 4.16A). Wir spekulierten, dass ein erhöhter endogener Glutathiongehalt die redoxabhängige AP2 Aktivierung hemmt und damit die Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression in diesen Zellen verhindern kann. Wie in Abb. 4.16B zu sehen ist, führte eine Stimulation mit Ceramiden in KB-Zellen nicht zur Induktion der ICAM-1 Expression, aber diese Zellen konnten für die Ceramidantwort sensibilisiert werden, wenn ihr endogener Glutathiongehalt durch eine Vorbehandlung mit Buthioninsulfoximin,

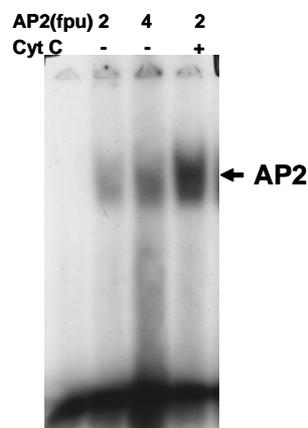
Abbildung 4.15: Oxidation von AP2 durch Cytochrom C *in vitro* ist dosisabhängig, spezifisch und erhöht seine DNS-Bindungsfähigkeit.



A: In einer Lösung aus 10 μM oxidiertem Cytochrom C (Cytochrom C_{ox}) wurde der Gehalt an reduziertem Cytochrom C (Cytochrom C_{red}) spektrophotometrisch bei 550 nm bestimmt. Cytochrom C-haltige Lösungen wurden unbehandelt belassen (K = Kontrolle) oder mit steigenden Mengen an humanem rekombinantem AP2 (quantifiziert als sog. Footprint-Einheiten; 0,5 fpu/μl; ~ je nach Charge 20-150 ng Protein). Einfaches und vielfache Mengen wurden jeweils aus derselben Charge genommen.



B: In einer Lösung mit 10 μM Cytochrom C (Cytochrom C_{ox}) wurde der Gehalt an reduziertem Cytochrom C (Cytochrom C_{red}) photometrisch bei 550 nm bestimmt. Cytochrom C Lösung blieb dabei unbehandelt (Kontrolle) oder wurde mit 10 fpu humanem rekombinantem AP2 oder äquimolaren Mengen an Rinderserumalbumin koinkubiert.

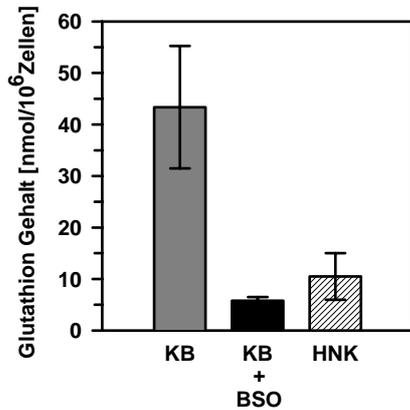


C: Gelretardierungsexperiment mit radioaktiv markiertem AP2 Konsensusoligonukleotid, das entweder nur in Puffer (Spur 1), mit humanem rekombinantem AP2 (Spur 2), mit der doppelten Menge an AP2 (Spur 3) oder mit AP2, das mit Cytochrom C vorinkubiert worden war (Spur 4), inkubiert wurde.

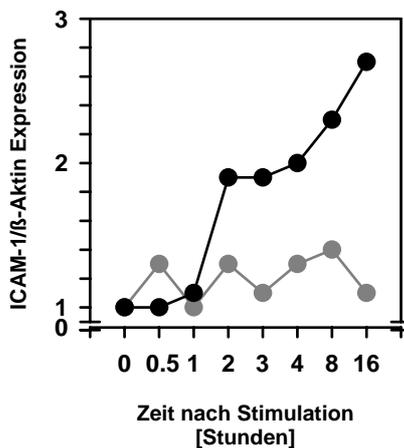
einem potenten Inhibitor der Glutathionsynthese (Herrera *et al.*, 2001), zuvor erniedrigt worden war (Abb. 4.16A). Umgekehrt konnten primäre Keratinozyten für eine Ceramid-induzierte ICAM-1 Expression desensibilisiert werden, wenn ihr endogener Glutathiongehalt erhöht wurde. Entsprechend führte die Zugabe von N-Acetyl-L-Cystein in primären Keratinozyten zu einer Erhöhung des endogenen Glutathiongehaltes um 30 % (Daten nicht gezeigt). Dieser Anstieg im Glutathiongehalt ging mit einem Verlust der Fähigkeit zur ICAM-1 Expression als Antwort auf eine Ceramid-Stimulation einher (Abb. 4.16C). Diese *in vivo* Befunde deuten

darauf hin, dass der Antioxidansstatus der Keratinozyten, ihre Fähigkeit die AP2-abhängige Gentranskription nach Ceramid-Stimulation zu steigern, bestimmt.

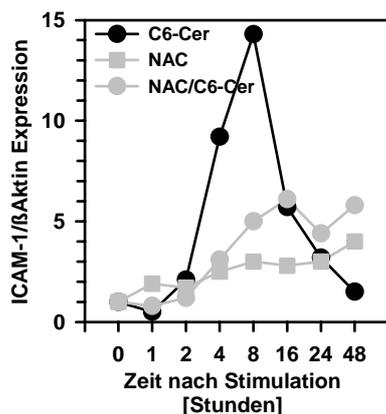
Abbildung 4.16: Der endogene Glutathiongehalt bestimmt die Reaktivität gegenüber Ceramid-induzierter ICAM-1 Expression



A: Glutathiongehalt (GSH+GSSG) in nmol/10⁶ Keratinozyten oder KB-Zellen +/- Vorinkubation mit Buthioninsulfoximin (BSO; 1 mM) für 24 Stunden. Diese Daten umfassen Ergebnisse aus 3 Experimenten.



B: ICAM-1 / β-Aktin Expression in mit 10 μM C6-Ceramid stimulierten KB-Zellen + (schwarze Kreise) /- (graue Kreise) Vorbehandlung mit Buthioninsulfoximin (BSO; 1mM) für 24 Stunden. Diese Daten umfassen Ergebnisse aus 3 Experimenten.



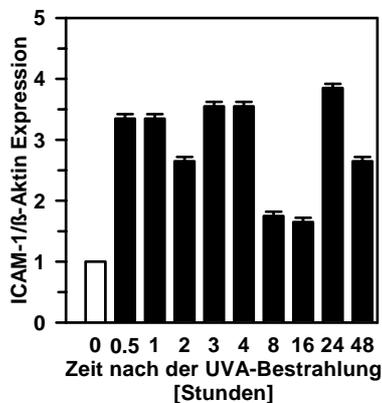
C: ICAM-1 / β-Aktin Expression in mit 10 μM C6-Ceramid stimulierten Keratinozyten + (graue Kreise) /- (schwarze Kreise) Vorbehandlung mit N-Acetylcystein (NAC, 20 μM) für 16 Stunden. Die Kontrolle, die nur mit N-Acetylcystein vorbehandelt wurde, ist mit grauen Quadraten gekennzeichnet. Diese Daten umfassen Ergebnisse aus 3 Experimenten.

4.10 Zeitlicher Verlauf der UVA-induzierten ICAM-1 mRNA Expression und der Ceramid-Bildung

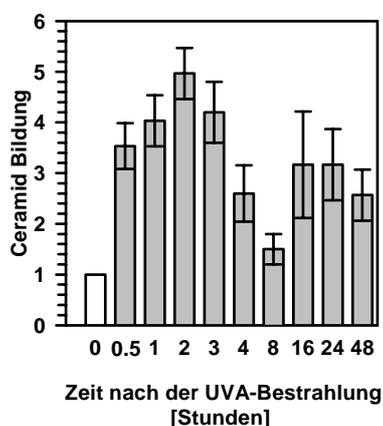
UVA-Strahlung induziert Genexpression in menschlichen Zellen auf eine biphasische Weise (Grether-Beck *et al.*, 1996; Gille *et al.*, 2000). Entsprechend wird die Gleichgewichtskonzentration von ICAM-1 innerhalb eines Zeitraumes von 2 bis 4 Stunden nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 30 J/cm² aufreguliert. Diese Dosis hatte sich in früheren Untersuchungen als geeignet erwiesen, um die Genexpression in diesen Zellen zu induzieren. Auf das erste Maximum folgte nach 24 Stunden ein zweiter Anstieg (Abb. 4.17A). Bei der Messung des zeitlichen Verlaufs der Ceramid-Bildung im Vergleich zur biphasischen

Abbildung 4.17: UVA-Bestrahlung führt zu einer biphasischen Aufregulierung von ICAM-1 mRNA und einer biphasischen Bildung Ceramiden in Keratinozyten:

Keratinozyten wurden mit 30 J/cm² UVA bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Ergebnisse der bestrahlten Keratinozyten (schwarze Balken für A, graue Balken für B) werden als Vielfaches im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (weißer Balken) wiedergegeben.



A: ICAM-1 mRNA Expression wurde mit Real-time RT-PCR basierend auf dem Haushaltsgen β-Aktin ermittelt.



B: Ceramid-Bildung wurde in Proben (basierend auf 500 µg Proteingehalt) nach einer Folch Extraktion (siehe 3.3.10) mit HPTLC bestimmt.

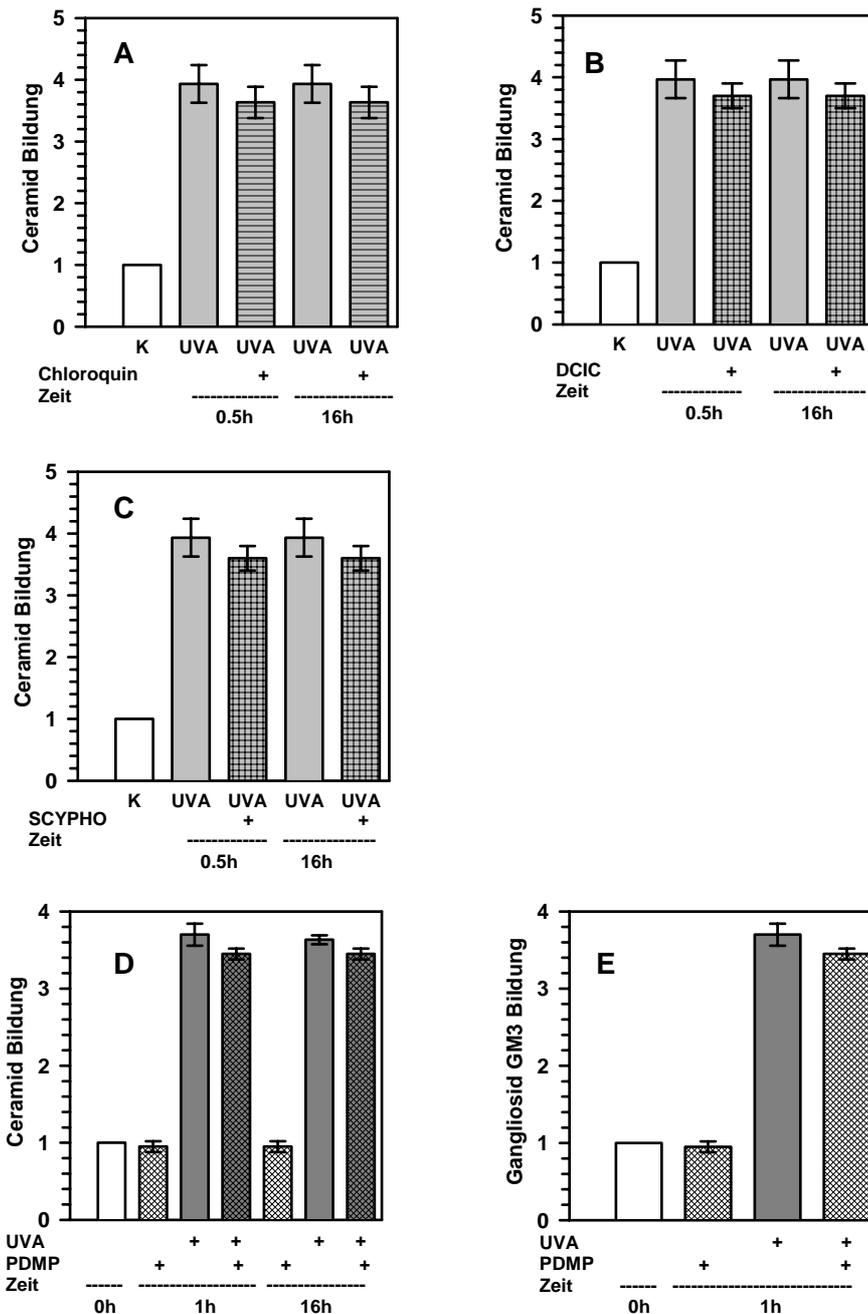
ICAM-1 mRNA Expression beobachten wir nun ebenfalls eine biphasische Kinetik. Eine Bestrahlung der Keratinozyten mit einer identischen Dosis UVA von 30 J/cm^2 führte in Bestätigung unserer früheren Arbeiten (Grether-Beck *et al.*, 2000) zu einem fünffachen Anstieg der Ceramid-Bildung zwischen 30 Minuten und 2 Stunden. Diesem ersten Anstieg folgte eine zweite, eher verzögerte Erhöhung der Ceramid-Bildung innerhalb eines Zeitraumes zwischen 16 und 48 Stunden nach der Bestrahlung (Abb. 4.17B).

4.11 UVA-induzierte Ceramid-Bildung wird durch nicht-enzymatische und enzymatische Mechanismen vermittelt

Ceramide können durch Sphingomyelinasen gebildet werden, die Sphingomyelin hydrolysieren und dabei zur Bildung von Ceramiden und Phosphorylcholin führen (Kim *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1998; Levade & Jaffrézu, 1999). Wir hatten zuvor zeigen können, dass die UVA-induzierte Ceramid-Bildung innerhalb der ersten 2 Stunden nach der Bestrahlung (= frühe Ceramidantwort) nicht durch diese Mechanismen katalysiert wird, da UVA-induzierte Ceramid-Bildung nicht mit einer erhöhten Enzymaktivität für neutrale oder saure Sphingomyelinase in UVA-bestrahlten Zellen einherging und die Ceramid-Bildung auch in einem proteinfreien System beobachtet werden konnte (Grether-Beck *et al.*, 2000). Diese Schlussfolgerung wird durch die gegenwärtigen Befunde weiter erhärtet, dass weder Chloroquin, ein bekannter Inhibitor der sauren Sphingomyelinase (Bonizzi *et al.*, 1997) noch Dichloroisocoumarin (DCIC), ein spezifischer Hemmstoff der neutralen Sphingomyelinase (Mansat *et al.*, 1997), in der Lage waren, die UVA-induzierte Ceramid-Bildung 30 Minuten nach der Bestrahlung zu hemmen, obwohl im selben Versuchsansatz (Abb. 4.18A,B) beide Inhibitoren in gleichen Konzentrationen die Sphingomyelinase-vermittelte IL-1 β -induzierte Ceramid-Bildung signifikant hemmen konnten (Grether-Beck *et al.*, 2000; Bonizzi *et al.*, 1997). In gleicher Weise konnte keiner der beiden Inhibitoren die UVA-induzierte Ceramid-Bildung 16 Stunden nach der Bestrahlung beeinflussen, dies deutet darauf hin, dass weder der erste noch der späte zweite Anstieg der Ceramid-Bildung eine Aktivierung von Sphingomyelinasen beinhalten (Abb. 4.18A, B). Identische Resultate wurden erzielt, wenn Scyphostatin (Brann *et al.*, 2002; Czar

Abbildung 4.18: UVA-induzierte Bildung von Ceramiden wird weder durch Hydrolyse von Sphingomyelin noch durch Abbau von Glycosphingolipiden verursacht.

