

**Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zum
Sphingosin-Stoffwechsel *in vitro* und in Mausmutanten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Ina Hammels

aus Bergisch-Gladbach

Hundt Druck, Köln

2009

Die vorliegende Arbeit wurde an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im
Laboratorium für molekulare Neurowissenschaften
unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. mult. W. Stoffel angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. mult. W. Stoffel

Prof. Dr. G. Schwarz

Vorsitz: Prof. Dr. S. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2009

Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. mult. W. Stoffel danke ich für die interessante Themenstellung, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. G. Schwarz danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Coreferat zu übernehmen.

Ich möchte mich außerdem bedanken bei:

Frau Erika Binczek, Frau Brigitte Handwerk, Frau Barbara Holz, Frau Britta Jenke und Frau Claudia Taprogge für die immer vorhandene Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung. Dabei insbesondere Frau Barbara Holz für die Unterstützung in der Zellkultur, Frau Britta Jenke für die Generierung der induzierbaren Cre-transgenen Mauslinie und Frau Erika Binczek für die zahlreichen unterstützenden und motivierenden Diskussionen.

Herrn Dr. Robert Günter und Frau Dr. Christine Kiss für die nette Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfe.

Für Christoph und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Geschichte der Sphingolipide.....	1
1.2 Biosynthese der Sphingolipide.....	1
1.3 Katabolismus der Sphingolipide.....	5
1.4 Apoptose.....	7
1.5 Serin Palmitoyl-CoA-Transferase.....	10
1.6 Sphingosin-Kinase.....	14
1.7 Sphingosin-1-Phosphat Lyase.....	16
1.8 Gene-Targeting.....	18
1.8.1 Konditionierte Genausschaltung.....	19
1.8.2 Cre-exprimierende, transgene Mausmodelle.....	19
2 Aufgabenstellung.....	21
3 Ergebnisse.....	22
3.1 Etablierung einer stabilen spt-Expression in HEK293 Zellen.....	22
3.1.1 Erstellung der Konstrukte.....	22
3.1.2 Nachweis der spt-Expression in transfizierten HEK293 Zellen.....	23
3.1.3 Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von spt.....	25
3.1.4 Gewebsspezifische Verteilung der spt Expression in der Maus.....	26
3.2 Biochemische Charakterisierung.....	27
3.2.1 [U- ¹⁴ C]-Serin-Assay.....	27
3.2.2 [1- ¹⁴ C]-Palmitinsäure.....	28
3.3 Untersuchungen zur Interaktion von spt mit anderen Genen im Sphingolipidmetabolismus.....	30
3.3.1 Expression anderer Gene im spt überexprimierenden Klon.....	30
3.3.2 Expression von spt in Sphingomyelinase defizienten Mäusen.....	31
3.4 Verwertung von Monoensäuren durch spt.....	33
3.5 Apoptose-Messungen.....	35
3.5.1 AnnexinV-Färbung.....	35
3.5.2 TUNEL-Assay.....	36
3.6 Katabolismus der Sphingolipide.....	37
3.6.1 Etablierung einer stabilen Kinase-, und Lyase-Expression.....	37
3.6.1.1 Erstellung der Konstrukte.....	37
3.6.2 Expressionsnachweis.....	40
3.7 Biochemische Charakterisierungen.....	43
3.7.1 Biochemische Charakterisierung der Sphingosin-Kinase.....	43
3.7.2 Biochemische Charakterisierung der Sphingosin-1-Phosphat Lyase.....	44
Synthese von [³ H]-markiertem Dihydrosphingosin-1-Phosphat.....	44
Biochemische Charakterisierung.....	45
3.8 Untersuchung zur Interaktion zur Interaktion der Kinase und der Lyase mit anderen Genen des Sphingolipidmetabolismus.....	47
3.8.1 Expression anderer Gene im Kinase-, bzw. Lyase-überexprimierenden Klon.....	47
3.8.2 Untersuchung zur Expression der Kinase und der Lyase in Sphingomyelinase defizienten Mäusen.....	48
3.9 Apoptose.....	50

3.10	Generierung einer spt-defizienten Mauslinie.....	51
3.10.1	Konstrukte.....	51
3.10.2	Überprüfung der Konstrukte.....	53
3.10.2.1	Southern Blot.....	53
3.10.2.2	Sequenzierung der loxP-Sequenzen.....	54
3.10.2.3	294-Cre.....	55
3.11	Herstellung und Analyse von ES-Zellklonen.....	56
3.12	Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zellklone.....	58
3.13	Transiente Cre-Expression.....	59
3.14	Blastozysteninjektion.....	60
3.15	Erstellung einer induzierbaren, leberspezifischen Mauslinie.....	61
3.15.1	Klonierungsstrategie.....	61
3.15.2	Charakterisierung.....	62
3.15.3	Vorkerninjektion.....	63
3.15.4	Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	63
3.15.5	Analyse der transgenen Mäuse.....	64
3.15.6	Induktion von Cre.....	65
3.16	Erstellung eines neuen Konstruktes zur Generierung eines konditionellen Knock-out.....	66
3.16.1	Klonierungsstrategie.....	66
3.16.2	Überprüfung des erstellten Konstruktes.....	67
3.17	Expressionsstärke der sptlc3 in der Maus.....	69
4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	71
5	Diskussion.....	74
	Enzymexpressionsstudien	
I.	<i>In vitro</i> Studien zum Sphingosinstoffwechsel.....	74
	Lokalisation und gewebspezifische spt Expression in der Maus... ..	74
	Expressionsunterschied zwischen der Transkriptions-, und der Translations- ebene.....	75
	Untersuchungen zu Veränderungen des Lipidstoffwechsels im spt-Klon.....	75
	Untersuchung zur Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus im spt-Klon.....	76
	Expression von spt in Sphingomyelinase defizienten Mäusen.....	77
	Substratspezifität von spt.....	78
	Apoptoseuntersuchungen.....	78
	Sphingosin-1-Phosphat Lyase-, und Sphingosinkinase-Enzymexpressionsstudien	80
	Apoptoseuntersuchungen.....	81
II.	Genetische Strategie zur Funktion der Sphingolipide durch Deletion des Schlüsselenzyms spt.....	83
	Generierung einer spt defizienten Maus.....	83
	Transiente Cre Rekombination.....	84
	Blastozysteninjektion.....	85
	Erstellung einer induzierbaren Cre-Mauslinie.....	85
	Vergleich der Expression von sptlc3 zu sptlc2 in der Maus.....	87
6	Material und Methoden.....	88
6.1	Zellkultur-Methoden.....	88
6.1.1	HEK293-Zellen.....	88
6.1.2	Embryonale Fibroblasten.....	88
6.1.3	COS-Zellen.....	88
6.1.4	ES-Zellen.....	89
6.1.4.1	Selektion potentiell positiver ES-Zell-Klone.....	89

6.1.4.2	Isolation selektionierter ES-Zell-Klone.....	89
6.1.4.3	Kryokonservierung von ES-Zellen.....	90
6.1.4.4	Auftauen und Expansion positiver Zellklone.....	90
6.1.4.5	Karyotypbestimmung.....	90
6.1.4.6	Transiente Cre-Expression.....	91
6.2	Molekularbiologische Methoden.....	91
6.2.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	91
6.2.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	92
6.2.3	Gewinnung von genomischer DNA.....	92
6.2.3.1	DNA aus ES-Zellen.....	92
6.2.3.2	DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien.....	92
6.2.4	Restriktionsanalysen.....	93
6.2.5	Radioaktive DNA-Markierung.....	93
6.2.6	Ligation.....	93
6.2.7.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	93
6.2.7.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen.....	93
6.2.8	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	94
6.2.9	RNA Präparation.....	94
6.2.10	Reverse-Transkription.....	94
6.2.11	Quantitative PCR.....	95
6.3	Biochemische Methoden.....	95
6.3.1	Proteinkonzentration.....	95
6.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	95
6.3.3	Extraktion Proteine.....	95
6.3.4	Lipid-Analyse.....	96
6.3.4.1	SPT-Serin Assay.....	96
6.3.4.2	Palmitat-Assay.....	96
6.3.4.3	Sphingosin-1-Phosphat-Lyase-Assay.....	97
6.3.4.4	Kinase-Assay.....	98
6.3.5	Gaschromatographie.....	98
6.4	Immunologische Methoden.....	99
6.4.1	Western Blot.....	99
6.4.2.1	Immunfärbungen an Zellen.....	99
6.4.2.2	Immunfärbungen an Gewebeschnitten.....	100
6.4.3	EGFP Fluoreszenz Analyse.....	100
6.4.4	Alkalische Phosphatase Färbung.....	100
6.5	Apoptose-Messungen.....	101
6.5.1	AnnexinV.....	101
TUNEL-Test.....		101
6.6	Methoden zur <i>in vivo</i> Mutagenese.....	101
6.6.1	Mäusezucht.....	101
6.6.2	Mikroinjektion.....	101
6.6.3	Vasektomierte Männchen.....	102
6.6.4	Blastozysteninjektion.....	102
7	Anhang.....	104
7.1	Verwendete Plasmide.....	104
7.2	Verwendete Oligonukleotide.....	104
7.3	Abkürzungen.....	105
8	Literaturverzeichnis.....	108
	Zusammenfassung.....	122
	Abstract.....	124

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Sphingolipide

Thudichum isolierte im Jahr 1882 Sphingosin als Hydrolyseprodukt des Phrenosins (Thudichum, 1882).

Der genaue strukturelle Aufbau des Sphingosins wurde 1931 von Klenk und Diebold aufgeklärt (Klenk et al., 1931). Nach Chromsäureoxidation des Sphingosins und Ozonolyse seines Triacetylderivates erhielten sie ein C₁₄-Bruchstück, das Myristinaldehyd, und einen C₄-Körper, die DL- α -Aminobuttersäure. Durch diese Experimente wurden die Lage der Doppelbindung und die C₁₈-Kettenlänge festgelegt. Für die Struktur des Sphingosins wurde die 3-Amino-1,2-dihydroxy-octadec-4-ens Struktur postuliert. Erst Carter gelang es 1947 durch Perjodatspaltung die richtigen Positionen der funktionellen Gruppen zu bestimmen (Carter et al., 1947). Die Aminogruppe substituiert am C-Atom 2 zwischen den Hydroxygruppen an den C-Atomen 1 und 3. 1951 wurde die D-Konfiguration am C-Atom 2 bestimmt (Carter & Humiston, 1951).

Mittels IR-Spektroskopie wurde 1952 die trans-Konfiguration der Doppelbindung im Sphingosin, Sphingosinsulfat, Triacetyl sphingosin, Sphingomyelin und den Cerebrosiden nachgewiesen (Mislow, 1952, Marinetti et al., 1954). Die Bestimmung der erythro Konfiguration erfolgte 1953 durch Jenny und Grob (Jenny et al., 1953). Danach besitzt das Sphingosin die Struktur des D (+)-erythro-2-Amino-4-trans-octadecen-1,3-diol.

1.2 Biosynthese der Sphingolipide

Nachdem Acetat und Serin als Vorläufermoleküle der Sphingolipide identifiziert wurden (Sprinson & Coulon, 1954, Zabin & Mead, 1953, Zabin & Mead, 1954), begann die Aufklärung des Biosyntheseweges der Sphingolipide. Die Syntheseschritte, bis zur Ebene des Ceramids, wurden durch Stoffel und Snell aufgedeckt (Braun & Snell, 1967, Braun & Snell, 1968, Stoffel et al., 1967, Stoffel et al., 1968, Stoffel et al., 1968) (Abbildung 1).

Durch die Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (SPT), wird die Bildung von 2,3-Oxodihydrosphingosin, das durch die 3-Oxodihydrosphingosin-Reduktase zum 2S, 3R Dihydrosphingosin reduziert wird, katalysiert. Die Acyl-CoA Transferase katalysiert die Bildung von Dihydroceramid, in dem das Dihydrosphingosin durch eine Desaturase zu Ceramid dehydrogeniert wird. Diese Reaktionssequenz findet an der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Hirschberg et al., 1993, Mandon et al., 1992).

Sphingolipid Metabolismus

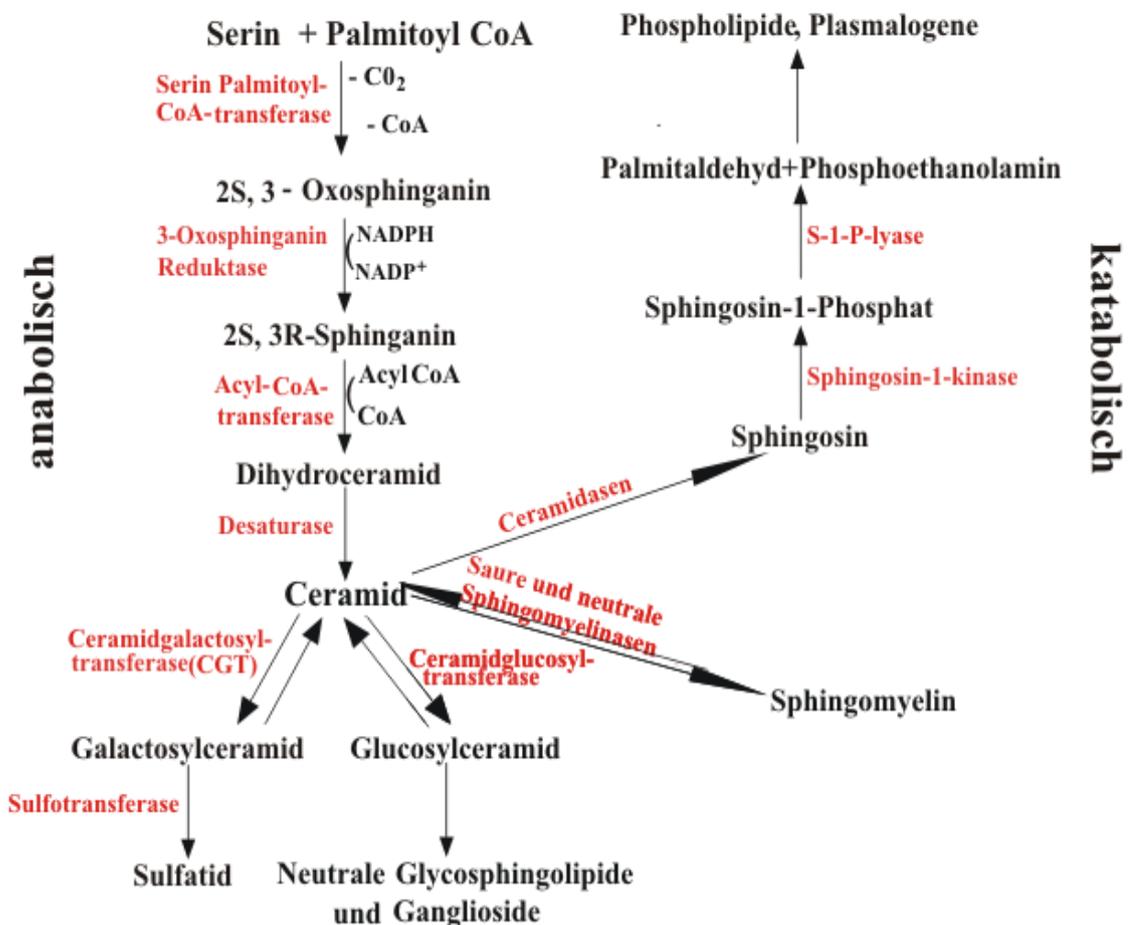


Abbildung 1: Sphingolipid-Metabolismus

Die Grundlage der verschiedenen Sphingolipide bildet das Sphingosin, das zwei asymmetrische Kohlenstoff-Atome besitzt (Abb.:2). Im Ceramid ist eine langkettige Fettsäure immer durch eine Amidbindung an die Aminogruppe von C2 gebunden.

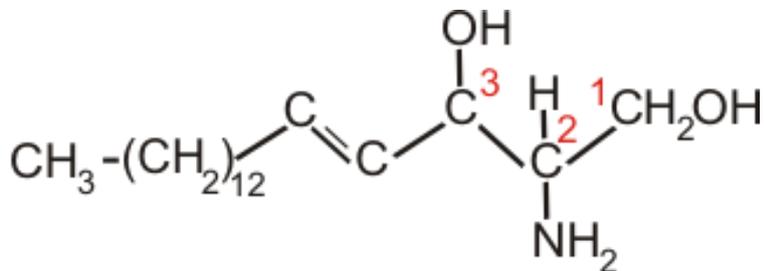


Abbildung 2: Sphingosin

Das Sphingosin bildet die Grundlage der Sphingolipide. Durch Bindung einer Fettsäure an C2 wird Ceramid gebildet. Bindet danach ein Zucker kovalent an C1, so entstehen Glykosphingolipide.

Die primäre Alkoholgruppe an C1 stellt das nukleophile Zentrum dar.

Ausgehend vom Ceramid kann an C1 eine kovalente Bindung mit einem Zucker auf dem Weg zu der Klasse der Glykosphingolipide (Cerebroside, Sulfatide, Globoside und Ganglioside) eingegangen werden.

Der sekundäre Alkohol an C3 ist überwiegend unsubstituiert.

Das Sphingomyelin ist das einzige Phospho-Sphingolipid. Die Synthese des Sphingomyelins findet im Lumen des Golgi-Apparates statt (Jeckel et al., 1990). Es existieren zwei Sphingomyelin-Synthasen, wobei die Sphingomyelin-Synthase 1 membranständig im Golgi-Apparat, die Sphingomyelin-Synthase 2 an der Plasmamembran lokalisiert ist (Huitema et al., 2004). Durch die Sphingomyelin-Synthase wird der Transfer der Phosphorylcholingruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid katalysiert. Es entstehen Sphingomyelin und Diacylglycerol. Der primäre Alkohol ist hier durch eine Phosphodiesterbrücke mit dem Cholin verestert. Die Aminogruppe des Sphingosins ist mit einer langkettigen Fettsäure durch eine Amidbindung verbunden. Sphingomyelin ist also ein Ceramidphosphocholin. Die am meisten vorkommenden Fettsäuren im Sphingomyelin sind die Palmitin-, Stearin-, Lignocerin- und die Nervonsäure. Sphingomyelin ist zwitterionisch geladen. Es ist in der Plasmamembran lokalisiert.

Zu den Glycosphingolipiden zählen die Cerebroside, Sulfatide, Globoside und Ganglioside.

Bei den Cerebrosiden unterscheidet man zwischen Galactosylcerebrosiden und Glucosylcere-

brosiden. Die Galaktose-, bzw Glukose-Einheit ist mit dem C1-Atom des Zuckers an die C1-Position des Ceramids gebunden. Die Synthese findet zwischen Ceramiden und aktivierten Nucleotidzuckern, der UDP-Galaktose bzw. der UDP-Glukose statt. Sie wird durch die Ceramidgalactosyltransferase (Schulte & Stoffel, 1993) bzw. durch die Ceramidglucosyltransferase (Basu et al., 1968) katalysiert. Die Ceramidgalactosyltransferase ist an das endoplasmatische Retikulum im Lumen gebunden (Sprong et al., 1998), die Ceramidglucosyltransferase befindet sich dagegen in der cytosolischen Lamelle des Golgi-Apparates (Futerman & Pagano, 1991, Jeckel et al., 1992). Hohe Konzentrationen der beiden Enzyme findet man in Oligodendrozyten, was auf eine wichtige Funktion in der Myelinogenese schließen lässt (Stoffel & Bosio, 1997).

Sowohl der hydrophobe, als auch der polare Anteil der Cerebroside verleihen der Myelinmembran besondere Eigenschaften, zu denen die Fluidität und die Polarität gehören.

Die Sulfatide (Sulfoglycosphingolipide) sind Schwefelsäureester der Galactocerebroside. Sie entstehen durch Übertragung einer Sulfatgruppe von 3-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf den Zucker, katalysiert durch die Sulfotransferase (Honke et al., 1997, Honke et al., 1996). Die Analyse und Charakterisierung der Sulfatide begann vor allem nachdem bekannt wurde, daß sich Sulfatide im Gehirn von Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie ansammeln. Die Krankheit wird als metachromatisch bezeichnet, weil das Gewebe beim Kontakt mit saurem Kresylviolett einen Farbumschlag ins braunrote zeigt (Helmstaedt, 1963). Dieser Farbumschlag resultiert aus der Ansammlung der Sulfatide. Desweiteren besitzen die Sulfatide die strukturellen Anforderungen eines Opiatrezeptors. Antikörper gegen Sulfatid antagonisieren die Effekte von Morphin und β -Endorphin (Craves et al., 1980, Loh et al., 1978). Sulfatide bilden das Epitop für den Oligodendrozytenmarker O4 (Sommer & Schachner, 1981). Das Galactocerebrosid-3-sulfat stellt das am häufigsten vorkommende Sulfatid im Gehirn dar. Die Sulfatide sind ein wichtiger Bestandteil der Myelinscheiden (Norton & Poduslo, 1973).