Ceramid-Bildung wurde in primären Keratinozyten 30 Minuten und 16 Stunden nach der UVA-Bestrahlung mit 30 J/cm^2 (hellgraue Balken) +/- Vorbehandlung mit Inhibitoren für (A) saure Sphingomyelinase wie Chloroquin ($100 \mu\text{M}$) für 1 Stunde, mit Inhibitoren für (B) neutrale Sphingomyelinase wie 3,4-Dichloroisocoumarin (DCIC, $20 \mu\text{M}$) für 30 Minuten oder (C) Scyphostatin ($1 \mu\text{M}$) für 1 Stunde, mit Inhibitoren für (D) Glucosylceramidsynthase wie D,L-threo-PDMP ($10 \mu\text{M}$) für 2 Stunden untersucht. (E) Die Quantifizierung von GM3, dem häufigsten Gangliosid in Keratinozyten, wurde als positive Kontrolle für die Wirkung des Hemmstoffes D,L-threo-PDMP verwendet. Die Daten wurden in 3 Experimenten erhoben.



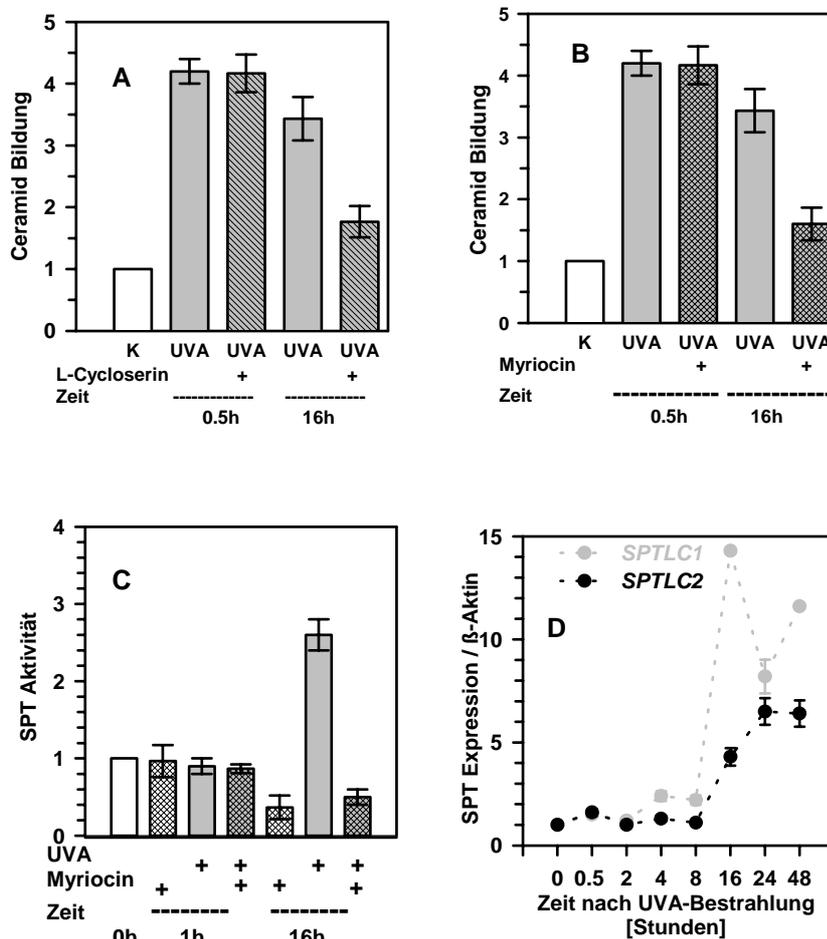
ny *et al.*, 2003; Numakawa *et al.*, 2003) (Abb. 4.18C) oder Spiroepoxid, zwei sehr spezifische Inhibitoren der neutralen Sphingomyelinase, verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

Da Ceramide auch über den Abbau von Glycosylceramiden gebildet werden können, stellten wir uns die Frage, ob der beobachtete Anstieg der Ceramide nach UVA-Bestrahlung durch diesen Mechanismus verursacht wird. Zu diesem Zweck wurden Keratinozyten mit *D,L-threo*-PDMP (*D-threo*-(1R,2R)-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol), einem Inhibitor der Biosynthese von Glucosylceramid, dem gemeinsamen Vorläufer aller Glycosphingolipide in Wirbeltieren (Sandhoff und Kolter, 2003; Kolter *et al.*, 2002), vorbehandelt. Wie in Abbildung 4.18D zu sehen ist, konnte eine Vorbehandlung mit *D,L-threo*-PDMP (*D-threo*-(1R,2R)-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropan-1-ol) die UVA-induzierte Ceramid-Bildung zu den untersuchten Zeitpunkten nicht beeinflussen. In diesen Experimenten zeigte der Inhibitor seine Wirkung (Abb. 4.18E) durch die Reduktion der Bildung von Gangliosiden wie dem vorherrschenden Gangliosid in der Epidermis GM3 (NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1-Cer).

Der dritte Weg für die Bildung von Ceramiden ist die *de novo*-Synthese (Bose *et al.*, 1995; Perry *et al.*, 2000). Dieser Weg beginnt mit der durch die Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase katalysierten Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin. Nach der Reduktion zum Dihydrosphingosin und der anschließenden Umwandlung zu Dihydroceramid durch die Ceramidsynthase wird Ceramid durch die Oxidation von Dihydroceramid infolge der Einführung einer Doppelbindung gebildet. Wir hatten zuvor beobachtet, dass UVA-Bestrahlung nach 30 Minuten nicht zu einem Anstieg der Aktivität von Ceramid-synthase führt und dass die Zugabe des natürlichen Inhibitors der Ceramid-synthase, Fumonisin B1 (Merrill *et al.*, 1993), nicht die frühe Ceramidantwort zu modulieren vermag. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit der gegenwärtigen Beobachtung, dass die erste Ceramidantwort nicht durch die Behandlung mit dem Serin-Palmitoyltransferaseinhibitor L-Cycloserin (Sundaram & Lev, 1984 a, b) beeinflusst werden konnte (Abb. 4.19.A). Ebenso konnte keine Hemmung der UVA-induzierten frühen Ceramid-Bildung mit dem sehr spezifischen Inhibitor Myriocin (Myriake *et al.*, 1995) erzielt werden (Abb. 4.18B). Im Gegensatz dazu

Abbildung 4.19: Der zweite Ceramid-Anstieg entsteht durch Ceramidneusynthese.

Primäre Keratinozyten wurden mit Inhibitoren der Ceramidneusynthese wie **(A)** L-Cycloserin (2 mM) oder **(B)** Myriocin (5 μ M) für 30 Minuten vor der UVA-Bestrahlung (30 J/cm²) vorbehandelt oder unbehandelt belassen. Die Keratinozyten wurden 30 Minuten oder 16 Stunden nach der Bestrahlung geerntet und wie in 3.3.10 beschrieben aufgearbeitet. Die Daten werden im Vergleich zu unbehandelten Zellen (weiße Balken) wiedergegeben. Die Enzymaktivität der Serin-Palmitoyltransferase **(C)** wurde aus mikrosomalen Extrakten basierend auf 50 μ g Proteingehalt in unbehandelten (weiße Balken), UVA-bestrahlten (hellgraue Balken) oder UVA und Myriocin behandelten (hellgrau schraffierte Balken) oder nur Myriocin behandelten Zellen (schraffierte Balken) bestimmt. Die UVA-induzierte mRNA Expression der Serin-Palmitoyltransferase-Untereinheiten SPTLC 1 (graue Kreise) und SPTLC 2 (schwarze Kreise) wurde mit Real-time RT-PCR gemessen.



konnten beide Hemmstoffe die zweite, späte Ceramid-Antwort 16 Stunden nach der UVA-Bestrahlung inhibieren (Abb. 4.19A,B).

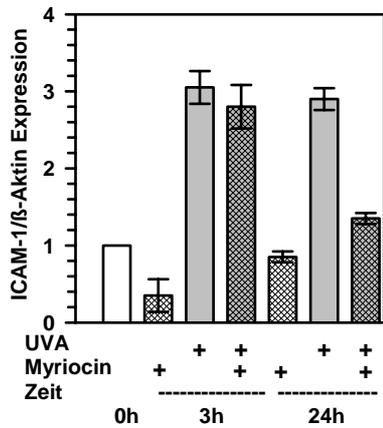
Eine dreifache Erhöhung der Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität wurde 16 Stunden nach der Bestrahlung gefunden; dies steht im Gegensatz zu den Befunden bei 1 Stunde nach der Bestrahlung, zu welchem Zeitpunkt sich keine erhöhte Enzymaktivität nachweisen ließ (Abb. 4.19C). Der späte Anstieg der Enzymaktivität ging mit einer Induktion der mRNA Expression der beiden Untereinheiten, die für die Serin-Palmitoyltransferase kodieren, einher (Abb. 4.19D). Die SPTLC1-Untereinheit wurde 14-fach induziert, während SPTLC2 eine 7-fache Aufregulation zeigte. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der zweite Ceramidanstieg dadurch hervorgerufen wird, dass die UVA-Bestrahlung den Verbrauch von Ceramid für die Sphingomyelinsynthese oder die Glycosphingolipidsynthese unterbricht. Dies ist jedoch recht unwahrscheinlich, da wir zu diesen späten Zeitpunkten keine Verminderung der Sphingomyelin- oder der Glycosphingolipidmengen in den UVA-bestrahlten Zellen verzeichnen konnten (Daten nicht gezeigt).

4.12 Die Bedeutung der späten Ceramidantwort in der UVA-induzierten Genexpression

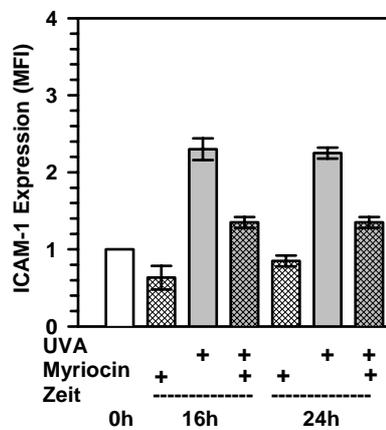
Die Beobachtung, dass die späte nicht aber die frühe Ceramidantwort durch die Zugabe des Hemmstoffes Myriocin gehemmt werden konnte, erlaubt es uns, die Bedeutung des zweiten Ceramidanstieges für die UVA-induzierte Genexpression zu untersuchen. Wie in den Abb. 4.20A und Abb. 4.20B zu sehen ist, konnte durch die Zugabe von Myriocin in Konzentrationen, die die UVA-induzierte Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität (Abb. 4.19C) und die Bildung von Ceramiden (Abb. 4.19B) zu hemmen vermochte, die Aufregulation von ICAM-1 mRNA Expression und die Proteinexpression 16 und 24 Stunden nach der UVA-Bestrahlung inhibiert werden.

Im Gegensatz dazu wurde die 3 Stunden nach der UVA-Bestrahlung beobachtete ICAM-1 mRNA Expression nicht beeinflusst. Darüber hinaus hemmte Myriocin in den eingesetzten Konzentrationen die UVA-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 - wie im Gelretardierungsexperiment dargestellt - 16 und 24 Stunden nach der UVA-Bestrahlung (Abb. 4.20C).

Abbildung 4.20: Bedeutung der zweiten Ceramidantwort für die UVA-induzierte Genexpression



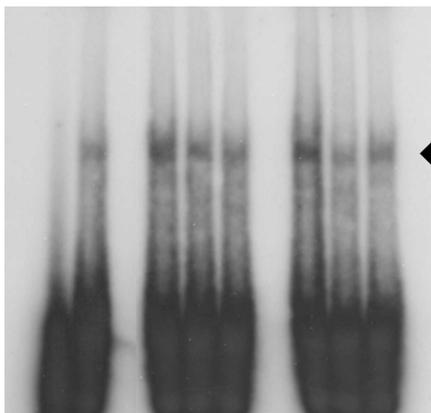
A: UVA-induzierte ICAM-1 mRNA Expression (hellgraue Balken) wurde mit Real-time RT-PCR bestimmt.



B: UVA-induzierte ICAM-1 Oberflächen-expression (hellgraue Balken) wurde als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflußzytometrisch bestimmt. Beide Experimente erfolgten in Gegenwart und Abwesenheit des Serin-Palmitoyltransferaseinhibitors Myriocin (5 µM, 30 Minuten Vorbehandlung). Die Zellernte erfolgte zu den angezeigten Zeitpunkten. Die Ergebnisse werden bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (weiße Balken) wiedergegeben.

0	16			24			h
-	+	-	+	+	-	+	UVA
-	-	+	+	-	+	+	Myr

C: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 wurde in Nuklearextrakten von Keratinozyten bestimmt, die, wie angezeigt, behandelt worden waren. Das Autoradiogramm gibt eines von 3 im wesentlichen identischen Experimenten wieder.



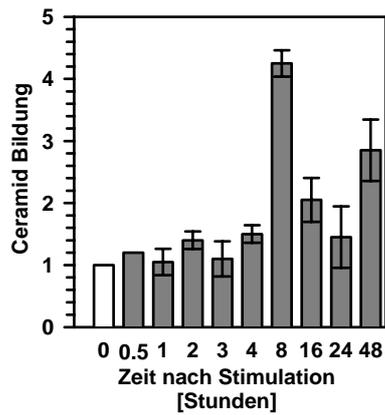
← AP-2

4.13 Wirkung von Ceramiden auf die Ceramidsynthese und die Aktivierung von Serin-Palmitoyltransferase

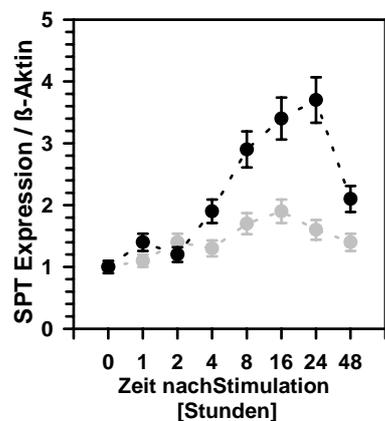
Um zu untersuchen, ob der erste und der zweite Ceramidanstieg in UVA-bestrahlten Keratinozyten zusammenhängen, haben wir Keratinozyten unbehandelt belassen oder die UVA-Bestrahlung zur Simulation des ersten Ceramidanstiegs durch die Zugabe von zellpermeablen C6-Ceramiden ersetzt. Anschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Ceramid-Bildung untersucht. Die Zugabe von zellpermeablen Ceramiden, nicht aber Vehikelkontrollen (Äthanol) führten zu einem Anstieg der Ceramid-Bildung mit einem 4-fachen Maximum 8 Stunden nach der Ceramidzugabe in einer zeitabhängigen Weise (Abb. 4.21A). Die Antwort war langanhaltend, da die Ceramidgehalte 48 Stunden nach der Behandlung immer noch 3-fach über der Hintergrundkontrolle lagen. Die Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung ging mit einem Ansteigen der mRNA Expression für die Serin-Palmitoyltransferase-Untereinheiten *SPTLC1* (2-fach) und *SPTLC2* (4-fach) zwischen 4 und 48 Stunden und einem Maximum bei 24 Stunden einher (Abb. 4.21B). Zusätzlich wurde ein 2,5-faches Ansteigen der Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität 16 Stunden nach der Zugabe von zellpermeablen Ceramiden beobachtet (Abb. 4.21C).

Deshalb untersuchten wir zunächst die Wirkung von Myriocin auf die Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung. Wie in Abb.4.21D zu sehen ist, hebt die Zugabe von Myriocin die Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung 16 Stunden nach der Stimulation mit den zellpermeablen Ceramiden vollkommen auf. Zusammengenommen deuten diese Befunde darauf hin, dass die Stimulation von Keratinozyten mit exogenen Ceramiden die Ceramid *de novo* Synthese in menschlichen Keratinozyten durch die Induktion und Aktivierung der Serin-Palmitoyltransferase zu induzieren vermag. In dieser Hinsicht induzierte die Zugabe von exogenen Ceramiden einen der in UVA-bestrahlten Keratinozyten beobachteten späten Ceramidantwort ähnlichen Ceramidanstieg. Deshalb untersuchten wir, ob der in UVA-bestrahlten Keratinozyten auftretende erste Ceramidanstieg eine Voraussetzung für die Bildung der zweiten späten Ceramidantwort ist.

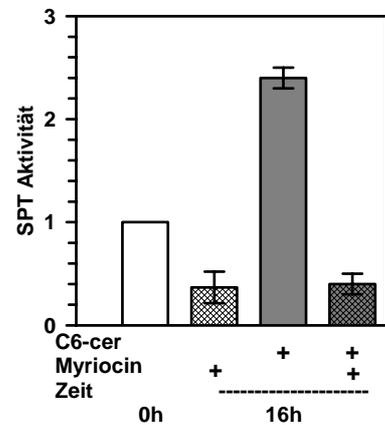
Abbildung 4.21: Wirkung von Ceramiden auf Ceramidsynthese und Aktivierung von Serin-Palmitoyltransferase



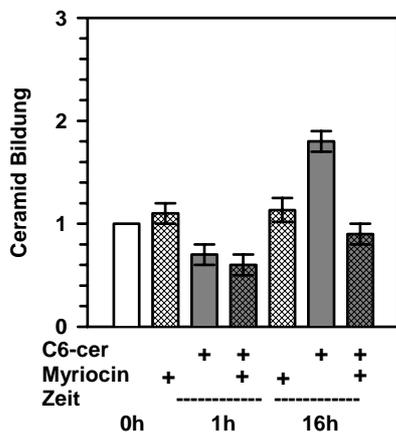
A: Zugabe von zellpermeablen Ceramiden (10 µM) ergab eine zeitabhängige Ceramid-Bildung (dunkelgraue Balken). Messung erfolgte wie in 3.3.10 beschrieben per HPTLC. Die Daten werden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (weiße Balken) wiedergegeben.



B: Aufregulation der Serin-Palmitoyltransferase mRNA Untereinheiten *SPTLC1* (hellgraue Kreise) und *SPTLC2* (schwarze Kreise) nach Stimulation mit zellpermeablen Ceramiden. Messung erfolgte wie in 3.3.5 beschrieben durch Real-time RT-PCR basierend auf dem Haushaltsgen β -Aktin.



C: Zugabe von C6-Ceramid führte in mikrosomalen Extrakten zur Induktion der Serin-Palmitoyltransferase-Enzymaktivität (dunkelgraue Balken). Dieser Effekt konnte durch eine Vorbehandlung mit Myriocin (5 µM, 30 Minuten, schraffierte Balken) gehemmt werden.



D: Zugabe von C6-Ceramid führte zur Bildung von Ceramiden (dunkelgraue Balken). Dieser Effekt konnte durch eine Vorbehandlung mit Myriocin (5 µM, 30 Minuten, schraffierte Balken) gehemmt werden.

4.14 Wirkung von Vitamin E, Ectoin und Cholesterol auf die UVA-induzierte und Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung

Aufgrund der nicht-enzymatischen Natur des frühen ersten Anstiegs (Grether-Beck *et al.*, 2000, Abb. 2, 3 und 4 bzw. Abb. 4.5, 4.6 und 4.7 in dieser Arbeit) und der enzymatischen Natur des späten zweiten Anstiegs haben wir eine Strategie verwendet, die es uns erlaubte, die erste Ceramidantwort aber nicht die *de novo* Synthese zu hemmen. In dieser Hinsicht hatten wir in früheren Arbeiten gezeigt, dass die frühe UVA-induzierte Ceramidantwort durch die Bildung von Singulett-sauerstoff vermittelt wurde und dass diese Antwort wirkungsvoll durch die Zugabe von Singulett-sauerstoffquenchern wie etwa Vitamin E (Grether-Beck *et al.*, 2000) gehemmt werden konnte. Zusätzlich haben wir kürzlich in unabhängigen Studien beobachtet, dass die Vorbehandlung von Keratinozyten mit dem Osmolyten Ectoin (Bünger *et al.*, 2001) oder dem Lipid Cholesterol (Grether-Beck und Krutmann, 2004; Manuskript eingereicht) die UVA-induzierte Genexpression durch die Hemmung der frühen Ceramidantwort zu hemmen vermag. Entspre-

Tabelle 4.4: Wirkung von Vitamin E, Ectoin und Cholesterol auf die UVA- und Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung

Stimulus	Zeit (h)	Ceramid-Bildung
keiner	1	1
UVA	1	3.0
Vitamin E	1	1.0
Ectoin	1	0.9
Cholesterol	1	1.2
Vitamin E / UVA	1	1.3
Ectoin / UVA	1	1.1
Cholesterol / UVA	1	0.9
keiner	16	1
UVA	16	2.5
Vitamin E	16	1.0
Ectoin	16	0.9
Cholesterol	16	1.3
Vitamin E / UVA	16	1.3
Ectoin / UVA	16	2.6
Cholesterol / UVA	16	2.4

Keratinozyten wurden entweder für 1 Stunde mit Vitamin E (25 μM), Ectoin (1 mM) oder Cholesterol (30 μM) vorbehandelt oder unbehandelt belassen bevor sie mit UVA (30 J/cm²) oder C2-Ceramid (10 μM) stimuliert wurden. Die Zellen wurden nach 1 oder 16 Stunden geerntet. Die Ceramid-Bildung wurde wie in 3.3.10 beschrieben gemessen. Der Ceramidgehalt wird als x-fache Induktion bezogen auf die unbehandelte Kontrolle angegeben. Die Ergebnisse stammen aus 4 im wesentlichen identischen Experimenten.

chend verhinderte eine Vorbehandlung von UVA-bestrahlten Keratinozyten mit Vitamin E, Ectoin oder Cholesterol die frühe, nicht-enzymatische Ceramid-Bildung (Tabelle 4.4). In allen drei Fällen war die Auslöschung der ersten Ceramidantwort mit der vollständigen Hemmung der späten zweiten Ceramidantwort verbunden. Dies wurde nicht durch eine Hemmung der Ceramid *de novo*-Synthese in menschlichen Keratinozyten erzielt, da weder Vitamin E, Ectoin noch Cholesterol die Ceramid-induzierte Ceramidsynthese nach Stimulation mit zell-permeablen C2-Ceramiden zu hemmen vermag (Daten werden für C2-Ceramid gezeigt, sind aber für Stimulation mit C6-Ceramid identisch) (Tabelle 4.4).

5 Diskussion

5.1 Der Effekt von UVA beruht auf einer AP2-Bindestelle

Experimente mit Reportergenkonstrukten, die eine Deletion der mutmaßlichen AP2-Bindestelle im 5'-regulatorischen Bereich des menschlichen ICAM-1 Promotors trugen, zeigten, dass der Verlust der Bindestelle mit einem Verlust der UVA-induzierten Antwort der Expression von ICAM-1 einhergeht. Zudem konnte nach UVA-Bestrahlung eine Aktivierung von AP2 in nuklearen Extrakten bestrahlter Zellen nachgewiesen werden. Kinetische Studien an diesen Zellen zeigten einen biphasischen Verlauf sowohl für die UVA-induzierte Aktivierung von AP2 wie der UVA-induzierte ICAM-1 Expression. Beide Effekte glichen sich in ihrem zeitlichen Muster. Die Deletion der AP2-Bindestelle verhinderte zwar in den Promotorkonstrukten die Aktivierung des Reportergens durch UVA-Bestrahlung, nicht jedoch die Aktivierung durch UVB-Strahlung. Die mutmaßliche AP2-Bindestelle stellt also den durch UVA gesteuerten Schalter des menschlichen ICAM-1 Gens dar. Dieser Schalter ist spezifisch für Strahlung aus dem UVA-Bereich und die Aktivierung des ICAM-1 Promotor durch UVA- und UVB-Strahlung erfolgt über verschiedene Regelwege.

Die Aufhebung der UVA-induzierten Aktivierung des ICAM-1 Promotors durch die Deletion der AP2-Bindestelle wurde nicht nur in menschlichen embryonalen Nierenzellen (Zelllinie 293) nachgewiesen, sondern auch in primären Keratinozyten. Keratinozyten bilden gegenüber der Umwelt die äußerste Grenze des menschlichen Körpers und stellen somit eine der ersten Zielzellen für UVA-Strahlung - sei es aus dem solaren Spektrum oder aus künstlichen Lichtquellen - dar. Die beobachteten Effekte stellen also durchaus einen physiologischen Schutz gegen Strahlung dar.

Durch Gelretardierungsexperimente haben wir gezeigt, dass (i) UVA-bestrahlte Zellen ein Protein exprimieren, das an eine Konsensussequenz für den Faktor AP2 aus den Promotoren des ICAM-1 Gens oder des SV40 bindet und dass (ii) diese Bindung vollständig durch spezifische Kompetitoren im molaren Überschuss verdrängt werden kann. Unspezifische Kompetitor-Oligonukleotide, die eine AP1-Sequenz trugen, hatten diesen Effekt nicht. Wir folgern aus diesen Ergebnissen, dass UVA-Strahlung zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 führt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass UVA-Bestrahlung neben der Aktivierung des

Transkriptionsfaktor AP2 auch den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren kann (Vile *et al.*, 1995). Die Aktivierung von NF κ B hat, anders als die Aktivierung von AP2, keine funktioneller Bedeutung für die UVA-induzierte Aktivierung des ICAM-1 Promotors, denn wir konnten zeigen, dass eine Deletion der mutmaßlichen Bindestelle für NF κ B im ICAM-1 Promotor nicht zur Aufhebung der UVA-induzierten Promotoraktivierung führt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden, dass Singulett-Sauerstoff, ein Mediator der UVA-induzierte Aktivierung des ICAM-1 Promotors und der UVA-induzierte AP2-Aktivierung, nicht zur Aktivierung von NF κ B beiträgt (Schreck *et al.*, 1992). Zusammen weisen diese Befunde darauf hin, dass die Aktivierung von AP2 ein unverzichtbarer Schritt in der UVA-induzierten Aktivierung des ICAM-1 Promotor darstellt, auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass daneben noch weitere Transkriptionsfaktoren durch UVA aktiviert werden und zusammen mit AP2 einen funktionell aktiven Transkriptionsfaktorenkomplex zur Induktion der Promotoraktivität des ICAM-1 bilden (Mitchell *et al.*, 1991; Magnaldo *et al.*, 1993). Eine Zugabe von Reduktionsmitteln (Dithiothreitol, 0-200 mM) konnte die Verzögerung von AP2 in den Gelretardierungsexperimenten nicht verhindern, aber weitere Untersuchungen sind nötig, um den genauen Mechanismus der UVA-induzierten Aktivierung von AP2 aufzuklären.

Die funktionelle Bedeutung der UVA-induzierten Aktivierung von AP2 für die UVA-induzierte Expression von ICAM-1 wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Expression von ICAM-1 und die Bindung von AP2 zeitlich überlappen, wobei die maximale AP2-Bindung der maximalen Expression von ICAM-1 vorausgeht. Auch folgen sowohl die Aktivierung von AP2 als auch die Expression der ICAM-1 mRNA einer biphasischen Kinetik. Hieraus lässt sich ebenfalls auf einen kausalen Zusammenhang von AP2-Bindung und ICAM-1 Expression schließen. Biphasische Aktivierungsmuster der Genexpression wurden zuvor für die UVB-induzierte Expression von *c-fos* mRNA (Shah *et al.*, 1993) und vor kurzem für die UVA-induzierte Expression spezieller Zytokingene (Morita *et al.*, 1997) beschrieben. Für die zweite, spätere Aktivierung wurde von diesen Arbeitsgruppen ein Zytokin-vermittelter, autokriner Regelkreis vorgeschlagen.