Die Ganglioside (Sialosylglycosylsphingolipide) beinhalten mindestens einen Sialinsäurerest in der Oligosaccharidkopfgruppe und sind negativ geladen. Zum ersten Mal beschrieben wurden sie 1935 von Ernst Klenk. Sie entstehen durch die Übertragung weiterer Monosaccharide auf Glucosylceramid. Die Synthese findet an der luminalen Oberfläche der Golgi-Membran statt. Die von Svennerholm (Svennerholm, 1963) festgelegte Nomenklatur für Ganglioside ist folgende (erläutert am Beispiel von GM₁): G steht für Gangliosid, M bezeichnet die Anzahl der Sialinsäuren im Gangliosid (M=monosialo, D=disialo und T=trisialo) und 1 muß in die Gleichung (5-n) eingesetzt werden, wobei die resultierende Zahl

die Anzahl der Monosaccharide im Gangliosid angibt. Ganglioside kommen gehäuft in Ganglienzellen und zu einem geringeren Teil auch in den Nervenendigungen vor. GM₁-Ganglioside dienen als Rezeptoren bestimmter Toxine, i.e. Cholera, Tetanus und Influenza (Richards et al., 1979, Schengrund et al., 1991). Das Cholera-Toxin besteht aus einer A-Untereinheit und fünf identischen B-Untereinheiten, damit gehört es zu den AB₅ Toxinen. Die pentamere B-Untereinheit bindet mit hoher Affinität an GM₁ an der apikalen Zelloberfläche (Cuatrecasas, 1973, Holmgren et al., 1975). Bei den CLTs (cholera like toxins) katalysiert die A-Untereinheit die NAD-abhängige ADP-Ribosylierung von verschiedenen Zielproteinen. Die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des trimeren GTP Bindungsproteins G_s aktiviert die Adenylcyclase, wodurch ein Anstieg der cAMP Konzentration ausgelöst wird, was enterotoxisch zur Diarrhöe führt. Zudem sind anti-Gangliosid Antikörper in einer Vielzahl von Autoimmun-Krankheiten gefunden worden, wie z.B. dem Guillain-Barré Syndrom oder dem Miller-Fisher Syndrom (Fredman, 1998, Steck, 2000, Yuki, 2001).

Das Schlüsselenzym zur Entstehung der Globoside ist die UDP Galaktose:Laktosylceramid-4- α -galaktosyltransferase, die die Synthese von Ceramidtrihexosid (Gb₃Cer) katalysiert. Globoside spielen als Antigene im P-Blutgruppensystem eine Rolle (Hellberg et al., 2002).

1.3 Katabolismus der Sphingolipide

Der Abbau der Sphingolipide in den Lysosomen beginnt mit der Hydrolisierung zu Sphingosin bzw. Dihydrosphingosin (Abbildung 1). Das Ceramid kann durch Ceramidasen zu Sphingosin deacyliert werden. Man unterscheidet verschiedene Formen der Ceramidasen, die bei verschiedenen pH-Werten aktiv sind (neutral, basisch oder sauer). Die neutrale Ceramidase ist an der Plasmamembran lokalisiert (Hwang et al., 2005, Tani et al., 2003), die saure Ceramidase befindet sich in den Lysosomen (Bernardo et al., 1995), und die alkalische Ceramidase liegt im ER/Golgi-Komplex vor (Mao et al., 2003, Xu et al., 2006).

Sphingosin wird durch eine ATP-abhängige Kinase an der primären Hydroxylgruppe zu Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) phosphoryliert (Kohama et al., 1998). S-1-P dient intrazellulär als second messenger und extrazellulär als Ligand für bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Olivera and Spiegel, 1993).

Die S-1-P Lyase spaltet das S-1-P zwischen C2, das die Aminogruppe, und C3, das die sekundäre Hydroxylgruppe trägt. Sie gehört zur Klasse der Pyridoxal-5-Phosphat abhängigen C-C Lyasen.

Als Produkte entstehen ein aliphatisches Aldehyd (Palmitaldehyd) und Phosphoethanolamin (Stoffel & Assmann, 1970). Diese werden weiter zum Aufbau von Phospholipiden und Plasmalogenen verwendet (Horibata & Hirabayashi, 2007).

Im Katabolismus der Sphingolipide führen Defekte der Enzyme zu schweren Krankheitsbildern, den Sphingolipidosen, mit sehr unterschiedlichen klinischen Bildern. Dazu gehören Demenz, Psychosen, Organversagen, Skelettschäden oder geistige Retardierung. Das jeweilige Substrat der betroffenen Enzyme sammelt sich an (siehe Tabelle 1). So ist bei der Tay-Sachs-Krankheit die Hexosaminidase A betroffen, die die Hydrolyse des N-Acetylgalactosamin des Gangliosids G_{M2} katalysiert, was folglich zu einer Ansammlung von G_{M2} in den Nervenzellen führt. Die von dieser Krankheit betroffenen Säuglinge entwickeln sich zunächst normal, ab dem 1. Lebensjahr werden die Nervenfunktionen beeinträchtigt, sie werden behindert, blind und sterben meist im 3. Lebensjahr.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Speicherkrankheiten

Angegeben sind das nicht funktionelle Enzym, das deswegen akkumulierende Substrat und der Name der resultierenden Krankheit.

Krankheit	defektes Enzym	akkumulierendes Substrat
Niemann-Pick	Sphingomyelinase	Sphingomyelin
Gaucher	β -Glucocerebrosidase	Glucocerebrosid
Tay-Sachs	Hexosaminidase A	Gangliosid G_{M2}
Fabry	α -Galactosidase A	Ceramid-Trihexosid
Krabbe	Galactocerebrosidase	Galactocerebrosid
Sandhoff	Hexosaminidase A+B	Gangliosid G_{M2} und Globosid

Andere Speicherkrankheiten, die auf einen Defekt der Enzyme im Katabolismus zurückzuführen sind, sind z.B. die Sandhoff-Krankheit, bei der ebenfalls ein Defekt der Hexosaminidase A und darüber hinaus auch der Hexosaminidase B vorliegt, was zu einer Akkumulation von G_{M2} und Globosid führt.

Bei der Gaucher-Krankheit ist die β -Glucocerebrosidase betroffen, bei der Niemann-Pick-Krankheit ist die Sphingomyelinase inaktiv. Die Fabry-Krankheit geht auf einen Ausfall der α -Galactosidase A zurück. Bei der Krabbe-Krankheit stellt die Galactocerebrosidase das defekte Enzym dar.

1.4 Apoptose

Bei der Apoptose handelt es sich um den programmierten Zelltod. Dieser ist Teil des Stoffwechsels der Zelle und unterscheidet sich damit von der Nekrose, die die andere Variante des Zelltodes darstellt. Die Nekrose wird durch externe Signale wie physikalische oder chemische Noxen ausgelöst. Bei der Apoptose handelt es sich dagegen um einen physiologischen Prozeß, durch den Zellen zerstört werden, ohne daß Nachbarzellen davon in Mitleidenschaft gezogen werden. Die Regulation der Apoptose ist unerlässlich für die Gewebshomöostase. Beispielsweise ist die komplexe Ausbildung des Nervensystems erst durch Apoptose möglich (Hurle, 1988). Mutationen innerhalb der Apoptosemaschinerie haben fatale Folgen für den Organismus. So beruht die Entstehung von Krebs und einiger Autoimmunerkrankungen auf dem Verlust der Fähigkeit zur Selbsttötung der Zelle (Sartorius et al., 2001, Williams, 1991).

Apoptotische Zellen weisen charakteristische morphologische und biochemische Merkmale auf. Zunächst erfolgt ein Schrumpfen der Zelle, es folgt die Chromatinkondensation. Das Cytoplasma und der Nukleus werden in membrangebundene Vesikel fragmentiert (apoptotic bodies). Diese werden schnell erkannt und mit Hilfe von Makrophagen oder benachbarten epithelialen Zellen phagozytiert (Kerr et al., 1972).

Die Initiationsphase der Apoptose wird durch die Aktivierung bestimmter Rezeptoren ausgelöst. Hierbei handelt es sich um Plasma-Membranproteine, die alle zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptor-Superfamilie gehören. Nach Bindung des Liganden folgt die Trimerisierung des Rezeptors. Daraufhin gibt es zwei mögliche Reaktionswege:

Es besteht die Möglichkeit der direkten Aktivierung der Caspasen. Dabei wird die Initiatorcaspase 8 aktiviert, die wiederum zur Aktivierung der Executionscaspase 3 führt. Es folgt der Zelltod.

Die Aktivierung der Apoptose kann gleichfalls über das Mitochondrium ablaufen. Dabei wird ebenfalls die Caspase-8 aktiviert. Es kommt zur Spaltung des Bcl-2-Protein Bid zu tBid (Luo et al., 1998), welches zwei andere Bcl-2-Proteine, Bax und Bak, aktiviert (Wei et al., 2001).

Bax bildet an der mitochondrialen Außenmembran supramolekulare Membranöffnungen. Cytochrom c tritt in das Zytosol ein und bildet mit ATP, Apaf1 und Procaspase 9 einen Komplex, der zur Aktivierung der Caspase-3 führt (Daniel et al., 2001). Das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Bcl2-Protein-Signalen entscheidet letztlich, ob es zur Apoptose kommt oder nicht (Raisova et al., 2001).

Durch Hemmung der Caspase-Aktivität ist es möglich, die Apoptose zu unterbinden oder aber zumindest zu verlangsamen. Dieses kann zum einen durch Mutationen, zum anderen durch pharmakologische Hemmstoffe geschehen (Earnshaw et al., 1999).

Neben den Proteinen der Bcl-2 Familie werden zunehmend auch andere Moleküle postuliert, die an der Auslösung der Apoptose beteiligt sein sollen. Ceramide spielen eine wichtige Rolle in der Apoptose. Einige extrazelluläre Signale, wie die Stimulationen durch TNF- α , Fas Ligand, Interleukin, Hitzeschock oder oxidativen Streß (Gulbins et al., 1993, Mathias et al., 1998) sollen zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von Ceramid führen und dadurch die Apoptose induzieren.

Die intrazelluläre Konzentration des Ceramids kann auf verschiedene Weise erhöht werden. Zum einen durch die *de novo* Synthese (Bose et al., 1995, Gulbins et al., 1993) oder aber durch die Hydrolyse des Sphingomyelins durch die sauren oder die neutralen Sphingomyelinasen (Newrzella & Stoffel, 1996, Quintern et al., 1989, Quintern et al., 1987, Rao & Spence, 1976).

Das folgende Modell beschreibt den postulierten Wirkmechanismus der Sphingolipide in der Apoptose (Malagarie-Cazenave et al., 2002): Die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFR1 resultiert in einer Trimerisierung des Rezeptors. Im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors befindet sich die neutrale Sphingomyelinase Domäne (NSD), an die das FAN-Protein (factor associated with activation of neutral Smase) bindet. Dieser Komplex aktiviert die neutrale Sphingomyelinase. Am cytoplasmatischen Teil des Rezeptors befindet sich die Death Domäne (DD), an welche FADD (Fas associated protein with death domain) und TRADD (TNFR associated protein with death domain) binden. Dieser Komplex aktiviert die saure Sphingomyelinase. Auf diese Weise kommt es zur Anhäufung des Ceramids durch beide Formen der Sphingomyelinasen. Die Ceramide, die durch die Sphingomyelinasen gebildet werden, wirken auf die Caspasen ein, und induzieren dadurch die Apoptose.

Ceramid induzierte Apoptose kann auch durch Behandlung der Zellen mit Ceramid ausgelöst werden (Obeid et al., 1993). Zellen, denen das Bax-Gen fehlt, sind resistent gegenüber der Behandlung mit Ceramid (Kim et al., 2001, von Haefen et al., 2002).

Zudem können Ceramide auch die Protease Cathepsin D aktivieren, was ebenfalls zu einer Apoptose führt. Dieser mögliche Mechanismus wird auch durch den Befund gestützt, daß in Zellen, die resistent gegen die cytotoxischen Effekte von TNF- α sind, die Ceramidsynthese blockiert ist und vererbte Defizienz oder Inhibition der Sphingomyelinasen vor Apoptose schützen (Cai et al., 1997, Nava et al., 2000, Wright et al., 1996).

Auf der anderen Seite kann an die DD auch einen Komplex aus TRADD mit TRAF2 (TNRF associated factor 2) binden. Dieser interagiert mit der Sphingosinkinase und aktiviert diese, was zur Bildung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) führt. Dadurch entsteht ein antiapoptotischer Effekt, da S1P 1. zur Aktivierung antiapoptotischer Signalwege (NF- κ B, ERK-Kinase) führt, 2. die Proteinexpression des proapoptotischen Bcl-2 reduziert und 3. zur Prävention der streßinduzierten Prozessen in Mitochondrien beiträgt (wie z.B. Blockade der Freisetzung von Cytochrom c) (Skulachev, 2000).

1.5 Serin Palmitoyl-CoA-Transferase

Der erste Schritt in der Sphingolipidbiosynthese, die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA, wird von der Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (SPT) [EC 2.3.1.50] katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion ist das 3-Oxo-dihydrosphingosin. Es wurde ein vom Schiff'schen Basen Komplex abhängiger Mechanismus postuliert (Weiss, 1963) (Abb.:3). In weiteren Experimenten wurde durch Inkubation einer Fraktion der Hefe *Hansenula cifferri* mit Serin und Palmitoyl-CoA in Abwesenheit von NADPH die Bildung von 3-Oxodihydrosphingosin nachgewiesen. In Anwesenheit von NADPH wird dieses zu Dihydrosphingosin reduziert (Braun & Snell, 1968, Stoffel et al., 1968, Stoffel et al., 1968, Stoffel et al., 1968).

Bei SPT handelt es sich um ein Mitglied der Unterfamilie der Pyridoxal-5-Phosphat (PLP)-abhängigen Enzyme. SPT benötigt PLP als Cofaktor (Braun et al., 1970, Braun & Snell, 1967). Die Familie zu der SPT gehört, ist die PLP-abhängige α -Oxaminsynthase (POAS) Familie. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Familie, die lösliche Homodimer-Enzyme sind, ist SPT ein membrangebundenes Homodimer-Enzym. Das Bakterium *Sphingomonas paucimobilis* hingegen produziert SPT als lösliches Homodimer-Enzym (Ikushiro et al., 2001).

Der von SPT katalysierte Reaktionsmechanismus besteht aus den folgenden Schritten (Abb.:3): Zunächst erfolgt die Formation der Schiff'schen Base zwischen dem Substrat L-Serin und PLP im Enzym. Darauf folgt die Entfernung des α -Hydrogen Atom des Serins. Es schließt sich ein nukleophiler Angriff des Palmitoyl-CoA durch das α -Carbanion an, um ein transitionales acyliertes Intermediat zu formen. Es folgt eine Decarboxylierung und eine anschließende Reprotonierung des α -Carbanions. Damit ist die Bildung des 3-Oxodihydrosphingosins abgeschlossen. Ein Molekül SPT katalysiert ca. 80 Zyklen dieser Reaktionen pro Minute. Dabei ist SPT substratspezifisch, d.h., nur L-Serin wird als Substrat verwendet (Hanada et al., 2000). Zu den Inhibitoren von SPT zählen die Sphingofungine, das Lipoxamycin und das Myriocin, deren IC_{50} Werte im nanomolaren Bereich liegen (Mandala et al., 1994, Miyake et al., 1995, Zweerink et al., 1992). Desweiteren sind L-Cycloserin und β -Chlor-L-alanin zu nennen, die Inhibitoren aller PLP-abhängigen Enzyme sind (Medlock & Merrill, 1988, Sundaram & Lev, 1984).

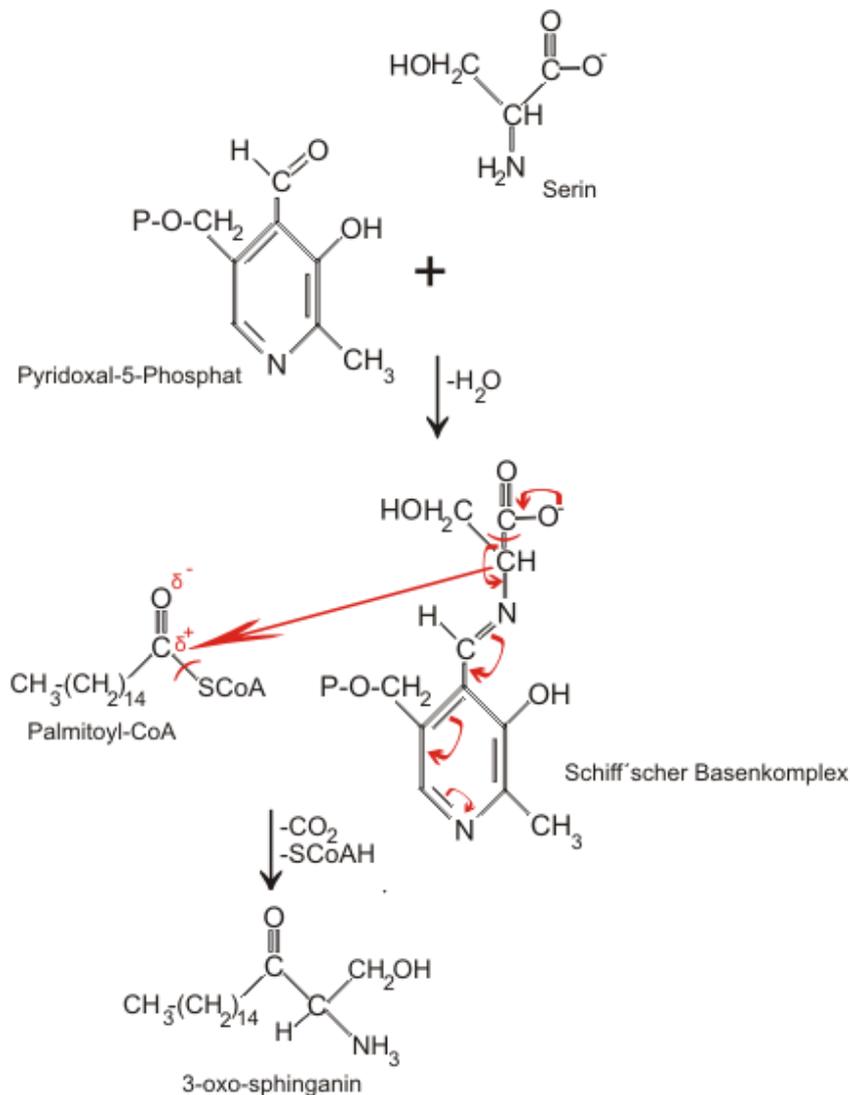


Abbildung 3: Reaktionsmechanismus der von der Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (SPT) katalysierten Reaktion.

LCB1 (SPTLC1) (Buede et al., 1991) und später LCB2 (SPTLCB2) (Nagiec et al., 1994) wurden in *Saccharomyces cerevisiae* als die Gene entdeckt, die für SPT kodieren. Es wurden die Homologe der Säugetier cDNA aus Mensch, Maus und CHO-Zellen isoliert.

Die Säugetier LCB1 und LCB2 kodieren für ein 53 kDa bzw. 63 kDa großes Protein (Weiss & Stoffel, 1997). Beide besitzen eine stark hydrophobe Transmembrandomäne. LCB1 scheint im ER mit N- und C-Terminus zum Lumen und dem Cytosol ausgerichtet zu sein (Yasuda et al., 2003).

SPT wurde nativ aus CHO-Zellen isoliert und liegt im Verhältnis LCB1 zu LCB2 1:1 vor (Hanada et al., 2000). SPT scheint also ein Heterodimer aus LCB1 und LCB2 zu sein. SPT besitzt nur ein PLP-Bindungsmotiv, welches auf der SPTLC2 Untereinheit lokalisiert ist.