5.2 Die Wirkung des Singulettstauerstoffs wird durch Deletion der AP2-Bindestelle aufgehoben

Singulettstauerstoff wird in einer Vielzahl biologischer Systeme erzeugt, so auch in Zellen des Menschen. Singulettstauerstoff ist ein wichtiges biochemisches Zwischenprodukt in verschiedenen biologischen Prozessen (Kanofsky, 1989). Singulettstauerstoff wurde als primärer Effektor für die UVA-induzierte transkriptionelle Aktivierung von Hämoxxygenase 1 (Basu-Modak & Tyrrell, 1993) und Matrixmetalloproteinase-1 (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Wlaschek *et al.*, 1995) identifiziert. Es existieren bisher keine direkten Methoden, um Singulettstauerstoff in UVA-bestrahlten Zellen nachzuweisen. Hinweise auf die Beteiligung von Singulettstauerstoff an der Induktion von Genexpression müssen deshalb immer indirekter Natur sein und basieren auf indirekten Methoden wie etwa dem Gebrauch von Substanzen, die Singulettstauerstoff auslöschen oder seine Halblebenszeit verlängern und dem Einsatz von Singulettstauerstoff generierenden Systemen (Basu-Modak & Tyrrell, 1993; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Wlaschek *et al.*, 1995). In den vorgelegten Ergebnissen wurden solche experimentelle Ansätze gewählt, um die Beteiligung von Singulettstauerstoff an der UVA-induzierten Promotoraktivierung des ICAM-1 zu demonstrieren (Abb. 5.1).

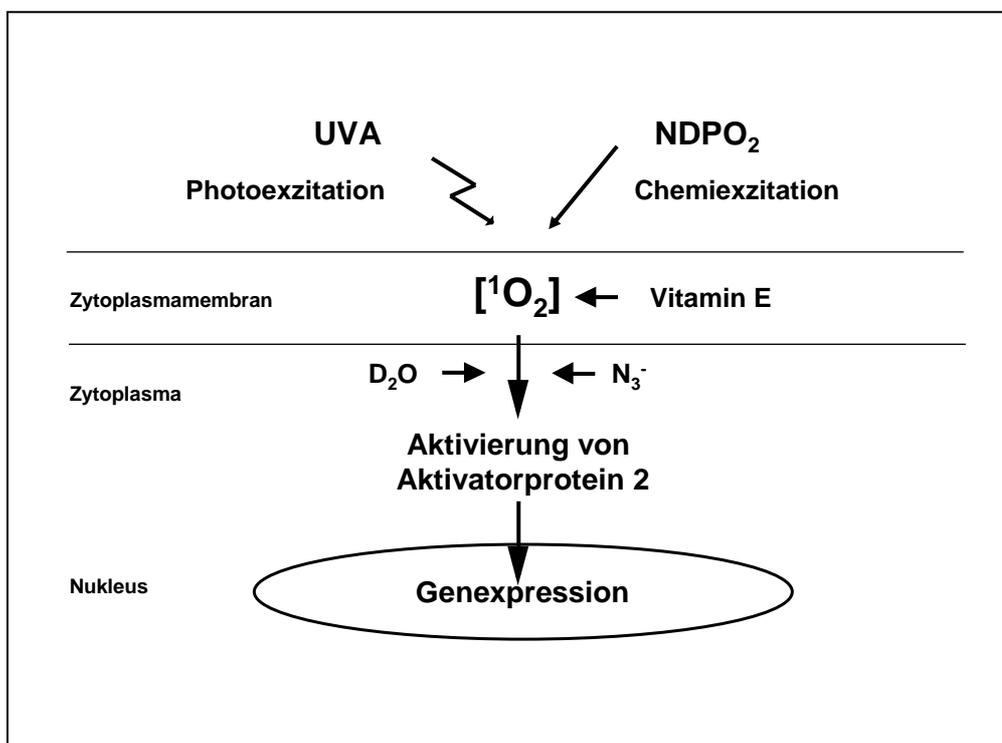


Abbildung 5.1: Die Rolle von Singulettstauerstoff und AP2 in der UVA-induzierten Signaltransduktion

Unsere Untersuchungen haben aufgezeigt, dass die Bildung von Singulett-Sauerstoff in menschlichen Zellen eine wichtige Bedeutung bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Regulation der Genexpression hat, insbesondere bei der UVA-Antwort. In ähnlicher Weise konnte für H_2O_2 gezeigt werden, dass Hydroxylradikale unter anderem bei der Induktion der Genexpression von ICAM-1 (Ikeda *et al.*, 1994) und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, etwa NF κ B (Schreck *et al.*, 1992), beteiligt sind. Für die UVA-induzierte Promotoraktivierung des ICAM-1 konnte jedoch eine Beteiligung von H_2O_2 nicht gefunden werden; der Hydroxylquencher Mannit hatte keinen hemmenden Einfluss auf die UVA-induzierte Promotoraktivierung des ICAM-1, und Stimulation unbestrahlter Zellen mit H_2O_2 in die ICAM-1 Expression auslösenden Konzentrationen (Ikeda *et al.*, 1994) führte nicht zur Aktivierung von AP2. Wir schlagen deshalb vor, die UVA-induzierte Promotoraktivierung von ICAM-1 als in erster Linie durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff vermittelt anzusehen. Die UVA/Singulett-Sauerstoff-induzierte ICAM-1 Expression wiederum hängt entscheidend von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 ab. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor AP2 neben der Regulation der Genexpression im Rahmen der Differenzierung und der Morphogenese auch eine Funktion bei der transkriptionellen Antwort auf langwellige UV-Strahlung in Säugerzellen hat.

5.3 Ceramide als Second Messenger in der UVA-induzierten Expression von ICAM-1

Ceramide vermitteln die Induktion von Stressantworten in Säugerzellen und können vermutlich auch Stress-induzierbare Transkriptionsfaktoren aktivieren (Ballou *et al.*, 1996; Hannun, 1996; Spiegel *et al.*, 1996). Der Transkriptionsfaktor AP2, der eine wichtige Funktion bei der Genregulation während der Differenzierung und Morphogenese inne hat, ist auch an der transkriptionellen Stressantwort von Säugerzellen beteiligt (Grether-Beck *et al.*, 1996; Johnson, 1996; Kroeger & Abraham, 1996). In Übereinstimmung mit diesem Signalmodell haben wir in der hier vorliegenden Studie beobachtet, dass Ceramide den Transkriptionsfaktor AP2 aktivieren. Zugabe von Ceramiden zu Keratinozyten aktivierte den Transkriptionsfaktor AP2 und induzierte die Expression von ICAM-1 mRNA in einer biphasischen Weise. Stimulation mit Ceramiden aktivierte den Promotor des menschlichen ICAM-1-Gens und diese Aktivierung konnte durch die Deletion der mutmaßlichen AP2-Bindestelle ausgelöscht werden. Diese Studien demonstrieren,

dass (i) Ceramide die Fähigkeit haben, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und dass (ii) die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 für die Aufregulation von ICAM-1 von funktioneller Bedeutung ist.

In früheren Arbeiten wurde von uns gezeigt, dass die Aktivierung von AP2 für die Expression von ICAM-1 von mit physiologischen Dosen UVA bestrahlten Keratinozyten eine wichtige regulatorische Bedeutung hat (Grether-Beck *et al.*, 1996). Hier berichten wir nun, dass eine Stimulation von Keratinozyten mit Ceramiden oder eine Bestrahlung mit UVA die Induktion der Expression von ICAM-1 mRNS und die Aktivierung von AP2 aktiviert. Diese beiden Prozesse zeigen übereinstimmende charakteristische Kinetiken. In beiden Fällen konnte die Promotoraktivierung durch eine Deletion der AP2-Bindestelle aufgehoben werden. Darüber hinaus bilden Keratinozyten nach Bestrahlung mit UVA-Dosen, die zur Aktivierung von AP2 und zur Induktion der Expression von ICAM-1 führen, Ceramide. Die maximale Ceramid-Bildung geht der maximalen AP2-Aktivierung und der maximalen Expression von ICAM-1 mRNS voraus. Die Hemmung der Ceramid-Bildung in UVA-bestrahlten Keratinozyten durch die Depletion von Sphingomyelin verursachte eine Resistenz gegenüber der UVA-Antwort. Diese Studien deuten zusammengenommen auf Ceramid als Second Messenger in der UVA-induzierten Aktivierung von AP2 hin, wodurch die transkriptionelle Expression des menschlichen ICAM-1 Gens in UVA-bestrahlten Keratinozyten induziert wird. Das Spektrum der intrazellulären Stressantworten von Ceramiden wird durch diese Studien erweitert um die durch solare UVA-Bestrahlung induzierte Genexpression in menschlichen Hautzellen.

5.4 Singulett-Sauerstoff ist Mediator der UVA-induzierten Ceramid-Bildung

Singulett-Sauerstoff ist ein häufiges biochemisches Zwischenprodukt verschiedenster biologischer Prozesse, so auch bei der UVA-induzierten Genexpression in Keratinozyten und Fibroblasten des Menschen (Tyrrell, 1996; Grether-Beck *et al.*, 1996, 1997; Ryter & Tyrrell, 1998; Klotz *et al.*, 2000). Es ist auch bekannt, dass Singulett-Sauerstoff Apoptose in T-Helferzellen induziert (Morita *et al.*, 1997) und Mutationen in mitochondrialer DNS generiert (Berneburg *et al.*, 1999). Da, wie oben erwähnt, bisher keine direkten Methoden zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff in bestrahlten Zellen zur Verfügung stehen, wurde die Funktion

des Singulett-sauerstoffes bei der Gen-Induktion unter Verwendung von Singulett-sauerstoffquenchern und Singulett-sauerstoff generierenden Systemen untersucht. Dieser experimentelle Ansatz stellt gegenwärtig den Stand der Technik dar (Sies & Packer, 2000). In den vorliegenden Untersuchungen fanden Natriumazid und Vitamin E als Singulett-sauerstoffquencher Verwendung. Beide Substanzen konnten die UVA-induzierte Ceramid-Bildung unterdrücken. Zusätzlich konnte die UVA-induzierte Ceramid-Bildung in unbestrahlten Keratinozyten durch die Stimulation mit dem Singulett-sauerstoff generierenden System NDPO₂ nachgeahmt werden. So konnten wir zeigen, dass Singulett-sauerstoff die UVA-induzierte Aktivierung von AP2 und Expression von ICAM-1 vermittelt (Grether-Beck *et al.*, 1996). Diese Befunde liefern das Modell, dass Singulett-sauerstoff direkt an der Synthese der Ceramide beteiligt ist und (ii) über diese Funktion die UVA-induzierte Ceramid-Bildung primärer Keratinozyten vermittelt. In der von uns vorgeschlagenen Signaltransduktionskaskade für die UVA-induzierte Genexpression steht die Ceramid-Synthese nach der Bildung von Singulett-sauerstoff, erfolgt aber vor der Aktivierung von AP2. Da der Singulett-sauerstoffquencher Vitamin E, der sowohl die UVA- als auch die Singulett-sauerstoff-induzierte Ceramid-Bildung, die AP2 Aktivierung und die Induktion der Expression von ICAM-1 mRNA hemmt (Grether-Beck *et al.*, 1996), lipophil und in der Membran lokalisiert ist, und das in dieser Studie verwendete NDPO₂ wasserlöslich ist und Singulett-sauerstoff an der Außenseite der Zellmembran bildet (Klotz *et al.*, 1999; Pierlot *et al.*, 2000), schlagen wir vor, den ersten Schritt der intrazellulären Signaltransduktion, der zur UVA-induzierten Genexpression führt, auf der Ebene der Zytoplasmamembran zu lokalisieren.

5.5 Nicht-enzymatische Ceramid-Bildung

In dem Bestreben, die Anfangsschritte dieser Signaltransduktionskette im Einzelnen aufzuklären, haben wir zunächst die Beteiligung solcher Enzyme untersucht, deren Teilnahme bei der Ceramid-Bildung als Antwort auf extrazelluläre Stimuli und Stress schon zuvor beschrieben worden war. Dazu gehört die Ceramid-Synthase, die in P388- und U937-Zellen die Daunorubicin-induzierte Ceramid-Bildung und Apoptose vermittelt (Bose *et al.*, 1995). Die durch dieses Enzym regulierte *de novo* Synthese der Ceramide führt erst einige Stunden nach Stimulation zu einer verzögerten Erhöhung der Ceramid-Werte. Diese verspätete Antwort war auf Grund ihrer Kinetik eher nicht an der UVA- bzw. Singulett-sauerstoff-vermittelten

Ceramid-Bildung beteiligt, bei der Keratinozyten innerhalb von Minuten nach der Stimulation Ceramid-Synthese betreiben. Auch führten weder UVA-Bestrahlung noch Behandlung mit Singulett-Sauerstoff zu einer Erhöhung der Aktivität der Ceramid-Synthase (Abb. 4.6D) und eine Hemmung des Enzyms durch Zugabe des natürlichen Inhibitors Fumonisin B1 in bestrahlten Keratinozyten konnte weder die Ceramid-Bildung hemmen (Abb. 4.6A) noch die Expression von ICAM-1 mRNA induzieren (Abb. 4.6B). Fumonisin B1 hatte jedoch unter identischen experimentellen Bedingungen in Keratinozyten eine inhibitorische Wirkung auf die *de novo* Synthese von Ceramid (Daten nicht gezeigt). Zusammen betrachtet unterstützen diese Befunde unser Konzept, wonach die *de novo* Synthese von Ceramiden nicht an den frühesten Ereignissen der Signalkaskade, die an der Plasmamembran ablaufen, beteiligt ist.

Alternativ wurde vorgeschlagen, dass die Aktivierung von Sphingomyelinasen für die Bildung der „Second Messenger“ Ceramide verantwortlich ist, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren oder zur Induktion von Apoptose führen (Ballou *et al.*, 1996; Hannun, 1996; Spiegel *et al.*, 1996; Krönke, 1997). Dieses Konzept wurde allerdings in letzter Zeit durch eine Vielzahl von Studien in Frage gestellt, in denen die Ceramid-Bildung unabhängig von der Aktivierung der Sphingomyelinasen beobachtet wurde (Watts *et al.*, 1997; Zumbansen & Stoffel, 1997; Boesen-de-Cock *et al.*, 1998; Tomiuk *et al.*, 1998, Chatterjee *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung konnte in unserer Studie weder UVA Strahlung noch eine Singulett-Sauerstoff-Behandlung die Sphingomyelinase Aktivitäten erhöhen. Dies ist im Gegensatz zu Stimulationen von Keratinozyten mit Zytokinen und zu früheren Arbeiten, in denen UVB Strahlung verwendet wurde, welche nicht in der Lage ist, Singulett-Sauerstoff zu generieren (Huang *et al.*, 1997). Zusammengenommen deuten diese Arbeiten auf einen dritten Mechanismus der Ceramid-Bildung hin, der weder einer Aktivierung von Ceramidsynthase noch einer Aktivierung von Sphingomyelinasen bedarf.

In der vorliegenden Studie legen wir nun Befunde vor, die den bisher unbekanntem Mechanismus als nicht-enzymatische Hydrolyse identifizieren. Entsprechend führten sowohl eine UVA-Bestrahlung als auch eine Singulett-Sauerstoff-Behandlung zur Bildung von Ceramiden aus Sphingomyelin enthaltenden, proteinfreien Liposomen. Die Zusammensetzung der in diesem System gebildeten Ceramide wurde mit HPLC/Massenspektroskopie überprüft. Die Identifizierung des nicht-enzymatischen

Stoffwechselweges für die Ceramid-Bildung könnte zu einer Neubewertung der Diskrepanz zwischen der beobachteten Ceramid-Bildung einerseits und der fehlenden Aktivierung von Enzymen, die schon in früheren Arbeiten beschrieben wurden (Watts *et al.*, 1997; Zumbansen & Stoffel, 1997; Boesen-de-Cock *et al.*, 1998; Tomiuk *et al.*, 1998, Chatterjee *et al.*, 1999). Als die gebildeten Ceramide hinsichtlich ihrer freien Fettsäurereste analysiert wurden, fanden sich sowohl in den UVA- als auch in den Singulett-sauerstoff-stimulierten Keratinozyten als auch in den auf gleiche Weise behandelten Liposomen identische Muster in Bezug auf die Fettsäureseitenketten. Unsere Daten deuten zudem darauf hin, dass der Beitrag der nicht-enzymatischen Hydrolyse signifikant für die Bildung der Ceramide in den Keratinozyten ist. Deshalb schlagen wir vor, dass die Einleitung der nicht-enzymatischen Bildung der Ceramide wichtig ist für die Bildung der Ceramide als „Second Messenger“ ist und dass dies die UVA-induzierte AP2 Aktivierung initiiert und die Genexpression in Keratinozyten steigert. Es sollte hier angemerkt werden, dass in Keratinozyten der Sphingomyelingehalt nicht abnimmt, sondern auf das 2,9-Fache ansteigt (Abb. 4.8B). Dies steht im Gegensatz zu den Befunden in den Experimenten mit den Liposomen und spiegelt wahrscheinlich ein reaktives Ansteigen des Sphingomyelinumsatzes wieder, was wiederum die Bedeutung der enzymatischen Mechanismen auch und gerade unter den Bedingungen, unter denen nicht-enzymatische Reaktionen stattfinden, unterstreicht.

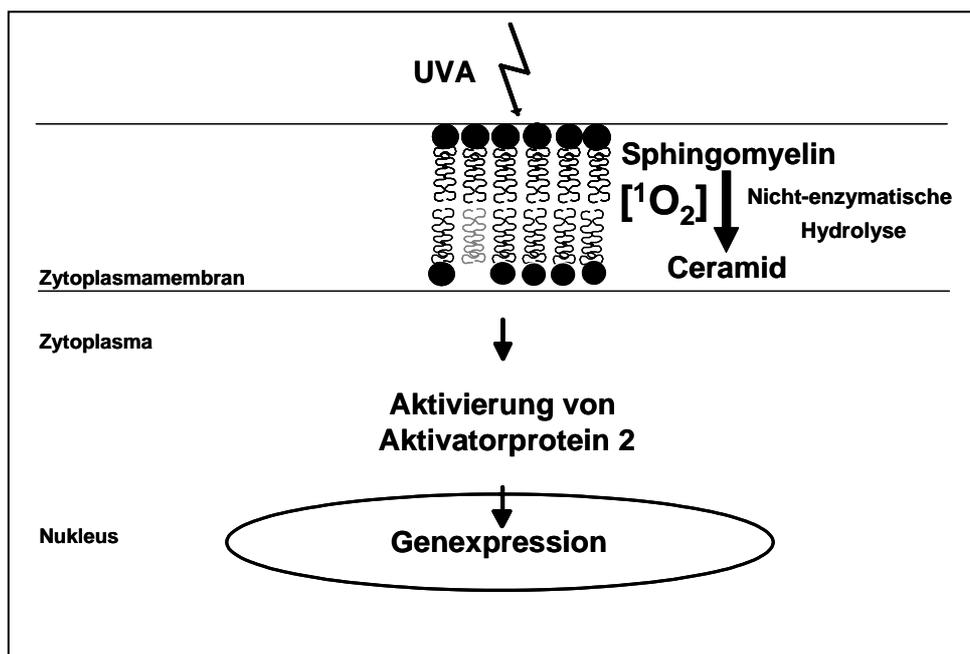


Abbildung 5.2: Eine nicht-enzymatische Hydrolyse führt kurz nach der UVA-Bestrahlung zur Bildung des „Second Messenger“ Ceramid.

Der nicht-enzymatische Abbau von Sphingomyelin könnte zuerst an der Doppelbindung des Sphingosinrückgrades erfolgen. Als Konsequenz davon sollten Produkte entstehen, die einen C14 oder C15 Kohlenstoffkörper beinhalten, Oxidation würde in der Bildung von Alkoholen, Aldehyden oder Carboxylaten resultieren. Bei der Trennung von C14- und C15-Alkohole, -Aldehyde oder -Carboxylate mittels HPTLC unter identischen Bedingungen getrennt wurden, wie sie für die Trennung der Sphingomyelin-haltigen Liposome zum Einsatz kamen, unterschieden sich die R_f -Werte der beobachteten Ceramide und der C14- oder C15-Produkte deutlich (Daten nicht gezeigt). Der beobachtete Anstieg der Ceramid-Bildung in UVA-bestrahlten oder NDPO₂-behandelten Keratinozyten kann deshalb nicht der Bildung von C14- oder C15-Produkten zugeschrieben werden, weil Ceramide und C14- oder C15-Produkte unter den angewandten Trennbedingungen eindeutig von einander getrennt werden können. Ebenso konnten weder C14- noch C15-Produkte in UVA-bestrahlten oder Singulett-Sauerstoff-behandelten Liposomen nachgewiesen werden. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Doppelbindung des Sphingosinrückgrades das erste Ziel der nicht-enzymatischen Hydrolyse des Sphingomyelin darstellt. Singulett-Sauerstoff kann jedoch direkt mit Plasmalogen-haltigen Liposomen reagieren (Morand *et al.*, 1988; Anderson & Thompson, 1992). Auf analoge Weise könnte Singulett-Sauerstoff die nicht-enzymatische Hydrolyse des Sphingomyelin vermitteln und zur Bildung von Ceramiden für die Ceramid-vermittelte Signaltransduktionskaskade beitragen. Weitere Analysen des zugrunde liegenden Mechanismus erfordern intensive photochemische Untersuchungen, die den Rahmen der vorliegenden genregulatorischen Studie bei weitem übersteigen.

5.6 Haben Ceramide bei der Aktivierung von AP2 eine Funktion?

In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass für die Ceramid-induzierte Expression von ICAM-1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 erforderlich ist (Grether-Beck *et al.*, 2000). Auch konnten wir Hinweise eines mitochondrialen Wegs für diese Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 aufzeigen, der einer funktionell aktiven Elektronentransportkette bedarf und von der Translokation des Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytosol abhängig ist. Hier stellen wir weitere *in vitro* und *in vivo* Befunde vor, die zeigen, dass die sich daraus ergebende Interaktion zwischen Cytochrom C und AP2 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors über eine Redoxreaktion führt, die mit einer Oxidation von AP2 einhergeht (Abb. 5.3). Wir

konnten mit diesen Untersuchungen eine bisher unbekannte Funktion der Mitochondrien bei der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und der Regulation der Gentranskription in Säugerzellen beschreiben.

Die hier beschriebene Ceramid-induzierte Genexpression weist mehrere Merkmale auf, die mit den Charakteristika der Ceramid-induzierten Apoptose übereinstimmen (Kolesnick *et al.*, 1994; Hannun & Obeid, 1995; Rippo *et al.*, 2000), insbesondere die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytosol. In der vorliegenden Studie führte die Stimulation mit Ceramiden in Konzentrationen, die die Gentranskription verursachte, nicht zur Induktion einer Caspase-Aktivität (Abb. 4.10D und 4.10E). An dieser Stelle sollte angemerkt werden, dass auch Caspase-unabhängigen Apoptose beschrieben wurde, die je nach experimentellem System auch ein Ceramid-Signal haben kann (van Haefen *et al.*, 2002; Miguet *et al.*, 2001; Listenberger *et al.*, 2001).

Alle Arten der Apoptose gehen jedoch mit einer Fragmentierung der zellulären DNS einher, die als gemeinsamer finaler Endpunkt sowohl des Caspase-abhängigen wie auch des Caspase-unabhängigen Zelltodes angesehen wird. Daher ist es wichtig festzuhalten, dass die Ceramid-induzierte Aktivierung von AP2 nicht mit der Fragmentierung von DNS einherging. Diese Fragmentierung der DNS wurde durch zwei voneinander unabhängige Nachweismethoden untersucht (Abb. 4.10C und 4.11A). Eine erhöhte Genexpression in Abwesenheit von Apoptose wurde auch in primären dermalen Fibroblasten beobachtet (Abb. 4.11C) und ist somit nicht nur spezifisch für Keratinozyten. Allerdings handelt es sich auch nicht um ein generelles Phänomen, da wir eine solche konzentrationsabhängige Diskrepanz zwischen diesen beiden Ceramid-induzierten Effekten in HeLa-Zellen nicht nachweisen konnten (Abb. 4.11B). Eine Unterstützung unserer Befunde lieferte erst kürzlich ein Bericht, dass sich die Sensitivität gegenüber Ceramid-induzierter Apoptose zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheidet (Burek *et al.*, 2001; Asakuma *et al.*, 2003). In diesen Untersuchungen erwiesen sich Tumorzellen als sensitiver gegenüber der Ceramid-induzierten Apoptose als primäre Zellen.

Die Menge an in das Zytosol freigesetztem Cytochrom C war relativ gering und konnte nur mit der sensitiven Methode der Immunpräzipitation nachgewiesen werden; diese Menge reichte aber aus, AP2 zu aktivieren und ICAM-1 zu induzieren (Abb. 4.10A, 4.12A, 4.13A), wohingegen Cytochrom C während der Ceramid-

induzierten Apoptose in großen Mengen freigesetzt wird und auch schon im Westernblot nachgewiesen werden kann (Rippo *et al.*, 2000). Es scheint also das Mitochondrium infolge seiner Fähigkeit, Cytochrom C in unterschiedlichen Mengen freizusetzen, einerseits eine regulierende Rolle bei der Aktivierung von Transkriptionfaktoren und der Genexpression zu haben und andererseits eine Funktion bei der Aktivierung von Caspasen und der Induktion von Apoptose zu erfüllen. Unser Modell erklärt auch frühere Befunde, wonach eine Veränderung der mitochondrialen Funktion die Expression nuklearer Genen beeinflussen konnte und ein Signalweg zwischen mitochondrialem und nuklearem Kompartiment in pro- und eukaryotischen Systemen postuliert wurde (Leenders & Beckers, 1972; Liao *et al.*, 1991; Parikh *et al.*, 1987).

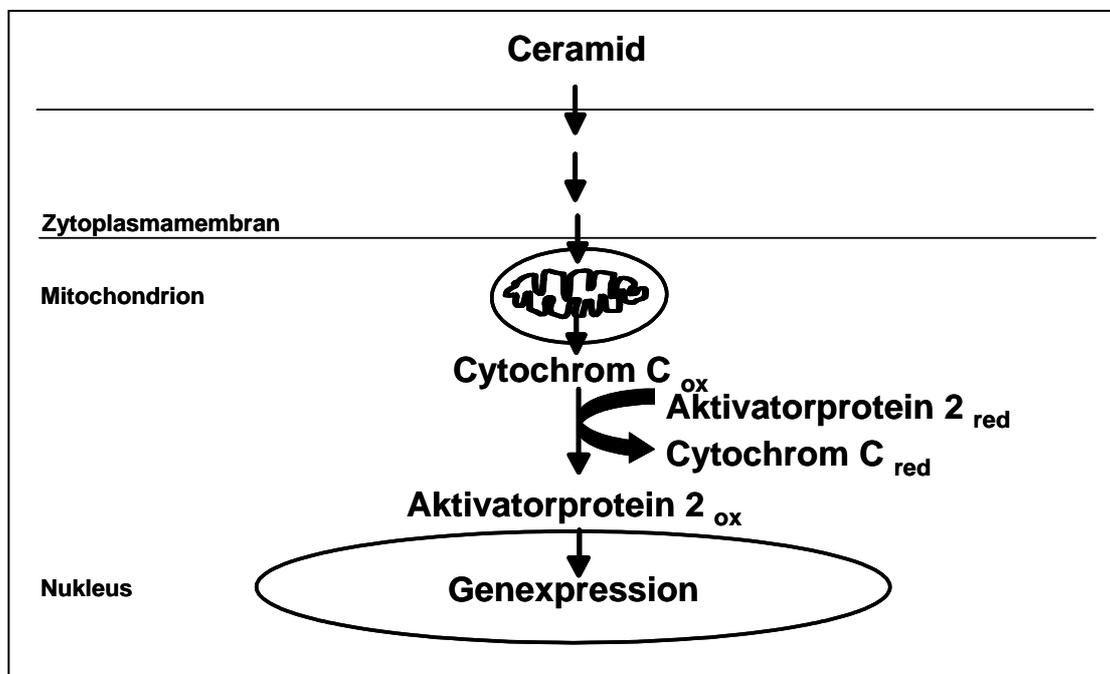


Abbildung 5.3: Ceramide wirken auf das Mitochondrium und führen dort zur Freisetzung von geringen Mengen an Cytochrom C in das Zytoplasma, wo es zu einer Redoxreaktion mit dem Transkriptionsfaktor AP2 kommt, der infolge der Oxidation eine höhere DNS-Bindung aufweist.