Bei einer Abnormalität von SPT kommt es zu einer genetischen Erkrankung. Es entwickelt sich die hereditäre motorisch sensible Neuropathie vom Typ I (HSN1). Dabei handelt es sich um eine neurologische Erkrankung mit partiellen Lähmungen der Muskulatur. Diese beginnen im Typ I (auch Charcot-Marie-Tooth Krankheit genannt) an der Fuß-, und Unterschenkelmuskulatur, später können auch Lähmungen der oberen Extremitäten auftreten (Dawkins et al., 2001). Ein genetischer Defekt in Familien mit HSN1 ist verbunden mit dem Chromosom 9q22 Locus, assoziiert mit einer Missens-Mutation im menschlichen LCB1 Gen. Dort wird Cys¹³³ oder Val¹⁴⁴ in der LCB1-Untereinheit geändert (Bejaoui et al., 2001, Dawkins et al., 2001). In HSN1 Lymphoblasten ist die SPT Aktivität und die Rate der *de novo* Synthese von Sphingolipiden reduziert, wobei das Gleichgewicht zwischen LCB1 und LCB2 Untereinheiten normal bleibt (Bejaoui et al., 2002). Die mutierten LCB1 Proteine konnten trotzdem einen Komplex mit den LCB2-Untereinheiten formen, es resultiert inaktives SPT. Cys¹³³ und Val¹⁴⁴ gehören zu der Umgebung einer stark konservierten Aminosäuresequenz, die sich in der Sequenz zwischen Hefe und Säugetieren kaum unterscheidet. Die beiden Reste befinden sich nahe der PLP-Bindungsstelle von LCB2 (Gable et al., 2002). Es ist also möglich, daß keine funktionelle katalytische „site“ gebildet werden kann, da die Aminosäuren, die in der Umgebung um Cys¹³³ und Val¹⁴⁴ liegen, in diese miteingebunden sind.

Vor kurzem wurde eine weitere Untereinheit entdeckt, die zum SPT-Komplex zu gehören scheint. Mit Hilfe eines Screens der genomischen Datenbank suchte die Gruppe um Hornemann (Hornemann et al., 2006) nach Sequenzen, die homolog zu SPTLC1 und SPTLC2 sind. Eine Sequenz wies dabei 68% Identität zur menschlichen LCB2-, und 21% Identität zur menschlichen LCB1-Untereinheit auf. Ein folgender Datenbankskan zur Aufklärung von konservierten strukturellen Elementen (NCBI) zeigte eine Beziehung zur Familie der Aminotransferasen Typ II und zudem eine konservierte PLP-Bindungsdomäne an Position 371. Das neue Protein erhielt den Namen SPTLC3.

HEK293-Zellen exprimieren keine detektierbare Menge an SPTLC3 (Hornemann et al., 2006). Eine Überexpression von SPTLC3 in HEK293 resultiert im anschließenden Enzym-Assay in einer 2-3fach stärkeren SPT Aktivität verglichen mit der in den WT-Zellen vorliegenden Aktivität. Durch Verwendung von SPTLC3 spezifischer siRNA wurde die SPTLC3 mRNA Expression, verglichen mit der mock transfizierten Kontrolle, um 60-70% reduziert. Diese Verringerung der SPTLC3 Expression führte zu einer Verringerung der SPT-Aktivität (Hornemann et al., 2006).

In einer darauffolgenden Veröffentlichung beschreibt die Gruppe mit Hilfe von Pulldown-Assays, daß wahrscheinlich alle drei Untereinheiten im gleichen Komplex lokalisiert sind und dieser eine Größe von 480kDa besitzt (Hornemann et al., 2007).

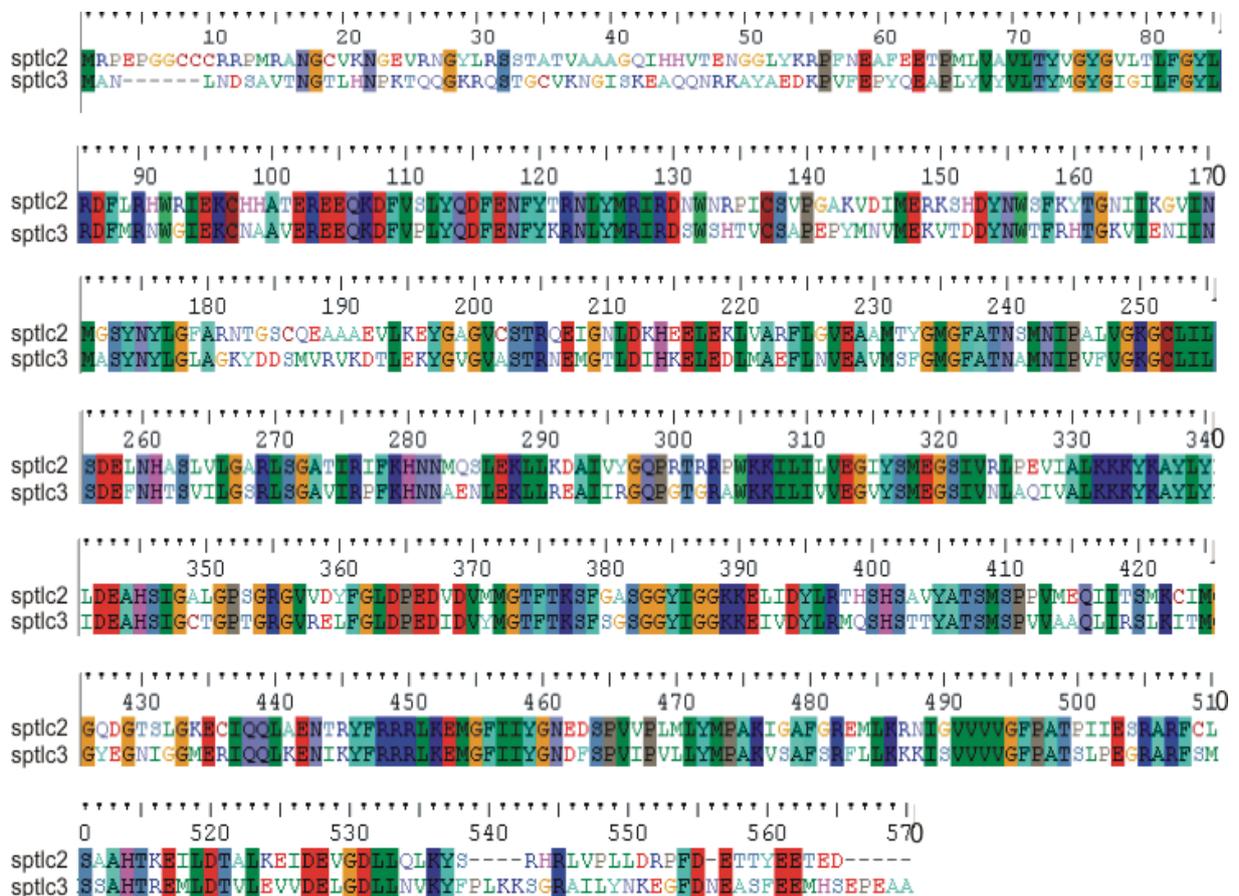


Abbildung 4: Homologievergleich der Untereinheiten sptlc2 und sptlc3 aus der Maus

Vergleich der aus ensembl.org entnommenen Sequenzen der sptlc2 und sptlc3 der Maus. Übereinstimmende Aminosäuren sind farblich hinterlegt. Die Abbildung zeigt eine Homologie von 57,5 % auf.

1.6 Sphingosin-Kinase

Die Sphingosin-Kinase [EC 2.7.1.91] katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf (Dihydro)sphingosin, wodurch (Dihydro-)Sphingosin-1-Phosphat gebildet wird (Kohama et al., 1998) (Abb.:5). Diese Reaktion stellt den ersten Schritt im Katabolismus der Sphingolipide dar.

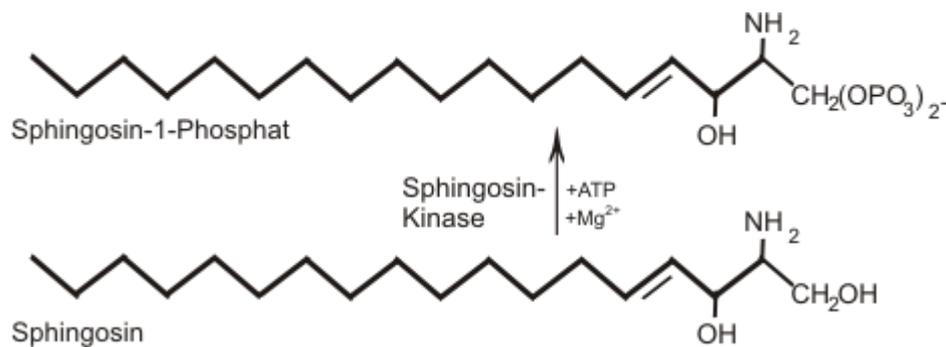


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der von der Sphingosinkinase katalysierten Reaktion

Die Substratspezifität der Sphingosin-Kinase ist auf die erythro Isoformen von Sphingosin und Dihydrosphingosin beschränkt. Die natürlich vorkommenden D-Enantiomere werden dabei effektiver phosphoryliert (höhere V_{max}) als die L-Isomere, wobei die K_m-Werte beider Substrate vergleichbar sind (Buehrer & Bell, 1992, Stoffel et al., 1973).

Das pH-Optimum der Sphingosin-Kinase Aktivität liegt im neutralen Bereich, und die threo Enantiomere von Sphingosin und Dihydrosphingosin stellen kompetitive Inhibitoren der Kinase Aktivität dar (Stoffel et al., 1973).

Im Menschen sind zwei verschiedene Isoformen der Sphingosin-Kinase (SK) identifiziert worden, SK1 und SK2 (Kohama et al., 1998). Beide generieren Sphingosin-1-Phosphat aus Sphingosin, wobei die SK2 eine etwa 10-fach geringere spezifische Aktivität aufweist (Liu et al., 2000). Obwohl zwischen beiden Formen eine sequentielle und katalytische Ähnlichkeit besteht, scheinen sie gegensätzliche Rollen in der Zelle auszuüben. Der SK1 wurde schon früh eine überlebens- und proliferationsfördernde Wirkung nachgewiesen. Die SK2 übernimmt möglicherweise eine gegensätzliche Rolle und verstärkt die Apoptose (Maceyka et al., 2005, Maceyka et al., 2005).

Der Aktivierungsmechanismus der menschlichen SK1 besteht in einer Phosphorylierung an Ser²²⁵ (Pitson et al., 2005). Diese Phosphorylierung wird durch ERK 1/2 vermittelt, was in einem 14 fachen Anstieg des k_{cat} des Enzyms resultiert.

Die SK1 Lokalisation ist cytosolisch. Nach einer agonistisch induzierten Aktivierung wird diese jedoch zur Plasmamembran transloziert. Diese phosphorylierungsabhängige Lokalisation der SK1 an die Plasmamembran geht einher mit deren überlebens- und proliferationsfördernden Wirkungen, da diese bei nicht phosphorylierter SK1 nicht besteht (Pitson et al., 2005).

Bei der SK2 ist die Lokalisation verschieden und abhängig vom Zelltyp und der Zelldichte. So wird in den verschiedenen Studien von Lokalisationen im Cytosol, dem Nucleus oder der Plasmamembran gesprochen. Die Level der SK2 werden durch serum starvation am Endoplasmatischen Retikulum erhöht (Maceyka et al., 2005). Serum starvation (Entzug von Wachstumsfaktoren oder Nährstoffen) stellt eine Variante dar, um die Apoptose zu induzieren.

Es existieren verschiedene upstream Aktivatoren der Sphingosin-Kinase. Dazu zählen G-Protein gekoppelte Rezeptoren, kleine GTPasen, Tyrosinkinase-Rezeptoren, Immunoglobulin-Rezeptoren und Calcium (Maceyka et al., 2002).

Die SK1 Knock-Out Maus ist lebensfähig, fertil und zeigt keinerlei sichtbare Dysfunktionen (Allende et al., 2004). Die Kinase in den verschiedenen Geweben der Maus ist signifikant, jedoch nicht komplett heruntergesetzt. Die Sphingosin-1-Phosphat Level sind im Serum stark reduziert, bemerkenswerterweise aber nicht in den Geweben, was bedeutet, daß wohl noch andere Mechanismen der Sphingosin-1-Phosphat Synthese bestehen.

1.7 Sphingosin-1-Phosphat Lyase

Die Sphingosin-1-Phosphat Lyase (SPL) [EC 4.1.2.27] katalysiert die irreversible Spaltung von Sphingosin-1-Phosphat an der C₂₋₃ Bindung. Dadurch wird Hexadecanal und ein Phosphoethanolamin generiert (Stoffel & Assmann, 1970) (Abb.:6). Dabei benötigt die Lyase Pyridoxal-5-Phosphat als Coenzym (Van Veldhoven et al., 2000). Die gebildeten Produkte können als Vorläufer für den Phospholipid-Metabolismus dienen (Horibata & Hirabayashi, 2007).

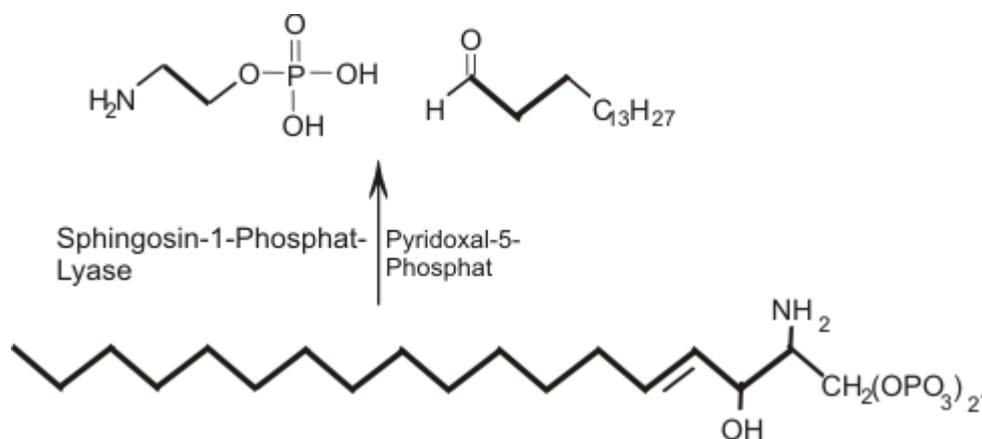


Abbildung 6: Reaktionsmechanismus der von der Sphingosinkinase katalysierten Reaktion

Abbau der durch die Sphingosin-1-Phosphat Lyase katalysierten Reaktion von Sphingosin-1-Phosphat zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin; Pyridoxal-5-Phosphat dient als Cofaktor

Die Funktion der Lyase trägt zur normalen Entwicklung, der Reproduktion, dem Überleben der Zellen, der Streßantwort, der Aufrechterhaltung der Unversehrtheit von Geweben und der Immunität bei (Oskouian & Saba, 2004).

Ein kompetitiver Inhibitor der Lyase ist das Deoxypyridoxin-Phosphat. Inhibitorische Wirkung besitzen zudem Semicarbazid und Cyanid (Van Veldhoven, 2000).

Das erste identifizierte SPL Gen war das *Saccharomyces cerevisiae* Dihydrosphingosin-Phosphat-Lyase (dpl 1) Gen, was 1997 kloniert wurde (Saba et al., 1997). Schnell wurden die Homologen anderer Organismen identifiziert und durch biochemische Assays bestätigt (Van Veldhoven et al., 2000, Zhou & Saba, 1998). SPL wird stark im Dünndarm, dem Thymus und der Leber exprimiert. Eine schwache Expression findet sich im Herz und Gehirn, mit Ausnahme der olfaktorischen Schleimhaut (Genter et al., 2003, Kohno et al., 2006, Van Veldhoven, 2000), wo das Enzym stark angereichert ist.

Die Lyase-Aktivität wurde erstmals im Jahr 1969 beschrieben (Stoffel et al., 1969). Es wurde deutlich, daß die höchste Aktivität des Enzyms in der mikrosomalen Fraktion zu finden ist, wobei sie in der inneren mitochondrialen Membran geringer ist. In späteren Studien wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Zellfraktionierung das endoplasmatische Retikulum als der Ort der Lokalisation der Lyase bestätigt (Reiss et al., 2004, Van Veldhoven & Mannaerts, 1991).

Während der murinen Entwicklung ist die SPL mRNA Expression zeitlich reguliert und in der frühen endodermalen Differenzierung involviert (Ikeda et al., 2004, Kihara et al., 2003).

1.8 Gene-Targeting

Durch die Erstellung transgener Tiermodelle ist es möglich, die Funktion verschiedener Gene bzw. ihre Regulationen zu verstehen.

Die Grundlage für das gene-targeting bilden ES-Zellen, in deren Genom bestimmte Abschnitte des Zielgens durch mutierte, homologe DNA-Fragmente ausgetauscht werden (Thomas & Capecchi, 1986). Ein sogenannter replacement Vektor beinhaltet neben der klonierten Sequenz noch einen oder mehrere Selektionsmarker. ES-Zellen, die mit diesem Vektor per Elektroporation transfiziert wurden, werden der entsprechenden Selektion unterzogen. Um die Pluripotenz der ES-Zellen zu erhalten wird dem Kulturmedium das Cytokin LIF zugefügt (Smith et al., 1988). Außerdem wird die Anzahl der zu durchlaufenden Passagen möglichst gering gehalten.

Aus den transfizierten Zellen werden Klone selektioniert und auf homologe Rekombination hin untersucht. Dafür wird die Southern Blot Hybridisierungstechnik oder aber die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Ist die DNA homolog eingebaut, wird der expandierte Klon in das Blastocoel isolierter Blastocysten injiziert (Bradley et al., 1984). Diese werden in den Uterus einer scheinchwangeren Maus transferiert. Ist der Einbau in das Genom erfolgreich, erhält man sogenannte chimäre Mäuse, da die ES-Zellen einen sogenannten agouti-Fellmarker besitzen, der je nach Grad der Chimärität stärker oder schwächer im Mausfell erscheint. Da die eingeführte Mutation jedoch nur weitervererbt wird, wenn auch Zellen der Keimbahn von den ES-Zellen abstammen, werden die chimären Tiere auf ihre Keimbahnchimärität hin untersucht. Dafür werden Rückkreuzungen mit Mäusen schwarzer Fellfarbe durchgeführt. Die Nachkommen dieser Verpaarung, die den agouti Marker für braune Fellfarbe im Fell aufweisen, haben das Transgen mit in ihre Keimbahn integriert. Durch weiterführende Kreuzungen werden dann Tiere generiert, die im Bezug auf die Mutation homozygot sind.

Mit Hilfe der homologen Rekombination kann also eine gerichtete Manipulation eines Gens herbeigeführt werden. Man kann das Gen beispielsweise durch Punktmutationen mutieren oder aber auch komplett inaktivieren (Knock-out).

1.8.1 Konditionierte Genausschaltung

Die Generierung eines sogenannten konventionellen Knock-out Modells kann embryonal letal für die Maus wirken. Dies ist dann der Fall, wenn das ausgeschaltete Gen essentiell für die Maus ist. Um dieses Problem zu umgehen wurde ein System entwickelt, durch das die Genmanipulation entwicklungs-, und gewebsspezifisch möglich ist.

Es wird meist das Cre/loxP-System des Bakteriophagen P1 verwendet (Sternberg, 1981, Sternberg & Hamilton, 1981, Sternberg et al., 1981, Sternberg et al., 1981). Dabei steht Cre für *causes recombination* und loxP für *locus of x-over in P1*, wobei die Cre-Rekombinase die loxP-Sequenzen erkennt. Desweiteren gibt es das sogenannte flp/frt-System aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hier erkennt die Flp (Flipase)-Rekombinase die frt (FLP recombinase recognition target) Sequenzen (Dymecki, 1996).

In beiden Systemen bestehen die Erkennungssequenzen aus einer Kernsequenz und zwei, sie in entgegengesetzter Richtung umgebenden, inverted repeats. Das jeweilige Enzym schneidet in der Kernsequenz.

Im Vektor ist der zu deletierende Genbereich von den Erkennungsregionen flankiert. Das Entfernen des gewünschten Fragments kann auf Zellebene durch eine transiente Cre-, bzw. Flp-Expression geschehen. Die andere Möglichkeit ist die Entfernung des Fragments auf Mausebene durch Kreuzung mit einer transgenen Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren Systems exprimiert. Mit Hilfe einer solchen Mauslinie ist es möglich, die Auswirkung einer Genablation zu einem beliebigen Zeitpunkt bzw. an einem beliebigen Zelltyp durch Kreuzung mit den die loxP-Sequenzen beinhaltenden Mäusen zu studieren.