Unsere Befunde erlauben bisher nicht in Detail den molekularen Mechanismus aufzuklären, über den eine Cytochrom C-induzierte Oxidation von AP2 diesen Transkriptionsfaktor aktiviert. Die DNS-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors AP2 enthält 5 Cysteinreste an den Aminosäurepositionen 243, 308, 345, 375 und 392 (Imagawa *et al.*, 1987). Die Oxidation einer jeden dieser Aminosäuren, z. B. an Position 243, könnte eine Konformationsänderung hervorrufen, die eine verstärkte

Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNS-Sequenz zur Folge hätte. Desweiteren gibt es 9 Lysin- und Argininreste in der DNS-Bindungsdomäne von AP2, die ebenfalls als Reaktionspartner der Redoxregulation dienen können. Die Analyse der Redoxänderung dieser potentiellen Reaktionspartner bedarf detaillierter biophysikalischer Untersuchungen und Modellierung und ist jenseits des Rahmens der vorgelegten Studie. Eine Redoxregulation als Mechanismus der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wurde schon früher beschrieben, insbesondere für AP2 (Joseph *et al.*, 1994) und NF κ B (Piette *et al.*, 1997). Unsere Ergebnisse eröffnen neue Einsichten in die Signaltransduktionskette, die die Ceramid-induzierte Genexpression in Säugerzellen vermittelt. Sie zeigen auch neue Wege auf, wie Stressantworten von z. B. durch Zytokine (Kolesnick & Golde, 1994; Hannun, 1996) oder UV-Strahlung (Grether-Beck *et al.*, 2000; 1996) induzierte Zellen, die von der Ceramid-induzierten Gentranskription abhängen, durch die Manipulation der mitochondrialen Funktionen verändert werden können. *In vitro* wurde gezeigt, dass Ceramide signaltransduzierende Kinasen wie die Proteinkinase ξ und die Ceramid-aktivierte Proteinkinase (Ballou *et al.*, 1996) und die Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase zu aktivieren vermögen. Eine direkte Interaktion von Ceramiden mit einem oder mehreren dieser Moleküle könnte ein Element des Reaktionsmechanismus sein, der das Ceramid-Signal in das Mitochondrium überträgt und dabei die Translokation von Cytochrom C induziert. Abschließend erlauben unsere Ergebnisse neue Einsichten in die intrazelluläre Signaltransduktion von Ceramiden und den Mechanismus, wie Mitochondrien die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Gentranskription in menschlichen Zellen zu regulieren vermögen.

5.7 Biphaseische Synthese von Ceramid als „Second Messenger“ der UVA-induzierten Genexpression

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass UVA-Bestrahlung in primären Keratinozyten eine biphaseische Ceramid-Antwort hervorruft, die ein frühes Maximum zwischen 30 Minuten und 2 Stunden nach Bestrahlung und eine späte Antwort nach 16 Stunden nach Bestrahlung aufweist, die bis zu 48 Stunden anhält. In früheren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die frühe Ceramid-Antwort durch eine nicht-enzymatische Hydrolyse vermittelt wird, da die UVA-induzierte Ceramid-Bildung in bestrahlten Keratinozyten nicht mit einer erhöhten Aktivität der sauren oder

neutralen Sphingomyelinasen assoziiert war und weil die Bildung der Ceramide auch in einem proteinfreien liposomalen System beobachtet werden konnte (Grether-Beck *et al.*, 2000). Dies stimmt mit den jetzt vorgelegten Untersuchungen überein, dass weder Inhibitoren der sauren noch der neutralen Sphingomyelinase (Abb. 4.18), noch Hemmstoffe der Serin-Palmitoyltransferase (Abb. 4.19A und 4.19B) die UVA-induzierte Ceramid-Bildung des frühen Maximums beeinträchtigen konnten. In den gleichen Experimenten führte die Verwendung der Serin-Palmitoyltransferase-Hemmstoffe L-Cycloserin oder Myriocin jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Ceramid-Bildung bei den späten Zeitpunkten (Abb. 4.19A und 4.19B). Darüber hinaus war die UVA-induzierte Ceramid-Bildung zu diesen Zeitpunkten mit einer Erhöhung der Enzymaktivität der Serin-Palmitoyltransferase assoziiert (Abb. 4.19C). Die späte Ceramid-Bildung wurde auch nicht durch den UVA-induzierten Abbau von Glycosphingolipiden (Abb. 4.18D und 4.18E) verursacht. All diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, dass die UVA-induzierte Ceramid-Bildung über einen nicht-enzymatischen Mechanismus initiiert wird, an den sich eine Ceramid-Neusynthese in Folge einer erhöhten Aktivität der Serin-Palmitoyltransferase anschließt. Die UVA-induzierte Ceramid-Antwort besteht demnach aus einer nicht-enzymatischen und einer enzymatischen Komponente.

UVA-induzierte Ceramid-Bildung und UVA-induzierte Genexpression zeigen beide biphasische Kinetiken (Abb. 4. 17), die im wesentlichen identisch sind. Eine Hemmung der späten Antwort konnte auch nur die späte Phase der erhöhten Genexpression hemmen, nicht aber die frühe (Abb. 4.19). Genauso vermochte die Hemmung des ersten Ceramid-Anstieges auch nur das erste Induktionsmaximum der Genexpression zu hemmen (Grether-Beck *et al.*, 2000; Tabelle 1). In unserem Modell schlagen wir vor, dass in Keratinozyten die UVA-Bestrahlung zur Auslösung einer biphasische Ceramid-Antwort führt, die in einem Folgeschritt den biphasische Verlauf der UVA-induzierten Genexpression initiiert und dadurch wiederum den beobachtete biphasische Verlauf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auslöst.

5.8 Ceramid-vermittelter autokriner Ceramidloop als Element der UVA-induzierten Signaltransduktion

Aktivierung der Serin-Palmitoyltransferase und ein damit einhergehender Anstieg der Ceramid-Bildung wurde nicht nur in UVA-bestrahlten Keratinozyten sondern auch in unbestrahlten, aber mit zellpermeablen C2- oder C6-Ceramiden stimulierten Zellen

beobachtet. Die Stimulation von Keratinozyten mit zellpermeablen, exogenen Ceramiden kann daher als Ersatz für die frühe Ceramid-Antwort in UVA-bestrahlten Zellen betrachtet werden. Zudem deutet dies darauf hin, dass die frühe und die späte Antwort nicht voneinander unabhängig sind, sondern auf eine autokrine Weise miteinander verknüpft sind. Unsere Hypothese wird auch durch die Beobachtung untermauert, dass die Auslöschung der ersten Ceramid-Antwort mit Strategien, die nicht mit der Ceramid-Neusynthese interferieren, immer auch den zweiten Ceramid-Anstieg verhindern konnten. Basierend auf diesen Beobachtungen stellen wir ein Regulationsmodell auf, in dem Ceramid, das unter der UVA-Bestrahlung über einen

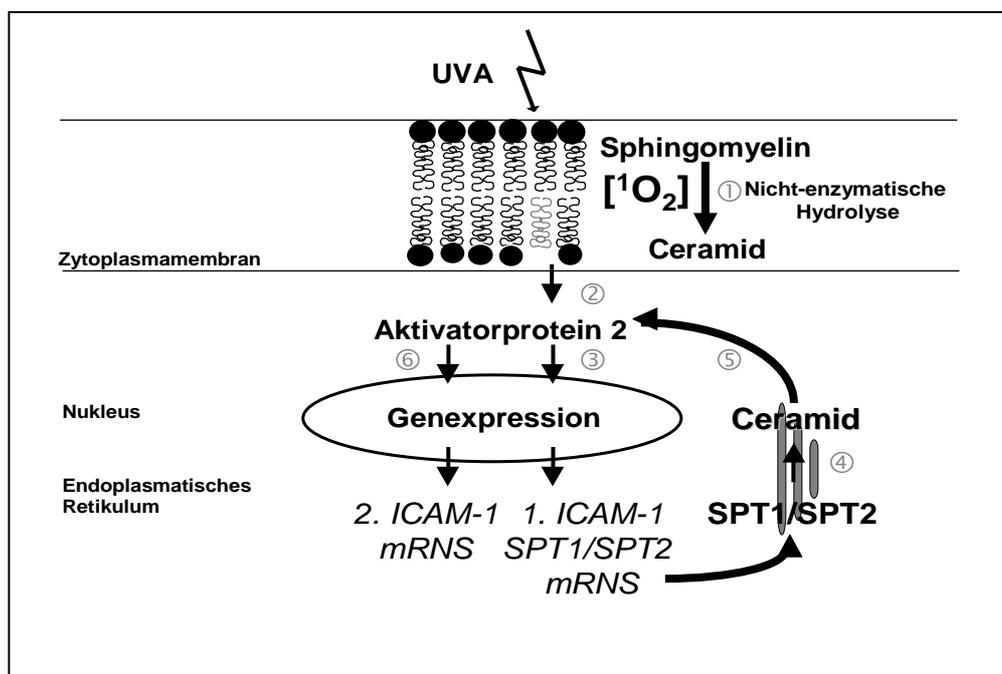


Abbildung 5.4: UVA-induzierte biphasische Ceramid-Bildung als „Second Messenger“ in der UVA-induzierten Signaltransduktion.

nicht-enzymatischen Weg gebildet wird, auf autokrine Weise die Expression und Aktivierung der Serin-Palmitoyltransferase induziert und damit zu einem zweiten Anstieg der Ceramid-Bildung führt (Abb. 5.4).

Dieses Modell kann auch die beobachtete langanhaltende Natur des zweiten Ceramid-Anstieges erklären, weil das neugebildete Ceramid zu einer Störung der Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität und somit der Ceramid-Synthese führen kann. Entsprechend ist die Ceramid-Bildung (Abb. 4.17B) und die Expression der Serin-Palmitoyltransferase (Abb. 4.19D) auch 48 Stunden nach UVA-Bestrahlung noch über das Hintergrundniveau erhöht. Lipid-vermittelte autokrine/parakrine Signalwege wurden erst kürzlich für Sphingosin-1-phosphat beschrieben (Maceyka *et al.*, 2002). In diesen Untersuchungen wurde in Blutplättchen die Wachstumsfaktor-induzierte

Zellbeweglichkeit durch die Stimulation der Sphingosin-Kinase und der sich daraus ergebenden Bildung von Sphingosin-1-phosphat vermittelt. Hierbei kommt es auf autokrine und parakrine Art zu einer Aktivierung einer Familie von auf der Zelloberfläche befindlichen Sphingosin-1-phosphat-spezifischen G-Proteingekoppelten Rezeptoren, die daraufhin zur Aktivierung von für das Überleben der Zelle nötigen Signalwegen führen (Hobson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2000). Unseres Wissens nach ist diese Arbeit der erste Bericht, der eine autokrine Regulationsschleife für Ceramide beschreibt.

Die Bildung endogener Ceramide als Antwort auf exogene Zugabe von zellpermeablen Ceramiden wurde zuvor in der menschlichen Lungenkarzinomzelllinie A549 (Ogretmen *et al.*, 2002) beschrieben. In dieser Untersuchung wurde die Ceramid-induzierte Ceramid-Bildung durch ein Recycling des Sphingosinrückgrades von C6-Ceramid über Deacylierung/Reacylierung und nicht über Ceramid-Neusynthese verursacht. Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigen wir in unserer Untersuchung, dass in nicht-transformierten, primären Keratinozyten exogen zugegebene Ceramide eine endogene Ceramid-Bildung durch die Neusynthese infolge der Aktivierung von Serin-Palmitoyltransferase induzieren können.

Serin-Palmitoyltransferase ist ein Heterodimer, das sich zusammensetzt aus einer 53 kDa SPTLC1- und einer 63 kDa SPTLC2-Untereinheit. Beide Untereinheiten sind integrale Membranproteine, die an das endoplasmatische Retikulum gebunden sind (Hanada, 2003). In Säugerzellen reichte die SPTLC2-Untereinheit allein aus, um die Aktivität der Serin-Palmitoyltransferase zu erzielen. Es wurde deshalb vorgeschlagen, die katalytische Funktion dieses Enzyms auf SPTLC2 zu lokalisieren (Weiss & Stoffel, 1997). Auch wir konnten zeigen, dass in UVA-bestrahlten oder Ceramid-stimulierten Keratinozyten die mRNA von SPTLC2 auf das 6- bzw. 4-Fache anstieg. Die Aufregulation der Untereinheit SPTLC1 war aber nach UVA-Bestrahlung (14-fach) stärker als nach der Stimulation mit Ceramiden (2-fach). Allerdings war die Expression von SPTLC2 in UVA-bestrahlten Keratinozyten geringer als in Ceramid-behandelten. Diese Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, wonach der Untereinheit SPTLC1 eine stabilisierende Funktion zugewiesen wird (Weiss & Stoffel, 1997).

Serin-Palmitoyltransferase, der Katalysator des ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Sphingolipidsynthese, wird zu den regulierten Haushaltsgenen

gerechnet, aber nur wenige Befunde liefern Anhaltspunkte für eine Erklärung seiner Regulation und seiner regulatorischen Mechanismen (Hanada, 2003). Bis die regulatorischen Elemente auf den Genen von *SPTLC1* beziehungsweise *SPTLC2* zur Verfügung stehen, muss seine Induktion und Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor AP2 eine Spekulation bleiben. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann auch eine Änderung der Halblebenszeit der mRNA ein erhöhtes Niveau an den mRNAs für *SPTLC1* und *SPTLC2* erklären (Raghavan *et al.*, 2002).

Mit den hier vorgelegten Ergebnissen zeigen wir, dass in menschlichen Keratinozyten die zuvor beobachtete biphasische Natur der UVA-Antwort (Grether-Beck *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 1997; Gille *et al.*, 2000) sich aus einer sequentiellen Abfolge eines nicht-enzymatischen und eines enzymatischen Prozesses ergibt, die zu einer biphasischen Bildung von Ceramid führen, das als „Second Messenger“ fungiert. Darüber hinaus konnten wir erstmals zeigen, dass Ceramide auf autokrine Weise wirken können und damit die eigene Neusynthese zu stimulieren vermögen.

In laufenden Arbeiten gehen wir der Frage auf den Grund, welche Veränderungen in der Zytoplasmamembran insbesondere in den Sphingomyelin-reichen Mikrodomänen, den sog. Rafts infolge einer UVA-Bestrahlung (i) auf der Ebene der Lipide und (ii) auf der Ebene der in den Mikrodomänen lokalisierten Signaltransduzierenden Enzymkomplexen erfolgen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Langwellige ultraviolette Strahlung (UVA; 320-400nm) ist eine der wichtigsten Noxen, denen die Haut des Menschen unter physiologischen, therapeutischen oder kosmetischen Gründen ausgesetzt ist. Die UVA-Strahlung ist an der Entstehung von Photodermatosen, der vorzeitigen beschleunigten Hautalterung und der Photokarzinogenese beteiligt: Grundlegend hierfür sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen in der Haut des Menschen. Die Charakterisierung der UVA-induzierten Signalantwort in normalen, nicht transformierten Keratinozyten, den primären Zielzellen für UVA-Strahlung, führte zu folgendem Modell:

Die UVA-induzierte Genexpression in Keratinozyten weist einen biphasischen Verlauf auf, bei dem es innerhalb der ersten 4 Stunden nach Bestrahlung zu einer Zunahme der transkriptionellen Expression kommt, die von einem zweiten, ca. 16 Stunden nach Bestrahlung nachweisbaren, deutlich protrahiert verlaufendem Anstieg gefolgt wird (> 48 Stunden *post irradiatio*). Dieser zweiphasige Verlauf ist für die UVA Bestrahlung spezifisch, er wird nicht nach einer UVB Bestrahlung der Keratinozyten beobachtet, und er wird durch eine ebenfalls biphasische Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP2 vermittelt. Es zeigte sich, dass UVA Strahlung eine ebenfalls biphasisch ablaufende Generation von Signalceramiden verursacht, die für die biphasische AP2 Aktivierung und Gentranskription verantwortlich ist. So kommt es innerhalb der ersten Stunde in der Membran UVA-bestrahlter Zellen zu einer Freisetzung von Signalceramiden, die auf einer nicht-enzymatischen Hydrolyse von Sphingomyelin beruht und durch die UVA-induzierte Generation von Singulett-Sauerstoff ausgelöst wird. An diesen ersten Ceramidpeak schließt sich eine zweite Ceramidantwort nach 16 bis 48 Stunden an. Im Gegensatz zum ersten Peak beruht diese späte und protrahiertere ablaufende zweite Ceramidantwort auf der *de novo* Synthese von Ceramid, die wiederum Folge einer vermehrten Expression und Aktivierung des für die Ceramidneusynthese entscheidenden Enzyms, der Serin-Palmitoyltransferase, ist. Eine Hemmung dieses zweiten Ceramidpeaks durch Inhibition der Serin-Palmitoyltransferase führte zur Hemmung der zweiten Phase der UVA-induzierten Genantwort. Im Gegensatz dazu wurde durch eine Hemmung der ersten Ceramidantwort in bestrahlten Keratinozyten nicht nur die erste Phase der Genexpression blockiert, sondern gleichzeitig auch die UVA-induzierte Expression und Aktivierung der Serin-Palmitoyltransferase, die hieraus resultierende zweite Ceramidantwort und die wiederum daraus entstehende späte Genantwort.

7 Literatur

- Ahrens C, Grewe M, Berneburg M, Grether-Beck S, Quillet X, Mezzina M, Sarazin A, Lehmann AR, Arlett CF, Krutmann J: Photocarcinogenesis and inhibition of intercellular adhesion molecule 1 expression in cells of DNA-repair defective individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6837-6841, 1997
- Amarante-Mendes GP, Naekyung-Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, Bhalla K: Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* **91**: 1700-1705, 1998
- Anderson VC, Thompson DH: Triggered release of hydrophilic agents from plasmalogen liposomes using visible light or acid. *Biochim Biophys Acta* **1109**: 33-42, 1988
- Arenz C, Giannis A: Synthesis of the first irreversible inhibitor of neutral sphingomyelinase. *Eur J Org Chem* **1**: 137-140, 2002
- Asakuma J, Sumitomo M, Asano T, Asano T, Hayakawa M: Selective Akt inactivation and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitization of renal cancer cells by low concentrations of paclitaxel. *Cancer Res* **63**: 1365-70, 2003
- Ballou LR, Lauderkind SJF, Rosloniec EF, Raghov R: Ceramide signalling and the immune response. *Biochim Biophys Acta* **1301**: 272-287, 1996
- Basu-Modak S, Tyrrell RM: Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. *Cancer Res* **53**: 4505-4510, 1993
- Bender K, Blattner C, Knebel A, Jordanov M, Herrlich P, Rahmsdorf HJ: UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol B* **37**: 1-17, 1997
- Bender K, Göttlicher M, Whiteside S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P: Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF- κ B by UV. *EMBO J* **17**: 5170-5181, 1998
- Berneburg M, Grether-Beck S, Kürten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* **274**: 15345-15349, 1999
- Bode A, Dong Z: Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* re2, 2003
- Boesen-de-Cock JGR, Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J: CD95 (Fas/Apo-1) induced ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* **272**: 7560-7565, 1998
- Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V: Distinct signal transduction pathways mediate nuclear factor- κ B induction by IL-1 β in epithelial and lymphoid cells. *J Immunol* **159**: 5264-5272, 1997
- Bose R, Verheij M, Heimovitz-Friedmann A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R: Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanisms for generating death signals. *Cell* **82**: 405-414
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerman AH: Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **277**: 9812-9818, 2002

- Bünger J, Degwert J, Driller H: The protective function of compatible solute ectoin on the skin, skin cells and its biomolecules with respect to UV-radiation, immunosuppression and membrane damage. *IFSCC Magazine* **4**: 1-6, 2001
- Burek C, Roth J, Koch HG, Harzer K, Los M, Schulze-Osthoff K: The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase-deficient Farber disease cells. *Oncogene* **4**: 6493-6502, 2001
- CAMAG Applikationsschriften zur Instrumentellen Dünnschicht-Chromatografie: Bestimmung von Phospholipiden A 52.3 CAMAG Berlin (Deutschland), Muttenz (Schweiz)
- Chatterjee S, Han H, Rollins S, Cleveland T: Molecular cloning, characterization and expression of a novel human neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem* **274**: 37407-37412, 1999
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M, Daga A, Hurko O, Johns D, Lai ST, Nonaka I, Angelini C, Attardi G: MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4221-4225, 1992
- Claude H, Steinbrecht W, Köhler U, Hassler B: in Deutscher Wetterdienst: Klimastatusbericht 2002: Entwicklung der Ozonschicht. <http://www.dwd.de/de/FundE/Klima/KLIS/prod/KSB/ksb02/Ozonschicht.pdf>
- Cobarg CC: Physikalische Grundlagen der wassergefilterten Infrarot-A-Strahlung. In Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung (Vaupel P, Krüger W, Eds.), pp 19-28, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1995
- Coles CA, Forbes PD, Davies RE: An action spectrum for photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* **43**: 275-284, 1986
- Czarny M, Liu J, Oh P, Schnitzer JE: Transient mechanoactivation of neutral sphingomyelinase in caveolae to generate ceramide. *J Biol Chem* **278**: 4424-4430, 2003
- de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH: UV-induced DNA damage, repair, mutations, and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **63**: 19-27, 2001
- de Gruijl FR: Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol* **319**: 359-366, 2000
- de Gruijl FR: Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* **35**: 2003-2009, 1999
- Devary Y, Rosette C, DiDonato JA, Karin M: NF κ B activation by ultraviolet light not dependent on a nuclear signal. *Science* **261**: 1442-1445, 1993
- Dickson RC, Lester RL, Nagiec MM: Serine palmitoyltransferase. *Methods Enzymol* **311**: 3-9, 2000
- Dignam JD, Martin PL, Skastry BS, Roeder RGG: Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* **101**: 582-598, 1983
- DiMascio P, Sies H: Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3'-3'-(1,4-naphthylidene) dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazobicyclo(2.2.2)octane. *J Am Chem Soc* **11**: 2909-2914, 1989
- Dutton PL, Petty KM, Bonner HS, Morse SD: Cytochrome C2 and reaction center of Rhodospseudomonas spheroids Ga membranes. Extinction coefficients, content, half-reduction potentials, kinetics and electric field alterations. *Biochim Biophys Acta* **387**: 536-556, 1975
- Epstein JH: Phototoxicity and photoallergy in man. *J Am Acad Dermatol* **8**:141-147, 1983
- Epstein JH: Phototoxicity and photoallergy. *Semin Cutan Med Surg* **18**: 274-284, 1999

- Fisher WR, Taniuchi H, Anfinsen CB: On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome C. *J Biol Chem* **248**: 3188-3195, 1973
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**: 497-509, 1957
- Frederick JE, Alberts AD: in Biological Responses to Ultraviolet A Radiation: The Natural UV-A Radiation Environment. Urbach F ed, Valdenmar Publishing Company, Overland Parks, KS, 1992, pp.7-18
- Fuchs E, Albers K, Kopan R: in Advances in cell culture Vol 6: Terminal differentiation in cultured human epidermal cells. Maramorosch K, Sato G eds. Academic Press Inc, 1988, pp. 1-33
- Fusenig NE: in Biol of the integument: Vertebrates Vol 2: Mammalian epidermal cells in culture. Bereiter-Hahn J, Motoltsy AG, Richards KS eds, Springer Verlag Inc, New York, 1986, pp. 409-442
- Gers-Barlag H, Wittern KP, Alert D, Finkel P: in Biological Responses to Ultraviolet A Radiation: Some Considerations of the Determination of UV-A Protection. Urbach F ed, Valdenmar Publishing Company, Overland Parks, KS, 1992, pp.329-334
- Ghafourifar P, Klein DS, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, Richter C: Ceramide Induces Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem* **274**: 6080-6084, 1999
- Gille J, Reisinger K, Asbe-Vollkopf A, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R: Ultraviolet-A-induced transactivation of the vascular endothelial growth factor gene in HaCaT keratinocytes is conveyed by activator protein-2 transcription factor. *J Invest Dermatol* **115**: 30-36, 2000
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74, 1977
- Grether-Beck S, Bonizzi G, Schmitt-Brenden H, Felsner I, Timmer A, Sies H, Piette J, Krutmann J: Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *EMBO J* **19**: 5793-5800, 2000
- Grether-Beck S, Buettner R, Krutmann J: Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: Molecular and photobiological mechanisms. *Biol Chem* **378**: 1231-1236, 1997
- Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Krutmann J: Mitochondrial cytochrome C release mediates ceramide-induced activator protein 2 activation and gene expression in keratinocytes. *J Biol Chem* **278**: 47498-47507, 2003
- Grether-Beck S, Krutmann J: Ultraviolet A radiation-induced gene expression in human keratinocytes. *Methods in Enzymology* **319**: 280-289, 2000
- Grether-Beck S, Krutmann J: Utilization of sterols and their derivatives in cosmetic preparations for UVA protection. Internationale Patentanmeldung WO 03/041675 A3, 2004
- Grether-Beck S, Krutmann J: Verwendung von n-Oleylethanolamin zur Behandlung der Schuppenflechte (Psoriasis). DE-PS 10037046.2-41, 2000
- Grether-Beck S, Olazola-Horn S, Schmitt H, Grewe M, Jahnke A, Johnson JP, Briviba K, Sies H, Krutmann J: Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 14586-14591, 1996
- Grewe M, Gyufko K, Krutmann J: Human keratinocytes produce interleukin-10: Modulation by ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation. *J Invest Dermatol* **104**: 3-6, 1995

- Hanada K: Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1632**: 16-30, 2003
- Hannun YA, Obeid LM: The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *Biol Chem* **277**: 25847-25850, 2002
- Hannun YA, Obeid LM: Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci*, **20**: 73-77, 1995
- Hannun YA: Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**: 1855-1859, 1996
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K: Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**: 929-942, 1998
- Harel R, Futerman AH: Inhibition of sphingolipid synthesis affects axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* **268**: 14476-14481, 1993
- Hellige G, Becker G, Hahn G: Temperaturverteilung und Eindringtiefe wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung. In *Wärmetherapie mit wassergefilterter Infrarot-A-Strahlung* (Vaupel P, Becker G, Eds), pp 63-80, Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1995
- Henninger HP, Hoffmann R, Grewe M, Schulze-Specking A, Decker K: Purification and quantitative analysis of nucleic acids by anion-exchange high-performance liquid chromatography. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374**:625-634, 1993
- Herrlich P, Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Gebel S, Blattner C, Rahmsdorf HJ: The mammalian UV response (mechanism of DANN damage induced gene expression). In: *Advances in Enzyme Regulation Vol 34* (Weber G Ed), pp381-395, Oxford, UK: Pergamon Press, 1994
- Herrlich P, Blattner C, Knebel A, Bender K, Rahmsdorf HJ: Nuclear and non-nuclear targets of genotoxic agents in the induction of gene expression. Shared principles in yeast, rodents, man and plants. *Biol Chem* **378**: 1217-1229, 1997
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S: Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* **291**: 1800-1803, 2001
- Holbrook NJ, Fornace AJ: Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol* **3**: 825-833
- Huang C, MA W, Bowden GT, Dong Z: Direct evidence for an important role of sphingomyelinase in ultraviolet-induced activation of c-jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **272**: 27753-27757, 1997
- Ikeda M, Schroeder KK, Mosher LB, Woods CW, Akeson AL: Suppressive effect of antioxidants on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **103**: 791-796, 1994
- Imagawa M, Chiu R, Karin M: Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* **51**: 251-260, 1987
- Jean S, Bideau C, Bellon L, Halimi G, De Meo M, orsiere T, Dumenil G, Berge-Lefranc JL, Botta A: The expression of genes induced in melanocytes by exposure to 365-nm UVA: study by cDNA arrays and real-time quantitative RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* **1522**: 89-96, 2001
- Jiang CH-K, Connolly D, Blumenberg M: Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dematol* **97**: 969-973, 1991
- Johnson AC: Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J Biol Chem* **271**: 3033-3038, 1996

- Joseph P, Xie T, Xu Y, Jaiswal AK: NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) expression, regulation, and the role in cancer. *Oncol Res* **6**: 525-532, 1994
- Kabuyama Y, Homma MK, Sekimata M, Homma Y: wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem Photobiol* **73**: 147-152
- Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Poolman B, and Schwille P: Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem* **278**: 28109-28115, 2003
- Kaiser S, DiMascio P, Murphy ME, Sies H: Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch Biochem Biophys* **277**: 101-108, 1990
- Kanofsky JR: Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact* **70**: 1-28, 1989
- Karasek MA: In *Biochem and physiol of the skin: Cell culture of human skin epidermal cells*. Goldsmith LA ed. Oxford Press, New York, 1983, pp 230-240
- Karin M, Herrlich P: in *Genes and Signal Transduction in Multistage Carcinogenesis: Cis-and trans-acting elements responsible for induction of specific genes by tumor promoters, serum factors, and stress*. Colburn NH ed, Marcel Dekker, New York, pp415-440
- Khan IU, Boehm KD, Elmets CA: Modulation of IFN γ -induced HLA-DR expression on the human keratinocyte cell line SCC-13 by ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol* **57**: 103-106, 1993
- Kielbassa C, Roza L, Epe B: Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* **18**: 811-816, 1997
- Klotz L-O, Briviba K, Sies H: Signaling by singlet oxygen in biological systems. In Sen C, Sies H and Baeuerle P(eds): *Antioxidants and redox regulation of genes*. Academic Press San Diego, Ca, pp 3-20
- Knaapen AM, Albrecht C, Becker A, Hohr D, Winzer A, Haenen G, Borm PJA, Schins RFP: *Carcinogenesis* **23**: DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. 1111-1120, 2002
- Kochevar IE, Pathak MA, Parrish JA: Photophysics, Photochemistry, and Photobiology. In *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine* (Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, Eds), pp 220-229, McGraw-Hill, New York, 1999
- Kolesnick R N, Golde DW: The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* **77**: 325-328, 1994
- Kolesnick RN, Haimowitz-Friedmann A, Fuks Z: The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem Cell Biol* **72**: 471-474, 1994
- Kolter T, Proia RL, Sandhoff K: Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277**: 25859-25862, 2002
- Kroeger KM, Abraham LJ: Identification of an AP2 element in the -323 to -285 region of the TNF- α gene. *Biochem Mol Biol Int* **40**: 43-51, 1996
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA: Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* **18**: 44-51, 1997
- Krönke M: The mode of ceramide action: the alkyl protrusion model. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**:103-110, 1997
- Krutmann J, Czech W, Diepgen T, Niedner R, Kapp A, Schopf E: High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* **26**: 225-30, 1992