1.8.2 Cre-exprimierende, transgene Mausmodelle

Das Entfernen des geflochtenen Bereiches auf Mausebene ist durch den Einsatz transgener Mausmodelle möglich. Gossen konnte zeigen, daß das tet-Resistenzoperon des *E.coli* Tn 10-Genlokus genutzt werden kann, um transgene Expressionen konditional zu regulieren (Gossen & Bujard, 1992). Der tTA-Transaktivator entstand aus der Fusion des Tet-Repressors (TetR) mit der VP16 Aktivationsdomäne des *Herpes simplex* Virus. Die Regulation des Transaktivators wurde durch Tetrazyklin (Doxicyclin) ausgelöst. Ist dieses nicht vorhanden, so kann der Transaktivator an seine Konsensussequenz (tetracycline responsive element,

TRE) binden, wodurch die Transkription des Transgens initiiert wird (Tet-off-System). TRE wiederum ist an einen MinimalPromoter gekoppelt, der in Abwesenheit von tTA inaktiv ist. Nach Entwicklung des reversen Transaktivators (rtTa) wurde das System insofern verändert, daß die Bindung an TRE und damit die Aktivierung des MinimalPromoters durch Zugabe von Doxycyclin ausgelöst wird.

In den transgenen Mäusen wird nun die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promoters exprimiert. Erstellt werden diese Mäuse durch Injektion eines vorher klonierten Konstruktes in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle. Der Einbau erfolgt heterolog in das Genom der Maus.

Die so hergestellten Cre-exprimierenden, transgenen Mäuse werden anschließend mit den Tieren verpaart, die homozygot für das durch die loxP-Sequenzen flankierte Gen sind. Dadurch erhält man doppeltransgene Nachkommen.

In den durch den Promoter der Cre-exprimierenden, transgenen Mäuse festgelegten Zellen, erfolgt nun die gewebsspezifische Expression der Cre-Rekombinase. Dadurch wird auch nur in diesen Zellen der durch die loxP Sequenzen gefloxt Bereich deletiert. Ist das Konstrukt induzierbar, so kann man die Deletion nicht nur gewebsspezifisch, sondern auch noch zeitspezifisch vornehmen. Üblich sind sowohl mit Doxycyclin, als auch mit Tamoxifen induzierbare Systeme.

2. Aufgabenstellung

Die Sphingolipide stellen eine der größten Klasse von Membranlipiden dar. Sie besitzen neben ihrer großen Bedeutung als Komponenten von Membranen wichtige Aufgaben bei zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose, sowie als Rezeptoren für Toxine. Das erste Enzym der *de novo* Synthese ist die Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (spt). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die spt *in vitro* biochemisch und zellbiologisch charakterisiert werden. Desweiteren sollte vergleichend dazu der Katabolismus der Sphingolipide mit Hilfe von eukaryontische Zellsystemen betrachtet werden, die die Sphingosinkinase und die Sphingosin-1-Phosphat Lyase stabil exprimieren.

Zudem sollte die spt Funktion *in vivo* durch Erstellung eines nullallelischen Mausmodells aufgeklärt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer stabilen spt-Expression in HEK293 Zellen

Eine Voraussetzung für Untersuchungen an der Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (spt) bildet die stabile Expression des Gens in Zellsystemen. Hierfür wurde ein Konstrukt kloniert, das das *enhanced-green-fluorescent-protein* (EGFP) beinhaltet. Dadurch war eine Detektion von spt durch Fluoreszenzmikroskopie möglich. Als eukaryontisches Zellsystem wurde eine adhärente human embryonic kidney (HEK)293-Zelllinie gewählt. Durch Transfektion von HEK293 Zellen mit dem entsprechenden spt beinhaltenden Vektor, wurde eine Zelllinie generiert, die die Transferase stabil expremiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sptlc2 Untereinheit kloniert, da diese im spt Komplex über die PLP-Bindungsstelle verfügt und daher die katalytische Untereinheit darstellt.

Der Vorteil von Zelllinien, die das Expressionskonstrukt stabil integriert haben, besteht darin, daß sie im Gegensatz zu transient transfizierten Zellen höhere Expressionsraten besitzen und jederzeit verfügbar sind.

3.1.1 Erstellung der Konstrukte

Als Expressionsvektor für die Transfektion der HEK293 Zellen wurde das Plasmid EGFP-N2 verwendet. Das im Vektor liegende egfp Gen ermöglicht unter UV-Licht die Sichtbarmachung des Proteins in den Zellen.

Für die Klonierung des cDNA-Konstrukts (Abb.:7) wurden die benötigten Primer so konstruiert, daß eine EcoRI-, und eine ApaI-Schnittstelle in die cDNA eingefügt wurden. Als Template für die Polymerasekettenreaktion wurde cDNA aus dem Gehirn der Maus verwendet. So konnte die spezifische cDNA von spt mit den benötigten Restriktionsstellen gewonnen werden. Das entstandene Fragment wurde in den PCR2.1 Vektor ligiert und kloniert.

Die spt cDNA wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und ApaI aus dem PCR2.1 Vektor geschnitten und in den EGFP-N2 Vektor ligiert (Abb.:7).

Die in diesen Vektor klonierte cDNA wurde unter der Kontrolle des starken und frühen CMV-Promoters (Cytomegalovirus) transkribiert. Durch eine abschließende Sequenzierung wurde die Fusion des Gens im Konstrukt bestätigt und eine Leserasterverschiebung ausgeschlossen (Abb.:7).

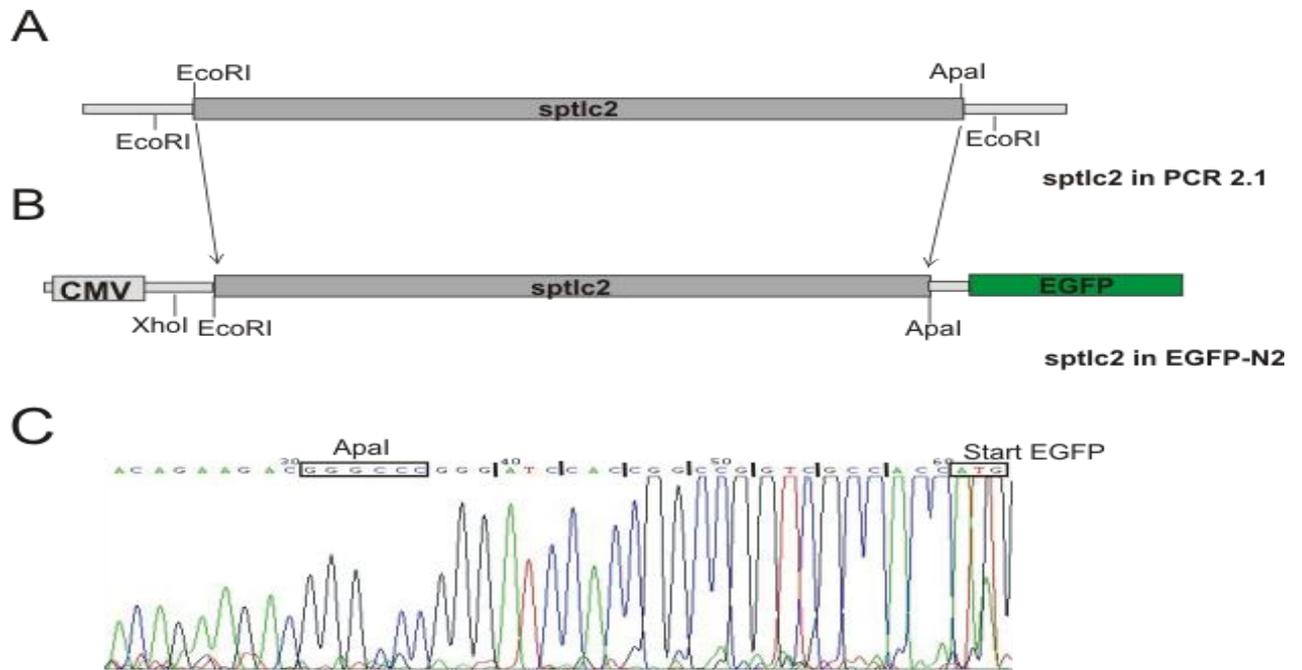


Abbildung 7: Konstrukterstellung EGFP-spt

(A) Klonierung der *spt* cDNA in den PCR 2.1 Vektor. (B) Klonierung des Fusionskonstruktes EGFP-spt unter Kontrolle des CMV-Promoters. Der Einbau der *spt* cDNA erfolgte nach *EcoRI* und *Apal* Restriktion der cDNA aus dem PCR 2.1 Vektor und Ligation in die entsprechenden Restriktionsstellen im EGFP-N2 Vektor. (C) Sequenzierung des EGFP-spt Konstruktes. Die in den Primer eingefügte *Apal* Restriktionsschnittstelle ist gekennzeichnet und die Leserastermarkierung führt zum Startcodon des EGFP-Gens.

3.1.2 Nachweis der *spt*-Expression in transfizierten HEK293 Zellen

Der für die Klonierung verwendete Vektor beinhaltet eine Expressionskassette für die Neomycin-Phosphotransferase (*neo*). Diese ermöglicht nach der Elektroporation der HEK293 Zellen mit dem linearisierten Vektor eine Selektion der Klone. Erreicht wurde die Selektion durch 14-tägige Zugabe von G418, einem Strukturanalogon des Neomycin, zum Kulturmedium.

Nach Vereinzelung und Expansion überlebender Klone nach der Selektion, wurden diese auf die Transkription des Gens hin überprüft. Dafür wurde mittels der TRIZOL-Methode gewonnene RNA der Zellklone in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde durch quantitative reverse Transkription (RT)-PCR auf die Expressionsrate von spt hin untersucht. Als innerer Standard wurde das ubiquitäre Transkript der Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT) verwendet. Anhand dieses Standards konnte ein Vergleich der Expression von spt in den transfizierten Zellen zur Expression in den Wildtyp-Zellen getroffen werden.

Die so analysierten Klone wiesen eine unterschiedlich starke Expression der spt auf. In den folgenden Experimenten wurde der spt-egfp Klon1 verwendet, da dieser die höchste Expressionsrate besaß (Abb.:8).

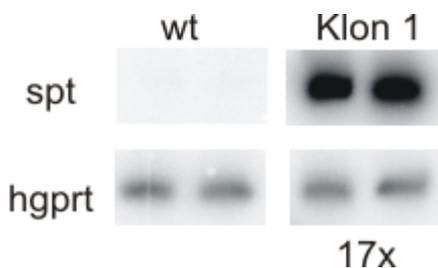


Abbildung 8: Quantitative RT-PCR vom EGFP spt Klon1

Der Wildtyp der HEK293 Zellen weist keine Transkription von spt auf. Der transfizierte Klon 1 zeigt eine 17-fache spt Transkription. Die Rate wurde in das Verhältnis des Zellstandards hgppt gesetzt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Expression von spt auf Translationsebene wurde durch Western Blotting getestet. Proteinextrakte aus den HEK293 WT-Zellen und den HEK293 spt Klon 1-Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die SPT immunhistochemisch detektiert. Als innerer Standard wurde α -Tubulin verwendet (Abb.:9). Bemerkenswert ist, daß im Gegensatz zur 17-fachen Überexpression auf Transkriptionsebene bei der Translation kaum ein Unterschied im Vergleich der Expression zwischen den Wildtyp-Zellen und den transfizierten Zellen zu erkennen ist.

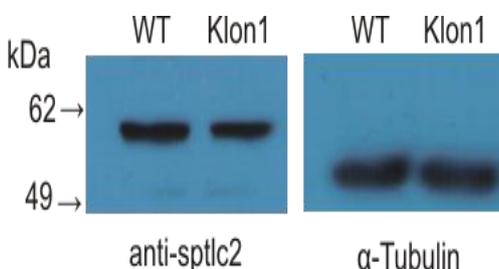


Abbildung 9: Western-Blot mit sptlc2-Antikörper

Als Nachweis der spt-Expression auf Translationsebene wurde ein Western Blot angefertigt. Dafür wurde ein anti-spt Antikörper (1:1000) und ein Peroxidase gekoppeltes anti Kaninchen IgG Antikörperkonjugat (Sigma 1:12000) verwendet. Als Kontrolle wurde ein anti α -Tubulin Antikörper (Sigma 1:5000) und ein Peroxidase gekoppeltes anti Maus IgG Antikörperkonjugat (Sigma 1:1000) verwendet.

3.1.3 Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von spt

Um die Expression der spt in den HEK293 Zellen weiter zu untersuchen, wurde der egfp-spt Klon 1 auf die Spezifität seiner Fluoreszenz hin überprüft. Dafür wurde ein anti-spt Antikörper und ein Cy-3 gekoppelter zweiter Antikörper verwendet. Die Überlagerung der EGFP und Cy-3 Fluoreszenzen waren überlappend und zeigten die ER-Lokalisation (Abb.:10+11).

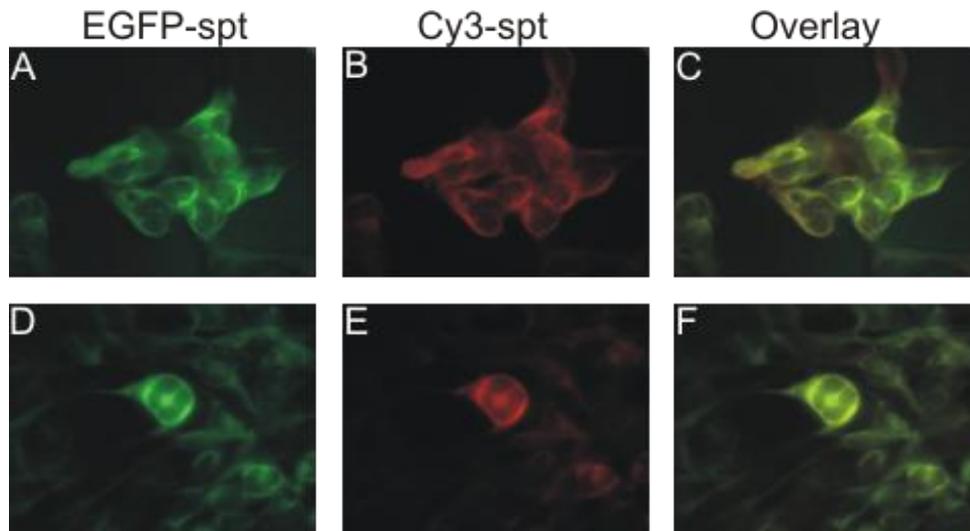


Abbildung 10: Immuncytochemischer Nachweis des EGFP-spt Fusionsproteins in HEK293 Zellen

Erster Antikörper anti-sptlc2, zweiter Antikörper Cy3 konjugiert (Jackson anti-Kaninchen-Cy3, 1:800). (A+D) EGFP-spt; (B+E) spt-Cy3; (C+F) Überlagerung der Fluoreszenzen.

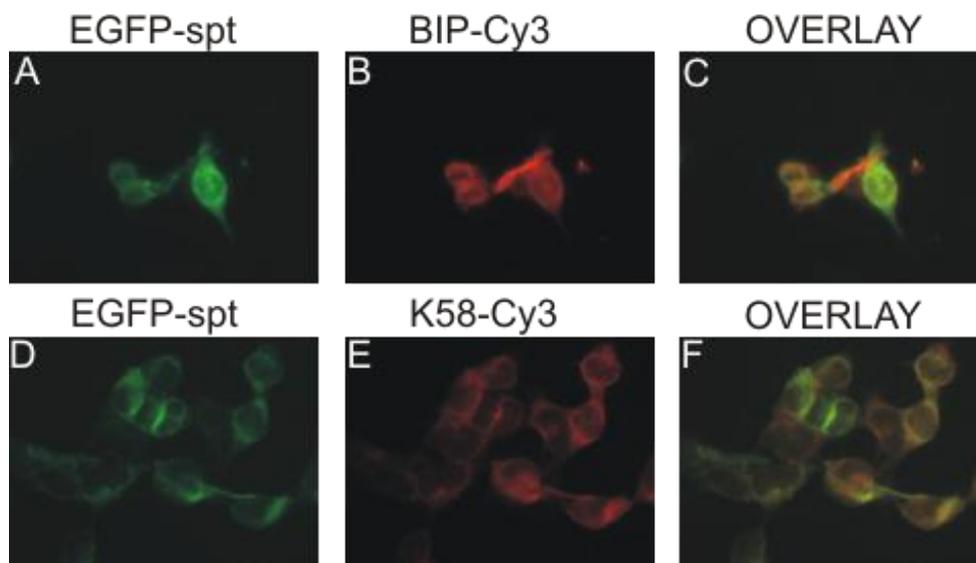


Abbildung 11: Lokalisation des EGFP-spt Fusionsprotein in HEK293 Zellen

Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen das endoplasmatische Retikulum (anti-BiP, biomol, 1:200) und den Golgi-Apparat (anti-58K, Sigma, 1:100), sowie mit Cy3 markierten Zweitantikörpern (Jackson anti-Kaninchen-Cy3, 1:800). (A+D) EGFP-spt; (B+E) BiP-Cy3 und k58-Cy3; (C+F) Überlagerung der Fluoreszenzen.

Die Lokalisationsstudien wurden mit bestimmten Markern für die subzelluläre Lokalisation durchgeführt.

Doppelfärbungen wurden gegen ein 78kDa glukosereguliertes Protein, das als "BiP" bezeichnet wird, mit Hilfe des Anti-Grp78 Antikörper, der als ER-Marker dient, und dem 58K-Protein Antikörper, der gegen das Golgi-ständige 58K-Protein gerichtet ist, durchgeführt. Es zeigte sich überwiegend eine Kolokalisation mit BiP (Abb.:11) und nur teilweise ist eine Kolokalisation mit dem 58 K Protein zu erkennen.

3.1.4 Gewebsspezifische Verteilung der spt Expression in der Maus

Die gewebsspezifische Verteilung der spt in der Maus wurde mittels reverser Transkription und PCR ermittelt. Untersucht wurden verschiedene Organe einer adulten CD1 WT-Maus. Als innerer Standard diente HGPRT. Die stärkste Expression der spt wurde in Lunge und Darm, die schwächste in Herz, Muskel und Gehirn gefunden (Abb.:12).

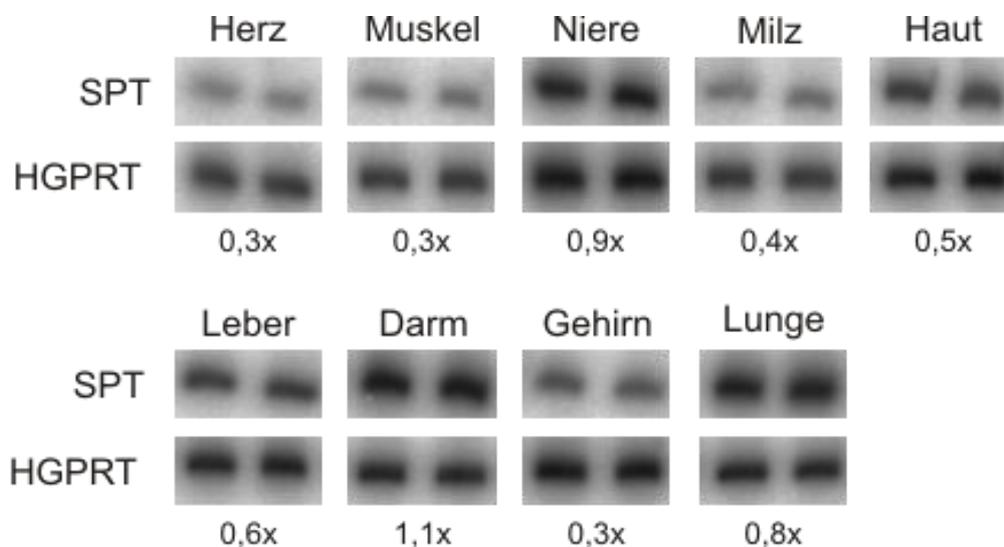


Abbildung 12: RT-PCR zur Ermittlung der spt-Expression in unterschiedlichen Geweben der WT-Maus

Quantitativer Vergleich der Expressionsstärke von spt in den unterschiedlichen Organen einer WT-Maus. Die Expressionsstärke wurde ins Verhältnis mit dem inneren Standard HGPRT gesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2 Biochemische Charakterisierung

3.2.1 [U-¹⁴C]-Serin-Assay

Die SPT-Aktivitätsmessung an den HEK293 Zellen wurde entsprechend den Angaben von Weiss (Weiss & Stoffel, 1997) durchgeführt. Dabei wurde die Inkorporation von [U-¹⁴C]-Serin in 3-Oxosphingalin bestimmt. Da dieses Produkt nicht stabil ist, wurde nach der Inkubation des Zellextraktes eine sofortige Reduktion des entstandenen 3-Oxosphingalin mit NaBH₄ zum Sphingalin durchgeführt. Das gebildete Sphingalin wurde dünnschichtchromatographisch quantifiziert (Abb.:13). Nicht umgesetztes Serin wurde durch Extraktion mit Chloroform/Methanol (2:1) vom wasserunlöslichen Sphingalin getrennt. Es zeigte sich eine etwa zwei-, dreifache Anreicherung an Sphingalin in den mit spt transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen. Wie bereits auf Translationsebene mit Hilfe des Western Blots festgestellt, ist auch hier der Expressionsunterschied der transfizierten Zellen im Vergleich zu den WT Zellen im Gegensatz zur Transkriptionsebene gering.

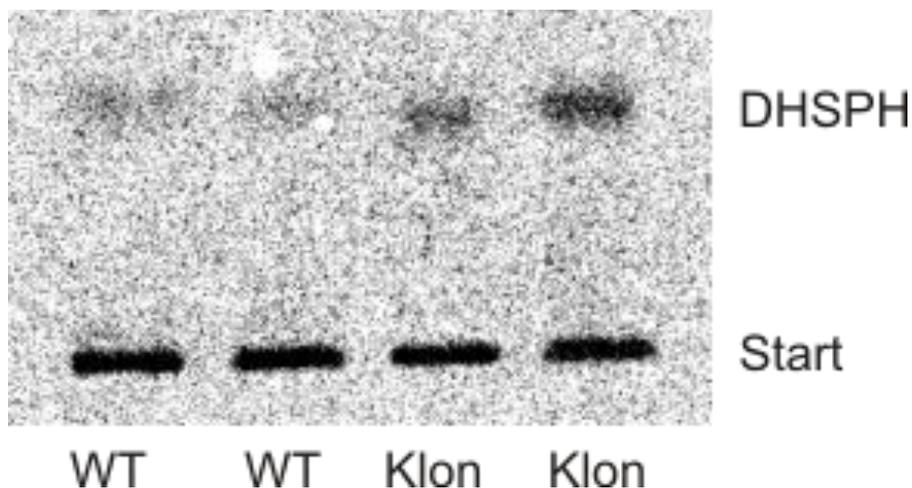


Abbildung 13: In vitro Assay mit [U-¹⁴C]Serin als Substrat

200µg Protein wurden mit 200.000 dpm [U-¹⁴C]Serin (0,6 nmol) für 30 Minuten inkubiert. Nach Extraktion mit Chloroform/Methanol (2:1) wurde der Gesamtextrakt dünnschichtchromatographisch im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/2N NH₄OH (40:10:1) aufgetrennt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2.2 [1-¹⁴C]-Palmitinsäure

Um zu klären, ob die Überexpression der spt in den HEK293 Zellen eine Veränderung im Lipidstoffwechsel der Zellen bewirkt, wurde eine *in vivo* Inkubation mit [1-¹⁴C]-Palmitinsäure durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden mit der Palmitinsäure in serumfreiem Medium inkubiert. Mit dem Zellextrakt wurden anschließend eine saure und eine basische Hydrolyse durchgeführt, die mittels Dünnschichtchromatographie analysiert wurden. Dabei zeigte sich in der Autoradiographie bei den transfizierten Zellen, außer der bereits beim Serin-Assay festgestellten Zunahme an Dihydrosphingosin (Abb.:14A), eine Zunahme an Glucocerebrosid (Abb.:15A). Die übrigen Lipide blieben annähernd gleich.

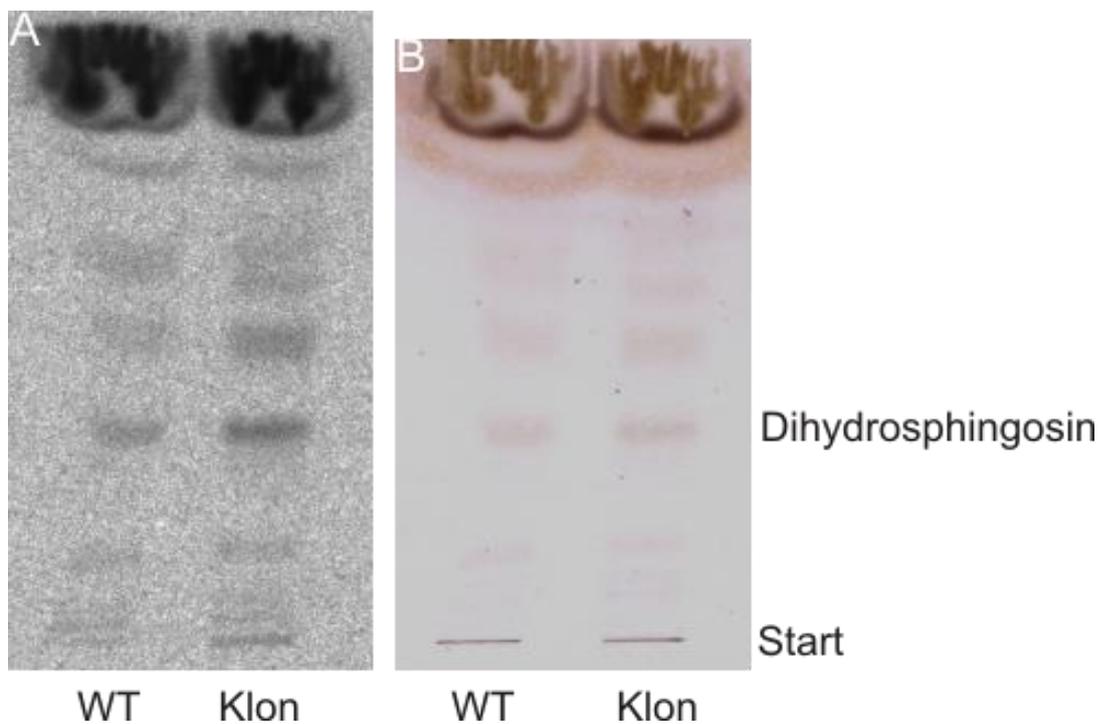


Abbildung 14: Saure Hydrolyse der ¹⁴C-markierten Lipide

Die Extrakte wurden nach 2-stündiger Inkubation in methanolischer HCl bei 80°C und Extraktion mit Hexan/Äther im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/2N NH₄OH (40:10:1) aufgetrennt. Die Zuordnung der Banden erfolgte über Standards.

(A) Autoradiographie des entstandenen Dihydrosphingosin in WT-Zellen und transfizierten Zellen.

(B) Dünnschichtchromatographie verascht

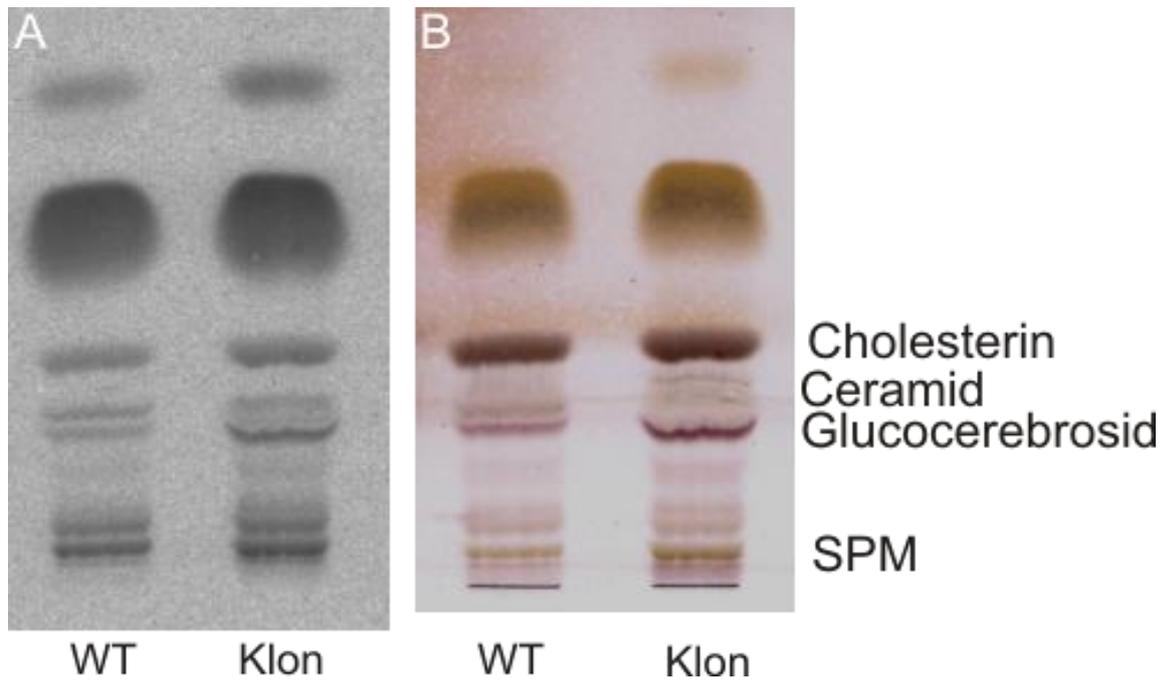


Abbildung 15: Basische Hydrolyse der ¹⁴C-markierten Lipide

Die Extrakte wurden nach 2-stündiger Hydrolyse in 0,5N KOH und Extraktion mit CHCl₃ aufgetrennt. Als Laufmittelsystem wurde Chloroform/Methanol/H₂O (60:30:5) bis zu einem Drittel der Platte, gefolgt von Hexan/Diethylether/Essigsäure (80:20:1,5) bis zum Ende der Platte, verwendet. Die Zuordnung der Banden erfolgte über Standards.

(A) Autoradiographie der entstandenen Lipide in WT-Zellen und transfizierten Zellen.

(B) Dünnschichtchromatographie verascht

3.3 Untersuchungen zur Interaktion von spt mit anderen Genen im Sphingolipidmetabolismus

Da spt das Schlüssel-Enzym der Sphingolipidsynthese darstellt, sollte ermittelt werden, ob und wie sich die Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus im spt überexprimierenden Klon ändern. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Defizienz der sauren, sowie der neutralen Sphingomyelinasen auf die Expression von spt auswirken.

3.3.1 Expression anderer Gene im spt überexprimierenden Klon

Es stellte sich die Frage, ob die Überexpression von spt in den HEK293 Zellen zu einer veränderten Expression anderer Gene im Vergleich zum Wildtyp führt. Untersucht wurden daher sowohl die Gene der Enzyme des Katabolismus im Sphingolipid-Metabolismus (Sphingosin-Kinase und Sphingosin-1-Phosphat-Lyase), als auch die saure Ceramidase und verschiedene longevity assurance homologue genes (lass) (Abb.:16).

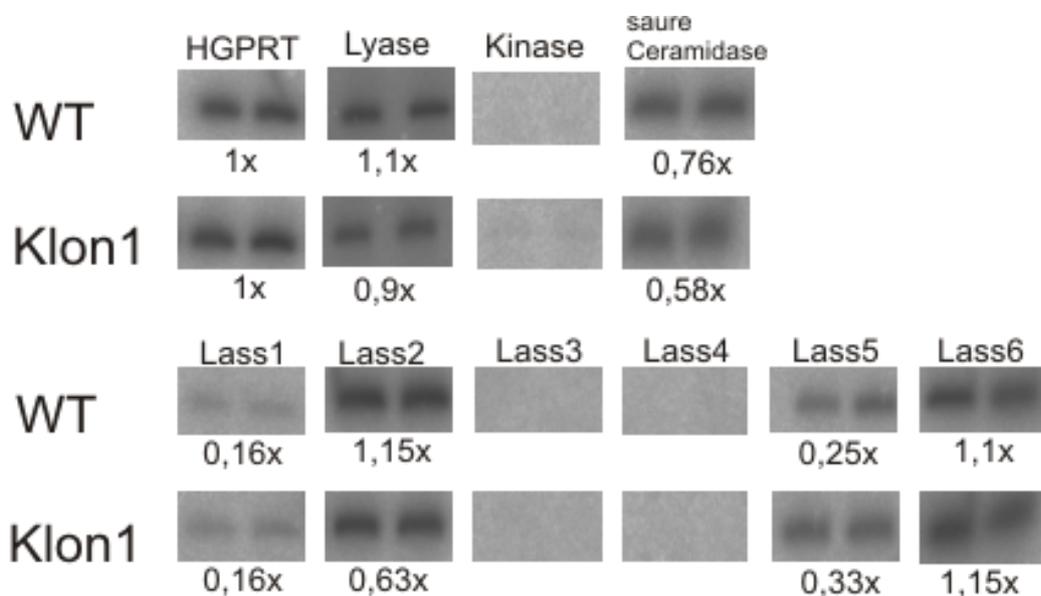


Abbildung 16: Vergleich der Expression anderer Gene im spt überexprimierenden HEK293-Zellklon

Mittels quantitativer RT-PCR wurden die Expressionen verschiedener Gene im die spt überexprimierenden Klon mit dem WT verglichen. Alseinzige Veränderung konnte hierbei eine verringerte lass2 Expression festgestellt werden.

Die saure Ceramidase katalysiert die Hydrolyse der Amidbindung im Ceramid (Abb.:1), wodurch Sphingosin und freie Fettsäure entstehen. Die *lass*-Gene kodieren für die Ceramid Synthasen, welche die Bindung der langkettigen Fettsäure an die Aminogruppe von Sphingosin katalysieren.

Merkliche Änderungen in der Expression der Gene konnten nur bei *lass 2* beobachtet werden (Abb.:16). Im Gegensatz zum WT wurde das Gen im Klon um die Hälfte verringert exprimiert.

3.3.2 Expression von *spt* in Sphingomyelinase defizienten Mäusen

Um zu klären, ob sich eine Deletion der Sphingomyelinase auf die *spt* Expression in den Organen auswirkt, wurden sowohl Mäuse, die eine Defizienz der sauren Sphingomyelinase (*aSMase*^{-/-}) aufweisen, als auch eine Mauslinie, die defizient in beiden neutralen Sphingomyelinasen 1 und 2 (*SMPD2/3*^{-/-}) ist, auf ihre *spt* Expression hin untersucht. Sphingomyelinasen spalten die Phosphodiesterbindung des Sphingomyelins, wobei Ceramid und Phosphorylcholin entstehen (Abb.:1).

Für die Analyse der *spt*-Expression wurde RNA der Leber, des Gehirns und der Milz isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der quantitativen PCR auf *spt* hin untersucht (Abb.:17). Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde das ubiquitäre Transkript der HGPRT verwendet. Es zeigte sich, daß kein signifikanter Unterschied der *spt*-Expression in den unterschiedlichen Organen der Sphingomyelinase defizienten Mäuse zu finden ist.

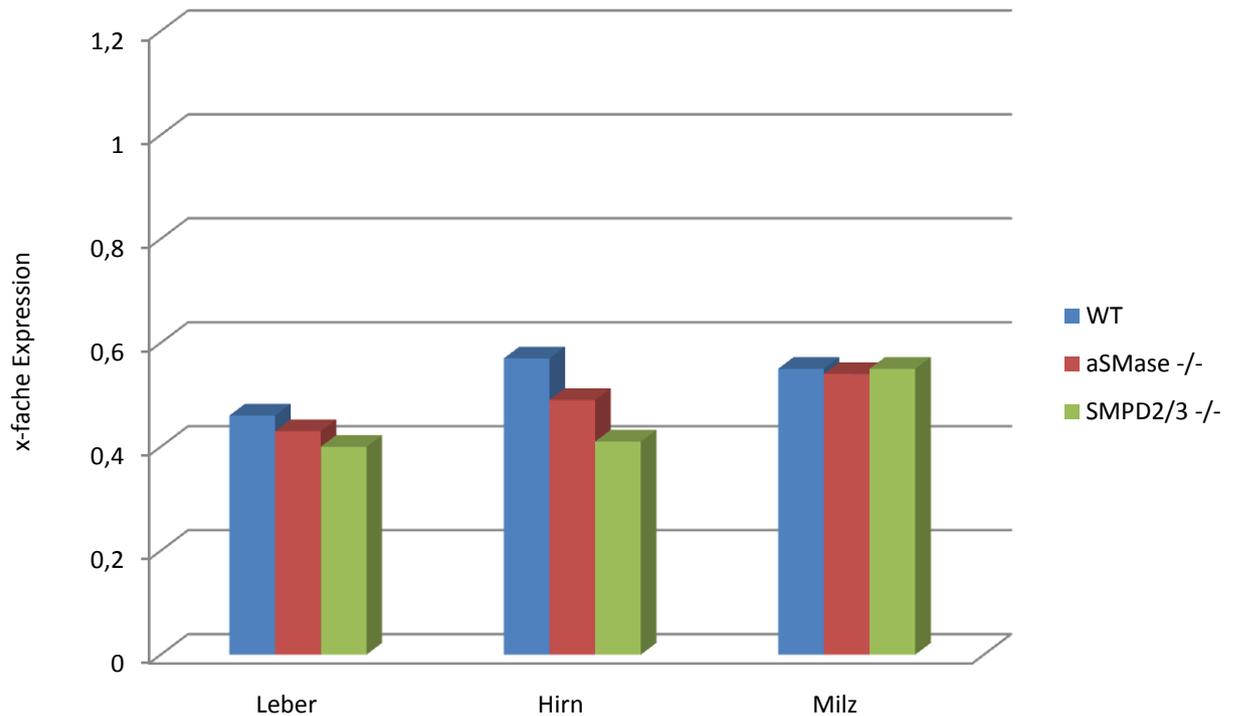


Abbildung 17: Vergleich der spt-Expression in verschiedenen Organen der WT-, und der Sphingomyelinase defizienten Mäuse

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die spt Expression in Leber, Gehirn und Milz der aSmase^{-/-}, und der SMPD2/3^{-/-} Mäuse mit dem WT verglichen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4 Verwertung von Monoensäuren durch spt

Um zu überprüfen, ob die spt außer gesättigten Fettsäuren, wie der Palmitinsäure, auch ungesättigte Fettsäuren verwertet, wurden spt-transfizierte HEK293 Zellen in serumfreiem Medium mit einem Gemisch aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren für 48 Stunden inkubiert. An die *in vivo* Inkubation schloß sich eine saure Hydrolyse des Zellextraktes an, wobei die Lipide mittels methanolischer HCl umgeestert wurden. Um die Fettsäuren gaschromatographisch zu untersuchen, wurden die Hydroxygruppen der Fettsäuren mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) derivatisiert.

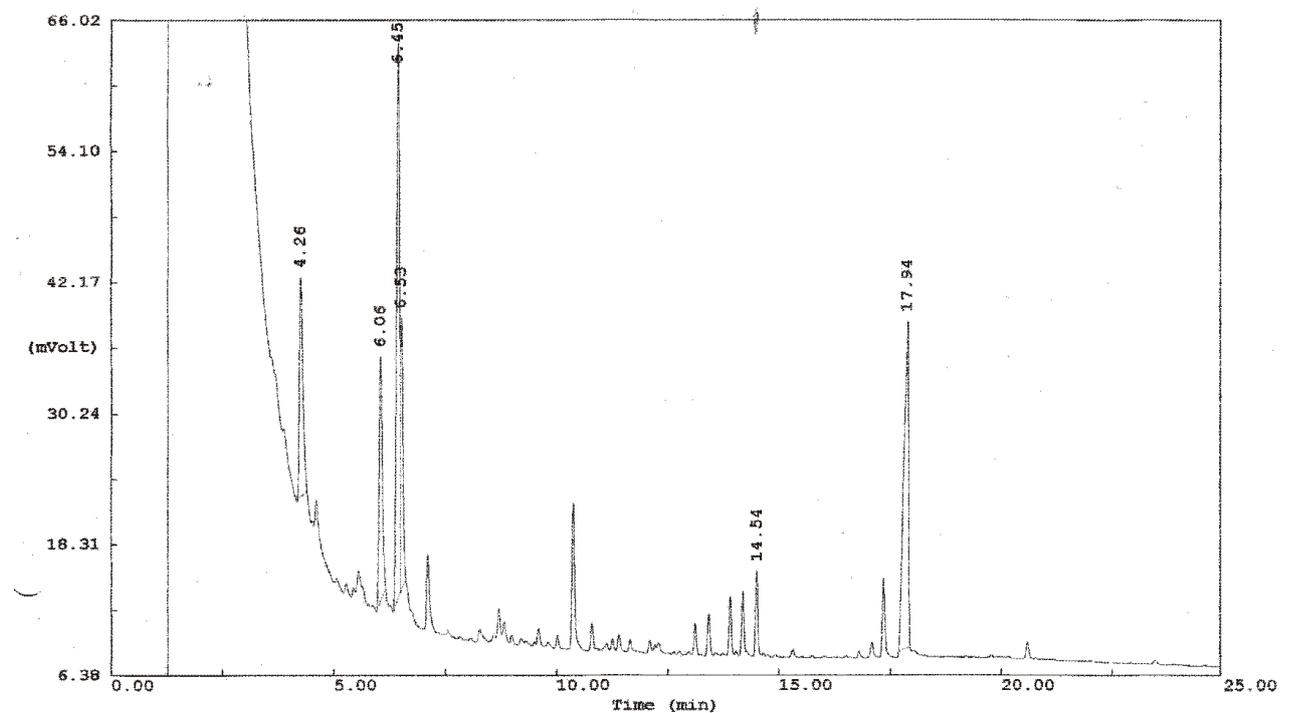


Abbildung 18: Gaschromatographie der Fettsäuren der unbehandelten spt transfizierten HEK293 Zellen

Die Fettsäuren der spt-transfizierten HEK293 Zellen wurden extrahiert, mittels methanolischer HCl umgeestert und nach Derivatisierung mit MSTFA gaschromatographisch aufgetrennt.