- Krutmann J, Czech W, Parlow F, Trefzer U, Kapp A, Schöpf E, Luger TA: Ultraviolet radiation effects on human keratinocyte ICAM-1 expression: UV-induced inhibition of cytokine induced ICAM-1 mRNA expression is transient, differentially restored for IFN- γ versus TNF- α , and followed by ICAM-1 induction via a TNF- α like pathway. *J Invest Dermatol* **98**: 923-923, 1992
- Krutmann J, Grether-Beck S: Ultraviolet A radiation induced signaltransduction in human keratinocytes. In *Biologic effects of light* (MF Holick, ed) Kluwer Academic Publishers, Boston, pp 289-296, 2002
- Krutmann J, Grewe M: Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen species in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression *J Invest Dermatol* **105**: 67S-70S, 1995
- Krutmann J, Koeck A, Schauer E: Tumor necrosis factor b and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocytes ICAM-1 expression. *J Invest Dermatol* **95**: 127-131, 1990
- Krutmann J, Mang R, Grether-Beck S: Analysis of cytokine profile in human skin. *Methods Mol Biol* **215**: 23-27, 2003
- Krutmann J: in *Epidermal growth factors and cytokines: Regulatory interaction between epidermal cell adhesio molecules and cytokines*. Luger TA, Schwarz T (eds), Marcel Dekker Inc, New York, pp415-432, 1994
- Krutmann J: New developments in photoprotection of human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **14**: 401-407, 2001
- Krutmann J: Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci* **23**: S22-S26, 2000
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970
- Lavker RM, Veres DA, Irwin CJ, Kaidbey KH: Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. *Photochem Photobiol* **62**: 348-352, 1995
- Leenders HJ, Beckers PJ: The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity. A correlation between induced gene activity and an increase in activity of a respiratory enzyme. *J Cell Bio* **55**: 257-265, 1972
- Liao X, Small WC, Sreere PA, Butow RA: Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**: 38-46, 1991
- Listenberger LL, Ory DS, Schaffer JE: Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J Biol Chem* **276**:14890-14895, 2001
- Liu J, Mathias S, Yang Z, Kolesnick RN: Renaturation and TNF- α stimulation of a 97kDa ceramide-activated protein kinase. *J Biol Chem* **269**: 3047-3052, 1994
- Liu Y, Wada T, Yamashita Y, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* **106**: 951-961, 2000
- Livak KJ, Schmittgen T: Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**: 402-408, 2001
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S: Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 193-201, 2002
- Magnaldo T, Vidal RG, Ohtsuki M, Freedberg IM, Blumenberg M: On the role of AP2 in epithelial-specific gene expression. *Gene Expr* **3**: 307-315, 1993
- Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz L-O: Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400nm) in the presence of cell culture medium elicits

- biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res* **73**: 391-397, 2003
- Mansat V, Bettaïeb A, Levade T, Laurent G, Jaffr  zou J-P: Serine protease inhibitors block neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation and apoptosis triggered by daunorubicin. *FASEB J* **11**:695-702, 1997
- Martinou J-C: Apoptosis. Key to the mitochondrial gate. *Nature* **399**: 411-412, 1999
- Matsui MS, DeLeo VA, in Skin Cancer: Mechanisms and Human Relevance. Mukhtar H ed CRC Press, Ann Arbor, MI, 1995 pp.21-30
- Merrill AH jr, van Echten G, Wang E, Sandhoff K: Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acetyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J Biol Chem* **268**: 27299-27306, 1993
- Miguet C, Monier S, Bettaïeb A, Athias A, Bessede G, Laubriet A, Lemaire S, Neel D, Gambert P, Lizard G: Ceramide generation occurring during 7beta-hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death Differ* **8**: 83-99, 2001
- Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, Tjian R: Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **5**:105-119, 1991
- Miyake Y, Kozutsumi Y, Nakamura S, Fujita T, Kawasaki T: Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 396-403, 1995
- Morand OH, Zoellner RA, Raetz CR: Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J Biol Chem* **263**: 11597-11606,1988
- Morita A, Grewe M, Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Krutmann: Induction of proinflammatory cytokines in human epidermoid carcinoma cells by in vitro ultraviolet A1 irradiation. *Photochem Photobiol* **65**: 630-635, 1997
- Morita A, Werfel T, Stege H, Ahrens C, Karmann K, Grewe M, Grether-Beck S, Ruzicka T, Kapp A, Klotz L-O, Sies H, Krutmann J: Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J Exp Med* **186**: 1763-1768, 1997
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Methods* **65**: 55-63, 1983
- Norris DA, Lyons B, Middleton HM, Yohn JY, Kashihara-Sawami M: Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **95**: 132-138, 1990
- Norris PG: Advances in understanding the pathogenesis of photodermatosis. *Curr Opin Dermatol* **1**: 185-190, 1993
- Numakawa T, Nakayama H, Suzuki S, Kubo T, Nara F, Numakawa Y, Yokomaku D, Araki T, Ishimoto T, Ogura A, Taguchi T: Nerve growth factor-induced glutamate release is via p75 receptor, ceramide, and Ca²⁺ from ryanodine receptor in developing cerebellar neurons. *J Biol Chem* **278**: 41259-41269, 2003
- Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA: Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in

- mediating the action of exogenous ceramide. *J Biol Chem* **277**: 12960-12969, 2002
- Packer L, Sies H: Singlet oxygen, UVA and ozone. *Methods Enzymol* **319**: 1-622; 2000
- Paller AS, Arnsmeier SL, Robinson JK, Bremer EG: Alteration in keratinocyte ganglioside content in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* **98**: 226-232, 1992
- Parikh VS, Morgan MM, Scott R, Clements LS, Butow RA: The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* **235**: 576-580, 1987
- Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ, Hannun YA: Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 9078-9084, 2000
- Pierlot C, Aubry JM, Briviba K, Sies H, DiMascio P: Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods Enzymol* **319**: 3-20; 2000
- Piette J, Piret B, Bonizzi G, Schoonbroodt S, Merville MP, Legrand-Poels S, Bours V: Multiple redox regulation in NF-kappaB. *J Biol Chem* **378**: 1237-1245, 1997
- Ponte P, Ng SY, Engel J, Gunning P, Kedes L: Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic Acids Res* **12**: 1687-1696, 1984
- Raghavan A, Ogilvie RL, Reilly C, Abelson ML, Raghavan S, Vasdewani J, Krathwohl M, Bohjanen PR: Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic Acids Res* **30**: 5529-5538, 2002
- Ramer R, Weinzierl U, Schwind B, Brune K, Hinz B: Ceramide is involved in r(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol* **64**: 1189-1198, 2003
- Ravanat JL, Douki T, Cadet J: Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components *J Photochem Photobiol B* **63**: 88-102, 2001
- Ridgeway ND, Lagace TA, Cook HW, Byers DM: Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and cholesterol transport on oxysterol-binding protein phosphorylation and Golgi localization. *J Biol Chem* **272**: 31621-31628, 1998
- Rippo MR, Malisan F, Ragavan L, Tomassini B, Condo I, Costantini P, Susin SA, Rufini A, Todaro M, Kroemer G, Testi R: GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB J* **14**: 2047-2054, 2000
- Roza L, Baan RA, van der Leun JC, Kligman L, Young AR: UVA hazards in skin associated with the use of tanning equipment. *J Photochem Photobiol B* **3**: 281-287, 1989
- Ryter SW, Tyrrell: Singlet molecular oxygen (1O_2): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med* **24**: 1520-1534, 1998
- Sacchetta P, Di-Cola D, Federici G: Alkaline hydrolysis of N-ethylmaleimide allows a rapid assay of glutathione disulfide in biological samples. *Anal Biochem* **154**: 205-208, 1986
- Sandhoff K, Kolter T: Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Phil Trans R Soc Lond B* **358**: 847-861, 2003
- Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H: Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* **331**: 304-306, 1993
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA: Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun* **17**: 221-237, 1992

- Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W: Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J* **12**: 3095-3104, 1993
- Shah G, Ghosh R, Amstad PA, Cerutti PA: Mechanism of induction of c-fos by ultraviolet B (290-320 nm) in mouse JB6 epidermal cells. *Cancer Res* **53**: 38-45, 1993
- Spiegel S; Foster D, Kolesnick RN: Signal transduction through lipid second messengers. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 159-167, 1996
- Stade BG, Messer G, Riethmueller G, Johnson JP: Structural characteristics of the 5' region of the human ICAM-1 gene. *Immunobiology* **182**: 79-87, 1990
- Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA: Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**: 925-933, 1988
- Stege H, Roza L, Krutmann J: Thymine dimer formation is causally related to ultraviolet B radiation (UVBR)-induced immunosuppression in vivo in human skin. (Abstr) *J Invest Dermatol* **106**: 923, 1996
- Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, Krutmann: Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 1790-1795, 2000
- Stege H, Schopf E, Ruzicka T, Krutmann J: High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* **347**: 64, 1996
- Stroh K: in Handbuch Umweltberatung Bayern: Stratosphärische Ozonschicht und Ozonloch. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit und Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen (Hrsg) Loseblattsammlung 1992-2002. 2004
- Sundaram KS, Lev M: Inhibition of sphingolipid synthesis by cycloserine in vitro and in vivo. *J Neurochem* **42**: 577-581, 1984 a
- Sundaram KS, Lev M: L-cycloserine inhibition of sphingolipid synthesis in the anaerobic bacterium *Bacteroides levii*. *Biochem Biophys Res Commun* **119**: 814-819, 1984 b
- Thyagarajan R, Arunkumar N, and Song W: Polyvalent antigens stabilize B cell antigen receptor surface signaling microdomains. *J Immuno.* **170**: 6099-6106, 2003
- Tomiuk S, Hoffmann K, Nix M, Zumbansen, M Stoffel W: Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: function in sphingolipid signalling? *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3638-3643, 1998
- Tyrrell RM: Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight – from models to reality. *Bioassays* **18**: 139-148, 1996
- van der Stolpe A, Caldenhoven E, Stade B, Koendermann, L, Raaijmakers JA, Johnson JP, van der Saag PT: 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter. *J Biol Chem* **269**: 6185-6192, 1994
- Vandekerckhove J, Weber K: Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 1106-1110, 1978
- Vile GF, Tanew-Ilitschew A, Tyrrell RM: Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. *Photochem Photobiol* **62**: 463-468, 1995

- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Starck L, Graupner V, Dorken B, Daniel PT: Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* **6**: 4009-4019, 2002
- Watts JD, Gu M, Polverino AJ, Patterson SD, Aebersold R: Fas-induced apoptosis of T-cells occurs independently of ceramide generation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7292-7296, 1997
- Weiss B, Stoffel W: Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem* **249**: 239-247, 1997
- Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K: Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol* **104**: 194-194, 1995
- Zoellner RA, Morand OH, Raetz CR: A possible role of plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* **263**: 11590-11597, 1988
- Zumbansen M, Stoffel W: Tumor necrosis factor α activates NF κ B in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* **272**: 10904-10909, 1997

8 Danksagung

Mein Dank gebührt in erster Linie Herrn Professor Dr. Jean Krutmann, der einer Mikrobiologin die Möglichkeit gab, auf größere Untersuchungsobjekte umzusatteln. Dank seiner langjährigen Unterstützung wurde diese Arbeit erst möglich.

Ohne Kooperationen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Helmut Sies und seinen Mitarbeitern insbesondere Lars-Oliver Klotz für die Unterstützung im Bereich der reaktiven Sauerstoffspezies.

Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger und seinen Mitarbeitern PD Dr. Ulrich Warskulat und Dr. Roland Reinehr für eine fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Signaltransduktion infolge von UV- und Osmosignaling.

Eine exzellente Kooperation verbindet unser Labor mit Professor Dr. Judith Johnson (Institut für Immunologie, LMU, München) und Andreas Jahnke.

Meine Einführung in die Lipidanalytik verdanke ich Herrn Professor Dr. Jacques Piette (Labor für Virologie und Immunologie am Institut für Pathologie der CHU Liège) und Giuseppina Bonizzi.

Lothar Jaenicke danke ich für die Nachhilfe beim Nachweis von Sphingomyelinspaltprodukten.

Meinen Mitarbeiterinnen Heidi Brenden, Maryam Salahshour-Fard, Daniela Brammertz und den Mitarbeitern Ingo Felsner, Andreas Timmer und Karsten Ruwiedel danke ich ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit.

Die vorgestellten Arbeiten wurden aus Mitteln der DFG (Sonderforschungsbereich 503, Teilprojekt B2) finanziert.

9 Lebenslauf

10.08.1959	Dr. rer. nat. Susanne Grether-Beck geboren in Freiburg im Breisgau
1966-1970	Gerhard Hauptmann Grund- und Hauptschule in Freiburg
1970-1979	St. Ursula-Mädchengymnasium in Freiburg Studiengang Diplom-Biologie an der Albert-Ludwigs- Universität in Freiburg
1979-1982	Grundstudium
1983-1985	Hauptstudium mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Biochemie, Genetik, Pharmakologie und Toxikologie
1986	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie bei Prof. Dr. rer. nat. J. Oelze mit dem Titel: Der Ausbildungszustand des Photosynthese-Apparates von <i>Rhodobacter capsulatus</i> in Abhängigkeit von der Wachstumsrate in kontinuierlicher Kultur bei konstanten Lichtbedingungen
1987	Dissertation am Biochemischen Institut bei Prof. Dr. Brandsch/Prof. Dr. Decker mit dem Titel: Untersuchungen zur Struktur und Regulation der Nikotin-Dehydrogenase in <i>Arthrobacter nicotinovorans</i>
1993-1994	Postdoc bei Prof. Dr. med. J. Krutmann an der Universitäts- Hautklinik der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg
1993	Fortbildung zur Projektleiterin und Beauftragten für Biologische Sicherheit an der Albert-Ludwigs-Universität
1994-2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. J. Krutmann in der Arbeitsgruppe Klinische und Experimentelle Dermatologie in der Hautklinik der Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität
1998	Grünenthal-Förderpreis für Haut und Umwelt
1999	Strahlenschutzlehrgang für Naturwissenschaftler und Diplomingenieure an der Fachhochschule Aachen Abteilung Jülich
2002	seit 01.01.02 Leitende Wissenschaftlerin für den Bereich Zellbiologie am Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität gGmbH
2002	Heinz-Maurer-Preis für Dermatologische Forschung