Es wurde kein Unterschied zwischen den mit Monoensäuren inkubierten und den unbehandelten HEK293 Zellen beobachtet (Abb.:18+19).

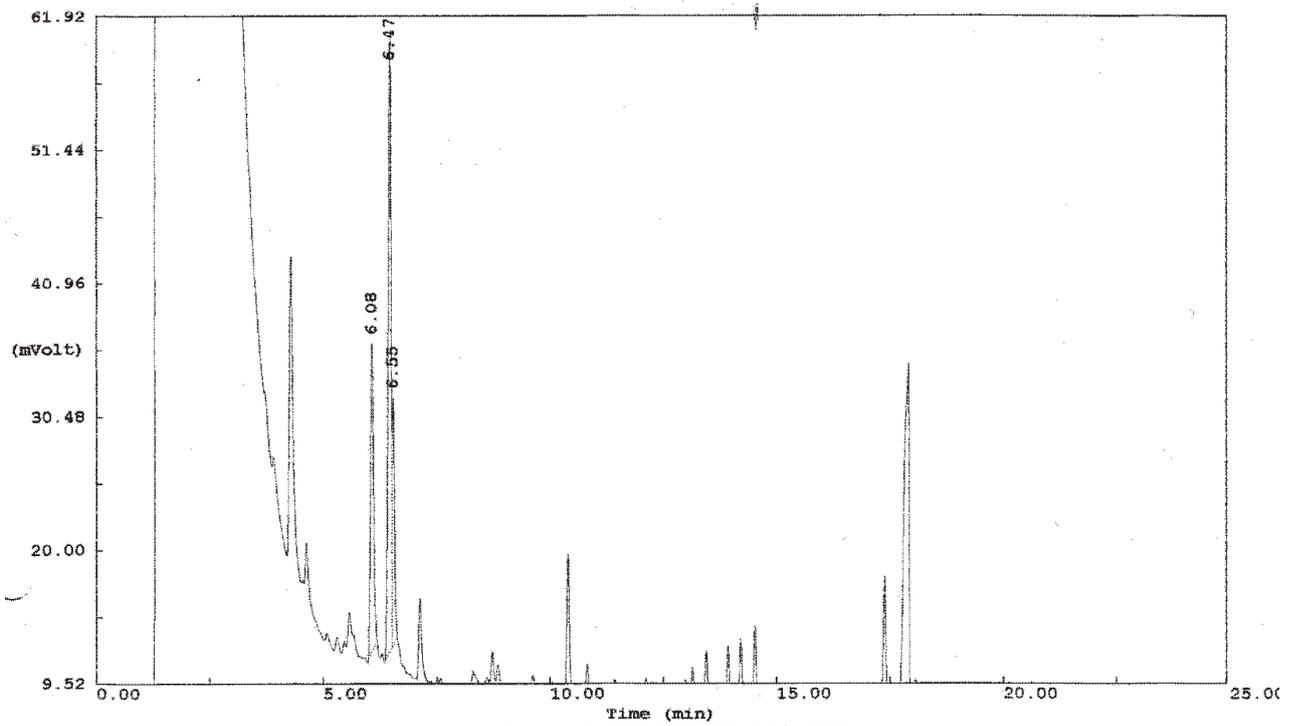


Abbildung 19: Gaschromatographie der Fettsäuren der mit einem Gemisch aus Monoensäuren inkubierten spt transfizierten HEK293- Zellen

Nach 48-stündiger Inkubation der spt-transfizierten HEK293-Zellen in serumfreiem Medium, wurden die Fettsäuren extrahiert, mit methanolischer HCl umgeestert und anschließend für die Gaschromatographie mit MSTFA derivatisiert.

3.5 Apoptose-Messungen

Um zu überprüfen, ob spt, wie für Ceramid postuliert, eine Rolle beim programmierten Zelltod spielt, wurden verschiedene Assays durchgeführt, mit denen apoptotische Stadien nachweisbar sind.

3.5.1 AnnexinV-Färbung

In vitalen Zellen findet sich eine asymmetrische Verteilung der Phospholipide. Phosphatidylcholin ist hauptsächlich extrazellulär lokalisiert. Dahingegen liegen Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin hauptsächlich intrazellulär vor. Wenn eine Zelle apoptotisch wird, so führt das zu unterschiedlichen morphologischen Veränderungen. Eine davon ist, daß das Phosphatidylserin (PS) an die Oberfläche der Zelle translokalisiert wird. Dort kann es mit Hilfe von Annexin V detektiert werden, das eine starke Affinität zu PS besitzt (Koopman et al., 1994, Martin et al., 1995).

Die spt transfizierten HEK293 Zellen und die HEK293 WT-Zellen wurden auf Deckgläschen gesplittet. Es folgte eine Stimulation der Zellen mit 100ng/ml TNF- α für 30 Minuten. Nach anschließender Inkubation der induzierten und der nicht induzierten Zellen mit AnnexinV-Cy3, wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

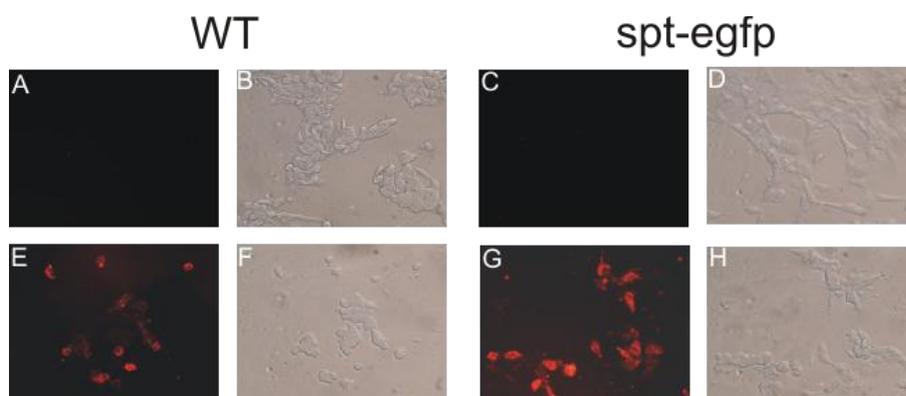


Abbildung 20: AnnexinV-Färbung in WT-Zellen und spt transfizierten Zellen

(A+D) Fluoreszenzmessung von nicht induzierten WT und spt-egfp-Zellen. (B+D) Durchlichtaufnahmen von nicht induzierten WT HEK293-, und spt-egfp HEK293-Zellen. (E+G) Fluoreszenzmessung von WT HEK293-, und spt-egfp HEK293-Zellen nach 30-minütiger Induktion mit 100ng/ml TNF- α . (F+H) Durchlichtaufnahmen der WT HEK293-, und spt-egfp HEK293-Zellen nach 30-minütiger Induktion mit 100ng/ml TNF- α .

Bei WT- und spt transfizierten Zellen ohne Induktion mit TNF- α konnte nahezu keine Apoptose beobachtet werden. Bei beiden Zelltypen führte die Induktion mit TNF- α zur Fluoreszenz von einem Großteil der Zellen und damit zur Apoptose (Abb.:20).

3.5.2 TUNEL-Assay

Während der Apoptose kommt es durch Aktivierung intrazellulärer Endonukleasen zur Fragmentierung der DNA, was wiederum eine Zunahme der freien 3'-OH Enden mit sich bringt. Bei der Durchführung eines Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)-Assays wird an diese Enden ein fluoreszeinmarkiertes dUTP angehängt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Terminal deoxynucleotidyl Transferase katalysiert. Ein mit Peroxidase (POD) gekoppelter anti-Fluoreszein Antikörper bindet in Folge an das Fluoreszein. Als Substrat für das POD wird Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Durch Oxidation bildete sich ein braunes Reaktionsprodukt, das die Apoptose visualisiert (Gold et al., 1994, Gorczyca et al., 1993, Sgonc et al., 1994). Nach Durchführung des Assays wurde bei den spt transfizierten Zellen keine Abweichung zur Apoptoserate der WT-Zellen festgestellt (Tabelle 2). Nur sehr vereinzelt konnten apoptotische Zellen beobachtet werden (Abb.:21).

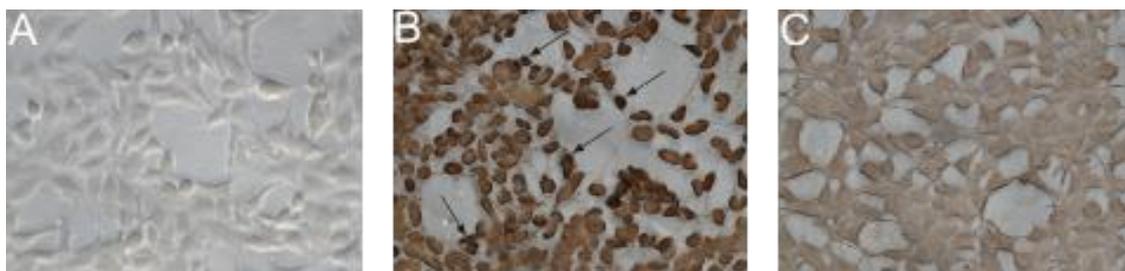


Abbildung 21: TUNEL-Assay an spt transfizierten HEK293 Zellen

(A) Negativ-Kontrolle ohne Zusatz der Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT). (B) Die Positiv-Kontrolle wurde vor dem Einsatz der TdT für 10 Minuten mit DNase I inkubiert, um Strangbrüche zu induzieren. Die Pfeile markieren einige der apoptotischen Zellen. (C) Spt-transfizierte HEK-Zellen. Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung

Tabelle 2: Ergebnisse des TUNEL-Assays

	WT-Zellen	spt transfizierte Zellen
Apoptotische Zellen in %	2,8	2,1

3.6 Katabolismus der Sphingolipide

Die spt stellt das erste Enzym des anabolischen Weges im Metabolismus der Sphingolipide dar. Um die Enzyme des Katabolismus vergleichend betrachten zu können, wurden die Sphingosin-Kinase und die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase kloniert. Durch Erstellung von Zelllinien, die die Lyase und die Kinase stabil exprimieren, war es möglich, Untersuchungen auch für den katabolischen Weg des Sphingolipid-Metabolismus durchzuführen.

3.6.1 Etablierung einer stabilen Kinase-, und Lyase-Expression

Es wurde eine stabile, die Sphingosin-Kinase unter dem CMV Promoter exprimierende, HEK293 Zelllinie generiert. Als Vektor wurde das EGFP-N2 Plasmid verwendet.

Als Ausgangsvektor für die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase wurde ebenfalls das EGFP-N2 Plasmid verwendet. Zur Transfektion wurden COS-Zellen, eine Fibroblasten-Zelllinie, stabil mit der Lyase transfiziert. Da die Konstrukte der Kinase und der Lyase das egfp Gen beinhalteten, waren fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen möglich. Beide Enzyme wurden unter der Kontrolle des CMV-Promoters transkribiert.

Zusätzlich wurde eine die Lyase exprimierende Zelllinie erstellt, bei der das Plasmid pcDNA3.1 als Expressionsvektor diente. Auch in diesem Vektor wurde die Lyase unter dem CMV Promoter konstitutiv exprimiert.

3.6.1.1 Erstellung der Konstrukte

Als Expressionsvektor für die Kinase wurde das EGFPN-2 Plasmid verwendet. Für die Gewinnung der Kinase cDNA wurde in den PCR sense Primer eine Hind III-, und in den antisense Primer eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Als Template für die PCR wurde aus der Maus gewonnene cDNA der Lunge verwendet. Die so erhaltene spezifische cDNA der Kinase wurde in den PCR2.1 Vektor kloniert (Abb.:22). Die cDNA wurde mittels der Restriktionsendonukleasen Hind III und EcoRI herausgeschnitten und in den EGFPN-2 Vektor ligiert und kloniert (Abb.:22). Durch Sequenzierung wurde die Fusion mit dem egfp Gen bestätigt (Abb.:22).

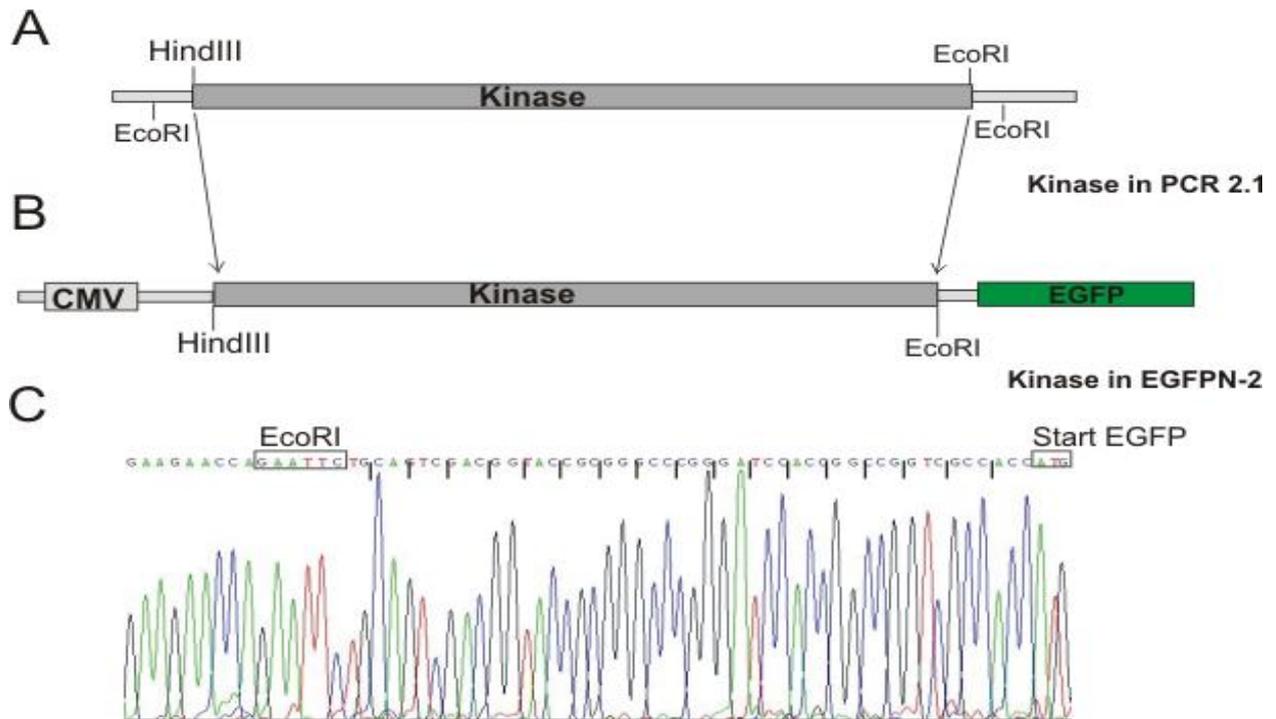


Abbildung 22: Konstrukterstellung Kinase-EGFP

(A) Klonierung der Kinase cDNA in den PCR 2.1 Vektor. (B) Klonierung des Fusionskonstruktes Kinase-EGFP unter Kontrolle des CMV-Promoters. Der Einbau der Kinase cDNA erfolgte nach HindIII und EcoRI Restriktion der cDNA im PCR 2.1 Vektor und der Ligation in die entsprechenden Restriktionsstellen im EGFP-N2 Vektor. (C) Sequenzierung des Kinase-EGFP Konstruktes. Die in den Primer eingefügte EcoRI Restriktionsschnittstelle ist gekennzeichnet und die Leserastermarkierung führt zum Startcodon des EGFP.

Für die Lyase wurden die Plasmide EGFP-N2 und pcDNA3.1 als Expressionsvektoren verwendet. Der sense Primer wurde mit einer XhoI-, und der antisense Primer mit einer ApaI-Schnittstelle versehen. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion wurde cDNA aus der Leber der Maus mit diesen Primern amplifiziert. Die so entstandene spezifische cDNA der Lyase wurde in den PCR2.1 Vektor ligiert. Aus diesem wurde die cDNA mit den Restriktionsendonukleasen XhoI und ApaI restringiert und in den EGFP-N2 Vektor (Abb.:23) bzw. in den pcDNA3.1/Myc-His-Vektor kloniert (Abb.:24).

Mittels Sequenzierungen wurden bei der Lyase die Fusion mit dem egfp Gen bzw. dem myc-Epitop bestätigt und so eine Leserasterverschiebung ausgeschlossen (Abb.:23+24).

3.6.2 Expressionsnachweis

HEK293 Zellen wurden mit dem linearisierten Kinase-EGFP-N2 Vektor transfiziert. Für die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase wurden COS-Zellen zur Transfektion mit dem linearisierten Lyase-EGFP-N2 Vektor verwendet. Desweiteren wurden HEK293 Zellen mit dem Vektor Lyase-pcDNA3.1 transfiziert. Mit Hilfe einer in den Vektoren liegenden Expressionskassette für die Neomycin-Phosphotransferase wurde anschließend eine Selektion durchgeführt. Diese erfolgte für 14 Tage durch Zugabe von G418, einem Strukturanalog von Neomycin, in das Kulturmedium. Nach Vereinzeln und Expansion überlebender Klone, wurden diese auf die jeweilige Expression der Proteine hin überprüft.

Durch die TRIZOL-Methode gewonnene RNA der Klone wurde in cDNA umgeschrieben. Diese wurde mittels quantitativer RT-PCR auf die Expressionraten der Kinase bzw. der Lyase hin untersucht. Als innerer Standard diente das ubiquitäre Transkript der Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HGPRT).

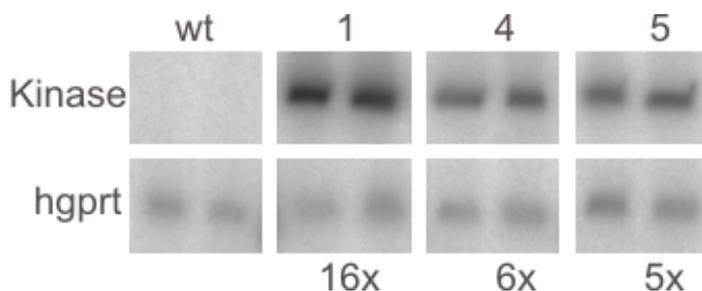


Abbildung 25: Quantitative RT-PCR von Kinase-EGFP HEK293-Zellklonen

Die RT-PCR wurde mit Kinase spezifischen Exon-Primern durchgeführt. Im Wildtyp ist keine Transkription zu erkennen. Die Transkriptionsraten der Klone sind ins Verhältnis mit der jeweiligen Transkription des Zellstandards hgprt gesetzt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die so untersuchten Klone wiesen unterschiedliche Expressionsraten der Enzyme auf (Abb.:25-27). Verwendet wurde der am jeweils stärksten exprimierende Klon der Kinase, bzw. der Lyase.

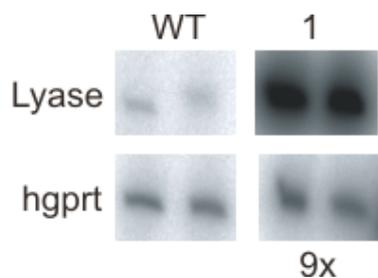


Abbildung 26: Quantitative RT-PCR von Lyase-EGFP COS-Zellklonen

Im Wildtyp der COS-Zellen ist eine geringe Transkription der Lyase zu erkennen. Im Verhältnis zu den jeweiligen hgprt-Werten ist die Expression im Klon1 9-fach so stark wie im Wildtyp. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

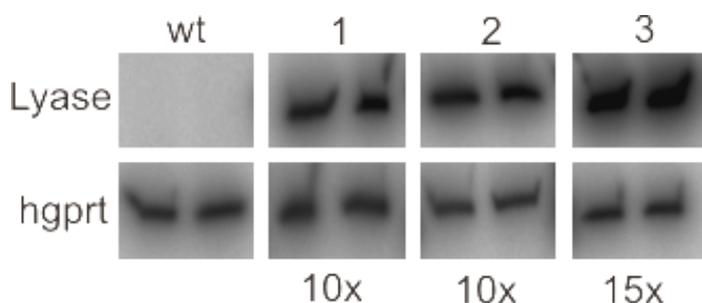


Abbildung 27: Quantitative RT-PCR von Lyase pcDNA3.1 HEK293-Zellklonen

Im Wildtyp der HEK293-Zellen liegt keine Transkription der Lyase vor. Die Transkriptionsrate der Klone ist auf die hgprt Werte bezogen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Aufgrund der Transkriptionsrate wurde im Folgenden mit dem Kinase Klon "EGFP-Kinase Klon 1" und mit dem Lyase Klon "pcDNA3.1 Klon 3" weitergearbeitet. Neben der Ermittlung der Transkriptionsraten der Klone, wurden die mit dem EGFP-N2 Konstrukt erstellten Klone fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb.:28+29).

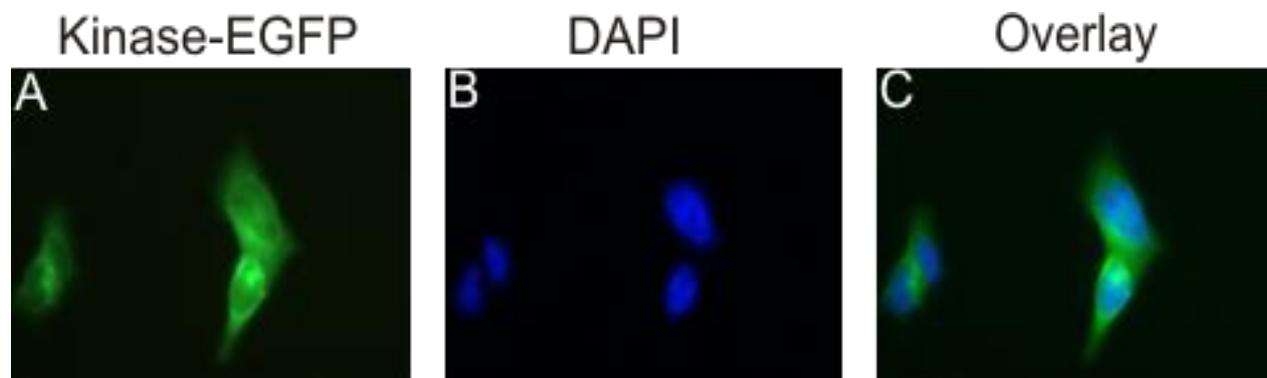


Abbildung 28: Immunfluoreszenz Kinase transfizierter HEK293 Zellen

An den transfizierten Zellen wurde mit DAPI eine Kernfärbung vorgenommen. (A) Eigenfluoreszenz (B) Kernfärbung mittels DAPI (C) Überlagerung von A+B.

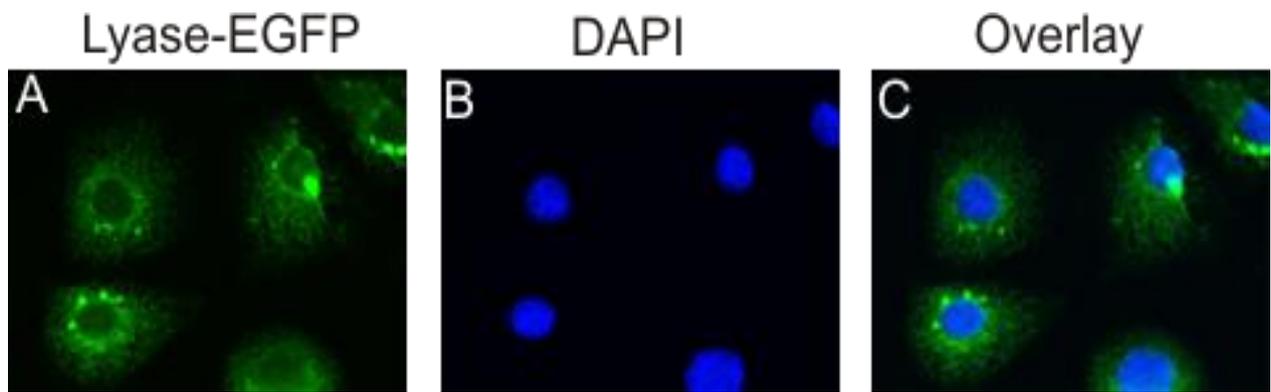


Abbildung 29: Immunfluoreszenz Lyase transfizierter COS-Zellen

An den transfizierten Zellen wurde mit DAPI eine Kernfärbung vorgenommen. (A) EGFP-Fluoreszenz (B) Kernfärbung mittels DAPI (C) Überlagerung von A+B.

Bei der Kinase zeigte sich aufgrund der cytosolischen Lokalisation eine, den Zellkern ausgenommene, Fluoreszenz der Zelle (Abb.:28). Da die Lyase am endoplasmatische Retikulum lokalisiert ist, ist die EGFP Fluoreszenz dort zu beobachten (Abb.:29).

3.7 Biochemische Charakterisierungen

3.7.1 Biochemische Charakterisierung der Sphingosin-Kinase

Bei der Durchführung des Kinase-Assays wurde anhand der Angaben von Olivera verfahren (Olivera et al., 2000). Dabei wurde die Entstehung des Sphingosin-1-Phosphats (SPP) mittels der Inkorporation von [32 P]-ATP gemessen. Die quantitative Bestimmung von SPP wurde anhand einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung ermittelt (Abb.:30).

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurde der Versuch auch ohne Radioaktivität durchgeführt, und die erhaltenen Produkte mittels eines Massenspektrometers aufgetrennt und nachgewiesen (ohne Abbildung).

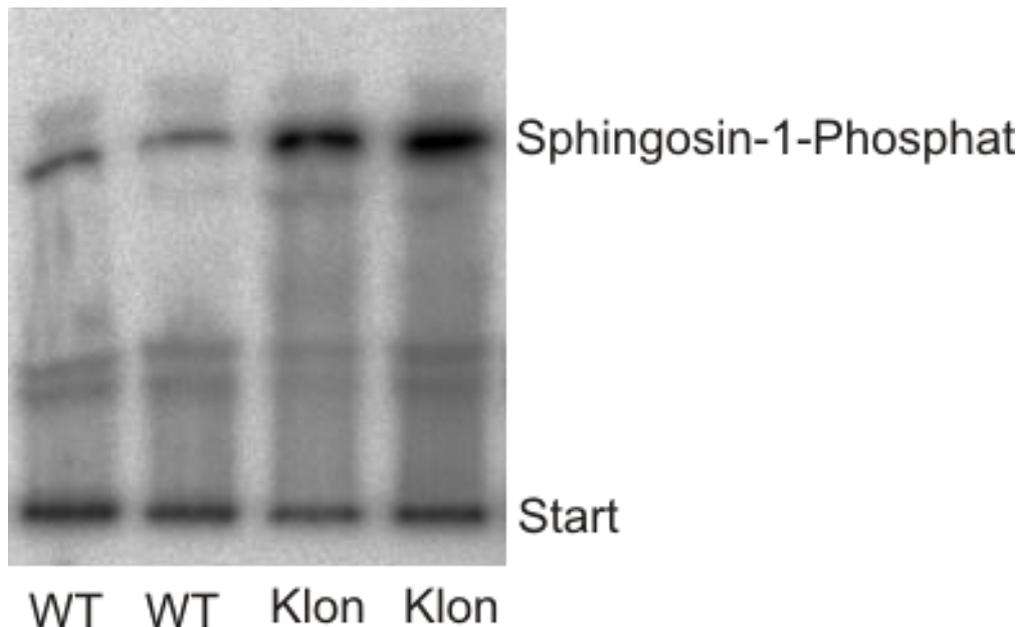


Abbildung 30: Kinase *in vitro* Assay mit [32 P]-ATP

Nach Inkubation der cytosolischen Fraktion des Zellextraktes mit [32 P]-ATP im Kinase Puffer wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}$ (100:200:1), sowie von 2M KCl. Für die Dünnschichtchromatographie wurde das Laufmittelsystem 1-BuOH/MeOH/AcOH/ H_2O (80:20:10:20) verwendet. Die Zuordnung der Bande erfolgte über einen Standard. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.7.2 Biochemische Charakterisierung der Sphingosin-1-Phosphat Lyase

Synthese von [³H]-markiertem Dihydrosphingosin-1-Phosphat

Für die biochemische Charakterisierung der Sphingosin-1-Phosphat Lyase wurde [³H]-Dihydrosphingosin-1-Phosphat benötigt. Sphingosylphosphocholin (SPC) wurde zur Synthese von [³H]-Dihydrosphingosin-1-Phosphat mittels Natriumbor[³H]hydrid in 0,1 M Natriumhydroxid Lösung in Gegenwart von PdCl₂ reduziert und mit Hilfe der Phospholipase D in Dihydrosphingosin-1-Phosphat und Cholin gespalten. Die Dihydrosphingosin-1-Phosphat Bande wurde nach dünnschichtchromatographischer Trennung isoliert und mit Hilfe von Methanol eluiert.

Die eluierte Probe wurde dünnschichtchromatographisch auf Reinheit geprüft. SPC und Sphingosin-1-Phosphat dienten als Standards (Abb.:31).

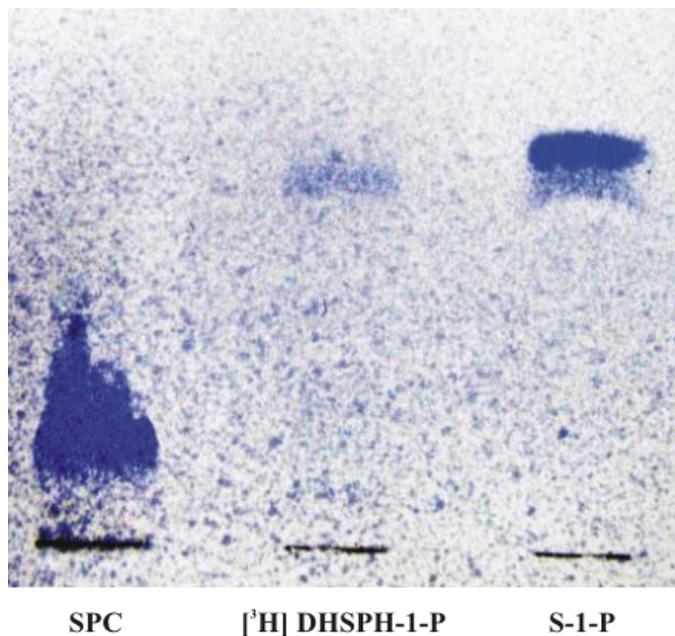


Abbildung 31: Kontrolle des synthetisierten [³H]-Dihydrosphingosin-1-Phosphat
Detektionsreagenz: Zindzadze.

Biochemische Charakterisierung

Für den Lyase-Assay wurden die subzellulären Bestandteile der mit der Lyase transfizierten HEK293 Zellen durch Gradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Eine zuvor durchgeführte enzymatische Messung der Fraktionen einer Mausleber bestätigte, daß die Mikrosomenfraktion die höchste Lyaseaktivität besitzt. Dabei wurde durch Zentrifugation eine Auftrennung des Zellextraktes in verschiedene Fraktionen erreicht. Es wurden die Überstände der Zentrifugationsschritte von 900g, 10.000g (Mitochondrien, Lysosomen), 100.000g sowie das Sediment der Zentrifugation bei 100.000g (Mikrosomen) für den Assay verwendet. Die Mikrosomenfraktion wies eine um das 4-fach gesteigerte Lyaseaktivität im Gegensatz zu den anderen Fraktionen auf (ohne Abbildung).

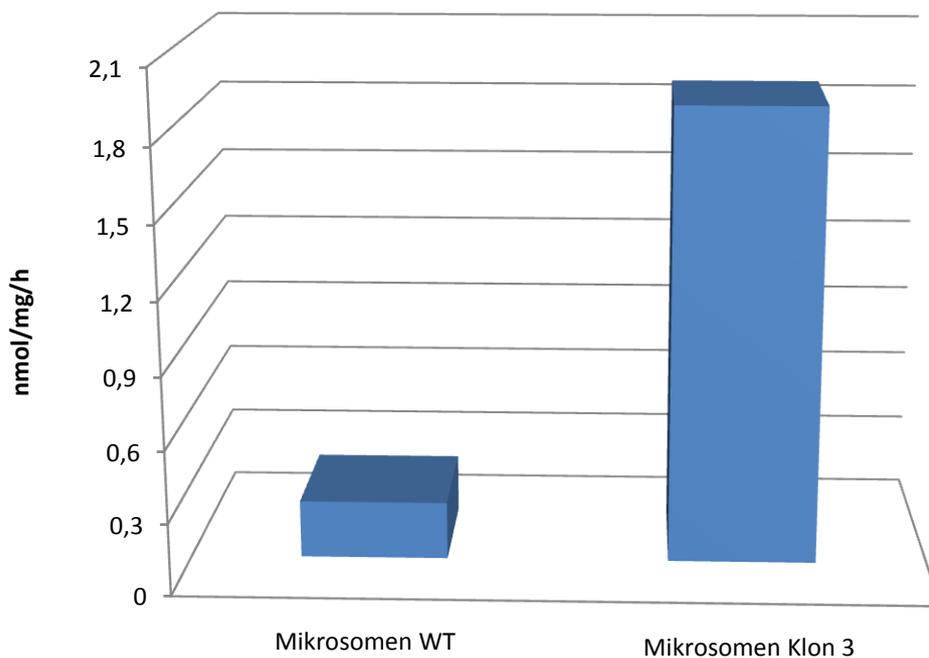


Abbildung 32: Enzymatische Aktivität in den Mikrosomen der HEK293 Wildtyp-Zellen und der transfizierten Zellen

Durch Zentrifugation gewonnene Mikrosomen wurden im Assay mit 4nMol [³H]-Dihydrosphingosin-1-Phosphat inkubiert und das durch die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase gewonnene Hexadecanal nach Extraktion mit Methylenchlorid im Szintillationszähler quantifiziert. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Mit der Mikrosomenfraktion der HEK293 WT-Zellen und der mit der Lyase transfizierten HEK293 Zellen wurde der Assay durchgeführt. Nach Präinkubation des Extraktes mit Na-F zur Hemmung der Phosphatasen wurde die Mikrosomenfraktion mit [³H]-Dihydrosphingosin-1-Phosphat inkubiert. Dadurch wurde das entstehende Hexadecanal markiert. Nach dreimaliger Extraktion des Zellextraktes mit Methylenchlorid wurde das Hexadecanal isoliert. Aliquote wurden im Szintillationszähler auf ihre Radioaktivität hin gemessen (Abb.:32).

3.8 Untersuchung zur Interaktion der Kinase und der Lyase mit anderen Genen des Sphingolipidmetabolismus

3.8.1 Expression anderer Gene im Kinase-, bzw. Lyase- überexprimierenden Klon

Wie bereits bei der Analyse des die spt überexprimierenden HEK293 Zellklons sollte überprüft werden, ob die Überexpression der Kinase bzw. der Lyase in den HEK293 Zellen die Expressionen anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus im Vergleich zu deren Expression in den HEK293 WT-Zellen beeinflusst. Durch quantitative RT-PCR wurden die Expressionen von spt, der Lyase bzw. Kinase, sowie der sauren Ceramidase und verschiedener longevity assurance homologe genes (lass) ermittelt.

Die Untersuchung des die Kinase überexprimierenden Klons zeigte, daß die Genexpression der getesteten Gene nicht von deren Expression in den WT HEK293 Zellen abweicht (Abb.: 33).

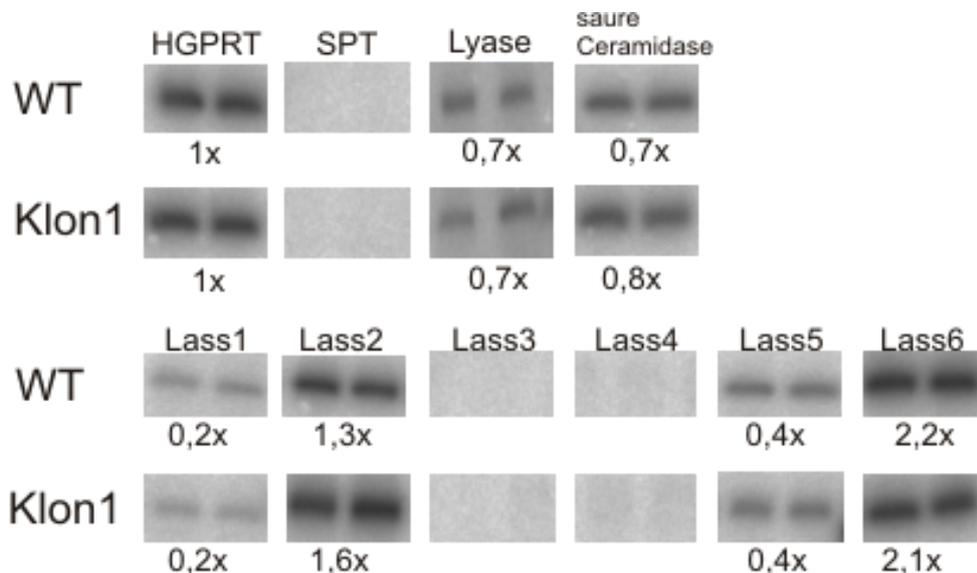


Abbildung 33: Vergleich der Expression anderer Gene im die Kinase überexprimierenden HEK293-Zellklon

Mittels quantitativer RT-PCR ermittelte Expressionen unterschiedlicher Gene in HEK293 WT-Zellen, sowie Kinase transfizierter HEK293-Zellen.

Bei der Analyse des die Lyase überexprimierenden Klons konnte allerdings eine Abnahme der lass 2- und lass 6-Expression im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abb.:34). Ansonsten sind die Expressionen der Gene im Vergleich zum WT nicht signifikant verändert.

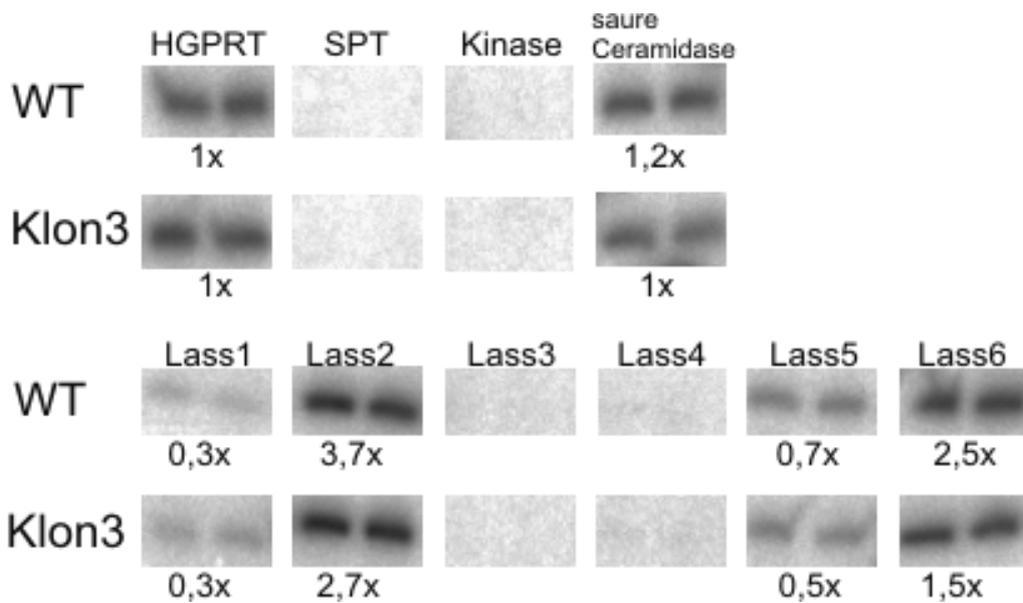


Abbildung 34: Vergleich der Expression anderer Gene im die Lyase überexprimierenden HEK293-Zellklon

Quantitative RT-PCR zur Expressionen unterschiedlicher Gene in HEK293 WT-Zellen sowie Lyase transfizierter HEK293-Zellen.

3.8.2 Untersuchung zur Expression der Kinase und der Lyase in Sphingomyelinase defizienten Mäusen

Um zu testen, ob die Defizienz der Sphingomyelinase Auswirkungen auf den Katabolismus der Sphingolipide hat, wurden die *aSmase*^{-/-} und die *SMPD2/3*^{-/-} Mäuse auf die Expression der Kinase und der Lyase untersucht. Dafür wurden die gewebsspezifischen Expressionen der Kinase und der Lyase zwischen WT und Sphingomyelinase defizienter Maus miteinander verglichen. Als innerer Standard diente HGPRT.

Bei der Kinase wurde kein Unterschied in der Expression bei den unterschiedlichen Maus-Genotypen gefunden (Abb.:35). Die Lyase zeigte in der Leber eine Verringerung der Lyase Expression in der *SMPD2/3*^{-/-} Maus um etwa ein Drittel. Im Gehirn liegt die Expression in der *aSmase*^{-/-} um das Doppelte über der WT-Expression (Abb.:36).

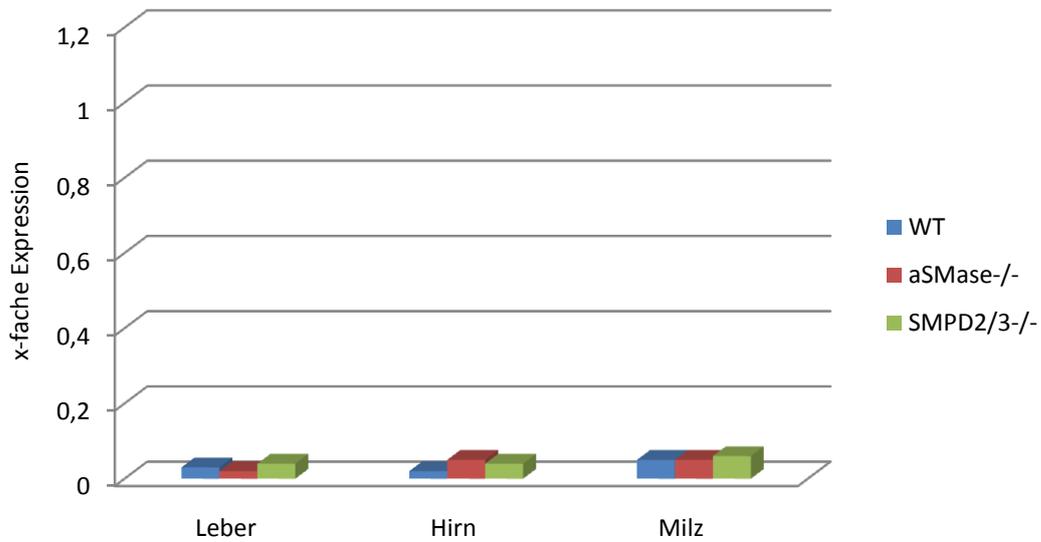


Abbildung 35: Vergleich der Kinase-Expression in verschiedenen Organen der WT-, und Sphingomyelinase defizienten Maus

Quantitativer Vergleich der Expressionsstärken der Kinase in der Leber, des Hirn und der Milz einer WT-Maus zur Sphingomyelinase defizienten Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

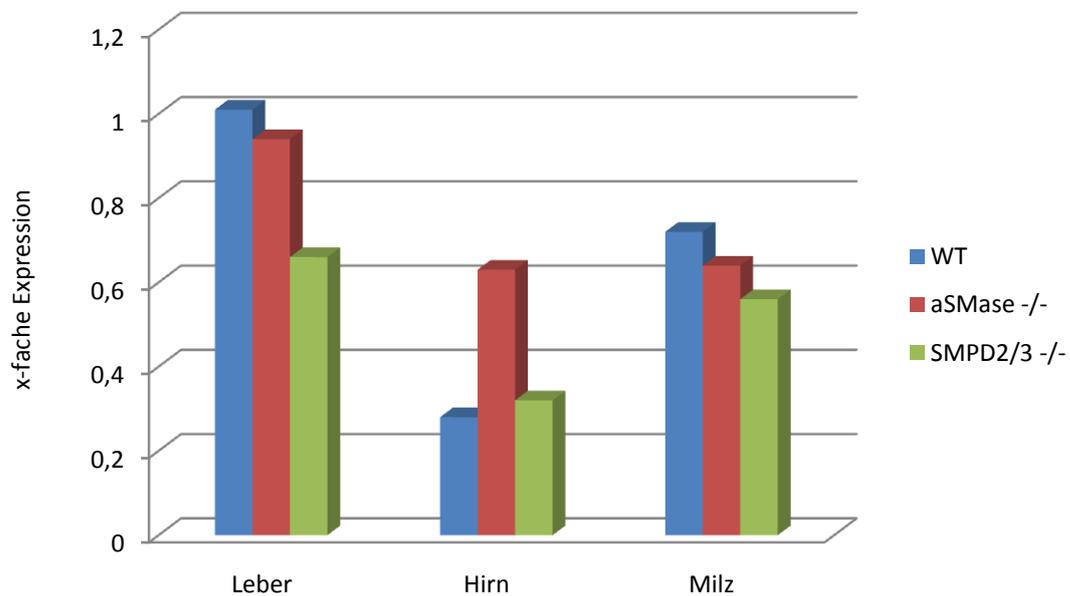


Abbildung 36: Vergleich der Lyase-Expression in verschiedenen Organen der WT-, und Sphingomyelinase defizienten Mäuse

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Lyase Expression in Leber, Hirn und Milz der aSMase^{-/-} und SMPD2/3^{-/-} mit dem WT verglichen.

3.9 Apoptose

Um die apoptotische Wirkung der Kinase und der Lyase zu überprüfen, wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt. Sowohl in Kinase-, als auch in Lyase überexprimierenden Zellen konnten nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert werden (Abb.:37+38). Ein zum Vergleich an WT-Zellen durchgeführter TUNEL-Assay wies keinen signifikanten Unterschied zu den überprüften Enzymen auf (Tabelle3).

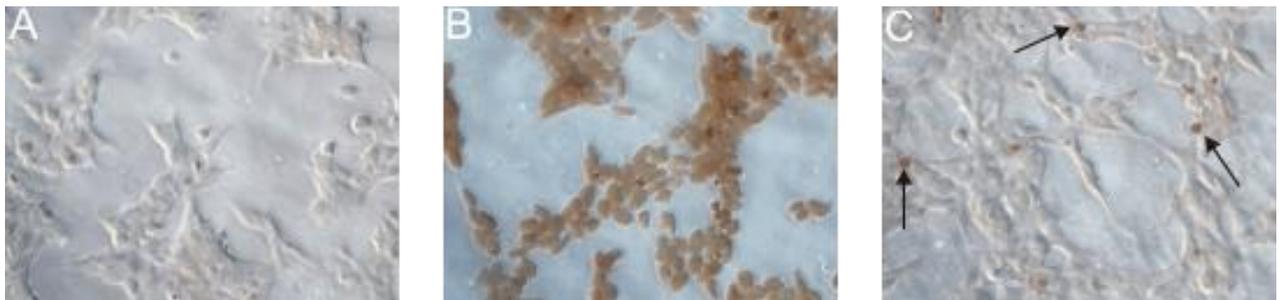


Abbildung 37: TUNEL-Assay an Kinase transfizierten HEK293 Zellen

(A) Negativ-Kontrolle ohne Zusatz der Terminal deoxynucleotidyl Transferase. (B) Die Positiv-Kontrolle wurde vor dem Einsatz der TdT für 10 Minuten mit DNase I inkubiert, um Strangbrüche zu induzieren. (C) Kinase-transfizierte HEK-Zellen. Die Pfeile markieren apoptotische Zellen. Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung.

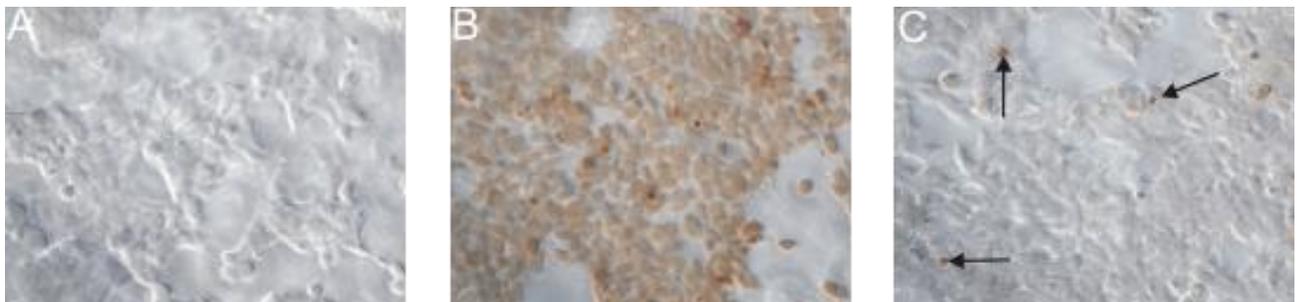


Abbildung 38: TUNEL-Assay an Lyase transfizierten HEK293 Zellen

(A) Negativ-Kontrolle ohne Zusatz der Terminal deoxynucleotidyl Transferase. (B) Die Positiv-Kontrolle wurde vor dem Einsatz der TdT für 10 Minuten mit DNase I inkubiert, um Strangbrüche zu induzieren. (C) Lyase-transfizierte HEK-Zellen. Die Pfeile markieren apoptotische Zellen. Vergrößerung: 20-fach.

Tabelle 3. Ergebnisse des TUNEL-Assays

	WT-Zellen	Kinase transfizierte Zellen	Lyase transfizierte Zellen
Apoptotische Zellen in %	2,8	3,5	3,8

3.10 Generierung einer spt-defizienten Mauslinie

Zur Inaktivierung des spt-Gens sollte die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen verwendet werden. Dafür wurde ein linearisierter Ziel-Vektor durch Elektroporation in Stammzellen eingebracht. Bei dieser Methode werden endogene Sequenzen durch homologe, aber mutierte Sequenzen ausgetauscht. Um die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination in den zu untersuchenden Klonen zu erhöhen, wurden zwei Selektionsmarker verwendet. Als positiver Selektionsmarker diente eine für das Neomycin-Phosphotransferase-Gen kodierende Sequenz (Neo-Box). Dadurch entstand eine Resistenz in den ES-Zellen gegen das Neomycin-Analogon G418, welches dem Medium zugefügt wurde.

Als negativer Selektionsmarker wurde das Thymidinkinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus verwendet (TK-Box). Dieses Gen sitzt am Rand der homologen Sequenz, so daß es nur bei heterologer Rekombination in das Genom eingebaut wird. Dadurch tritt bei Anwesenheit von Gancyclovir (GanC) ein Abbruch der Replikation ein, was zum Absterben der heterolog rekombinierten Zellen führt. Dies beruht darauf, daß die Thymidin-Kinase Guanosinanaloga wie Gancyclovir phosphoryliert. Dieses Nukleotidanalogen wird bei der DNA-Synthese eingebaut, was zum Abbruch der Replikation führt.

Zur Erstellung der spt-defizienten Mauslinie sollten sowohl die konventionelle, als auch die konditionelle Variante des Knock-outs erstellt werden. Sollte die konventionelle Variante zur embryonalen Letalität der Mäuse führen, ist es möglich, auf die konditionelle Variante zurückzugreifen. Diese bietet zudem auch die Möglichkeit, spt in den unterschiedlichen Geweben der Maus zu untersuchen.

Den Ausgangspunkt für diese Aufgabe bildeten zwei vorliegende, im Laboratorium klonierte Vektoren.

3.10.1 Konstrukte

Als Vektor für das konventionelle Konstrukt wurde der pPNT-Vektor verwendet. Der Vektor wurde so konstruiert, daß bei der homologen Rekombination des Konstruktes in den Genlocus ein großer Teil des Intron 3, das komplette Exon 4, sowie ein Teil des Intronbereiches 4 fehlen (Abb.:39). Dadurch konnte von einer Inaktivierung des Gens bei Erhalt der Knock-Out Maus ausgegangen werden.

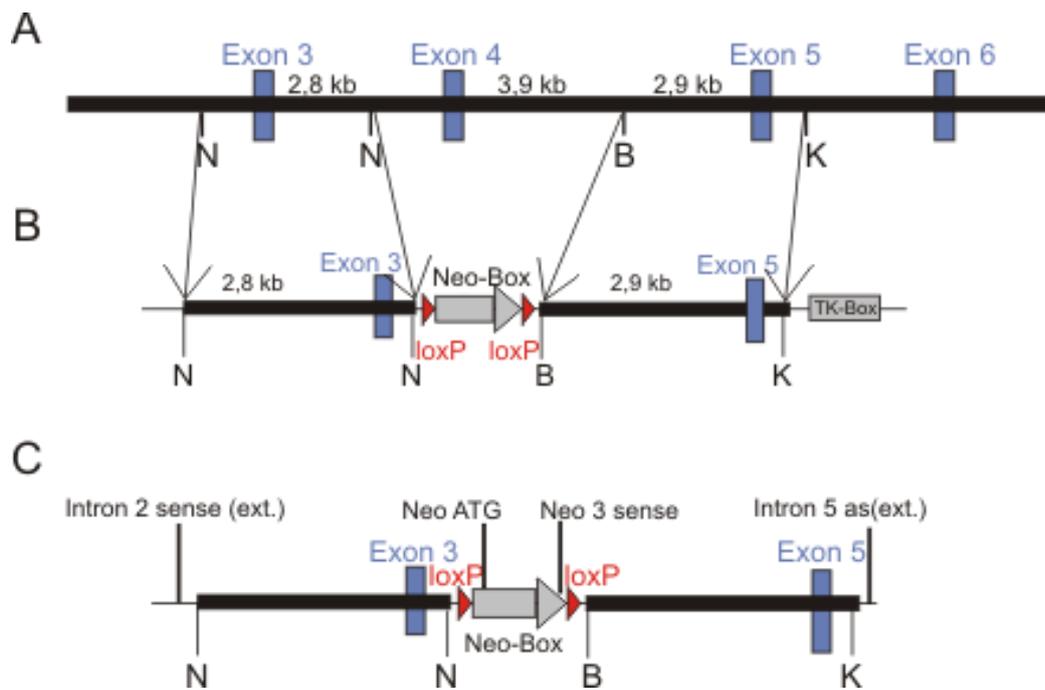


Abbildung 39: Konstrukt zur konventionellen Ausschaltung des *spt* Gens

(A) Ausschnitt aus dem wt Allel der *spt* mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen (B) Targeting Vektor pBS246 konventionell (C) Homolog rekombinierter Genlocus mit Angabe der Primer, die zum Nachweis verwendet wurden. N, Not; B, BamHI; K, KpnI

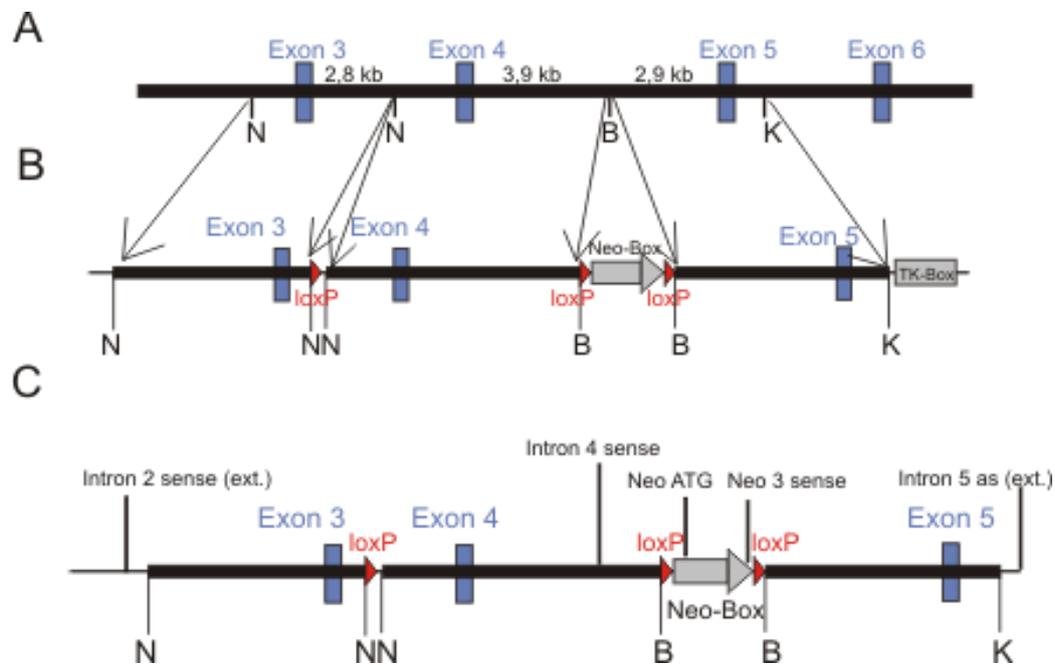


Abbildung 40: Konstrukt zur konditionellen Inaktivierung des *spt* Gens

(A) Ausschnitt aus dem wt Allel der *spt* mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen (B) Targeting Vektor pBS246 konditionell (C) Homolog rekombinierter Genlocus mit Angabe der Primer, die zum Nachweis verwendet wurden. N, Not; B, BamHI; K, KpnI

Als Vektor für das konditionelle Konstrukt, durch das die zeit- und gewebsspezifische Deletion des Gens ermöglicht wird, diente eine modifizierte Form des pBS246-Vektors. Der Vektor wurde mit drei loxP-Sites ausgestattet. Dadurch war es möglich eine Exzision der Neo-Box bereits auf ES-Zellebene vorzunehmen. Grundgedanke war eine Ausschaltung des Gens durch Deletion des Exons 4 und Teilen der Intronbereiche 3 und 4 (Abb.:40).

3.10.2 Überprüfung der Konstrukte

3.10.2.1 Southern Blot

Mittels Southern Blot-Hybridisierungstechnik wurde die Erstellung der Konstrukte überprüft. Dafür wurden die Konstrukte mit den Restriktionsendonukleasen Not I, Kpn I und Bam HI alleine oder in Kombination restringiert. Als Sonden dienten sowohl eine Neo-Box Sonde, als auch eine Exon 4 Sonde (Abb.:41). Die Hybridisierung der Neo-Box Sonde fand mit den erwarteten Restriktionsfragmenten der DNA des konventionellen und des konditionellen Konstruktes statt.

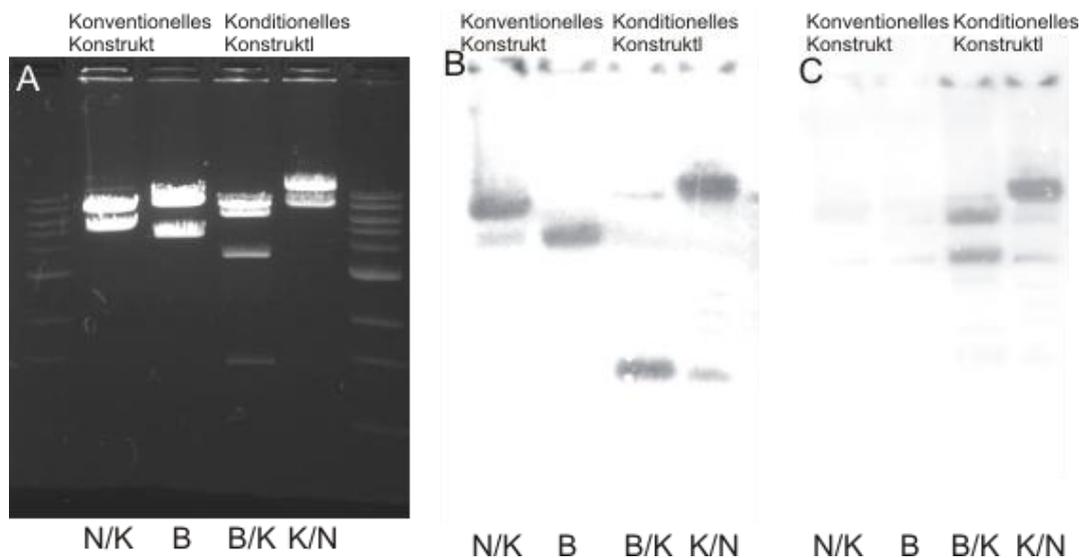


Abbildung 41: Überprüfung der Konstrukte mittels Southern Blot

(A) Restriktion des konventionellen und des konditionellen Konstrukts (B) Southern Blot Analyse mit der Neo-Box spezifischen Sonde (C) Southern Blot Analyse mit der Exon 4 spezifischen Sonde. N, Not; B, BamHI; K, KpnI

Bei der Verwendung der Exon 4 Sonde konnte beim konditionellen Konstrukt ebenfalls die Hybridisierung mit den Restriktionsfragmenten beobachtet werden, die das Exon 4 enthielten. Zudem blieb die Hybridisierung bei der DNA des konventionellen Konstruktes, wie erwartet, aus (Abb.:41).

3.10.2.2 Sequenzierung der loxP-Sequenzen

Die loxP-Sequenzen im erstellten konditionellen Konstrukt wurden sequenziert, um Mutationen und damit einen Funktionalitätsverlust der loxP-Sequenzen auszuschließen (Abb.:42).

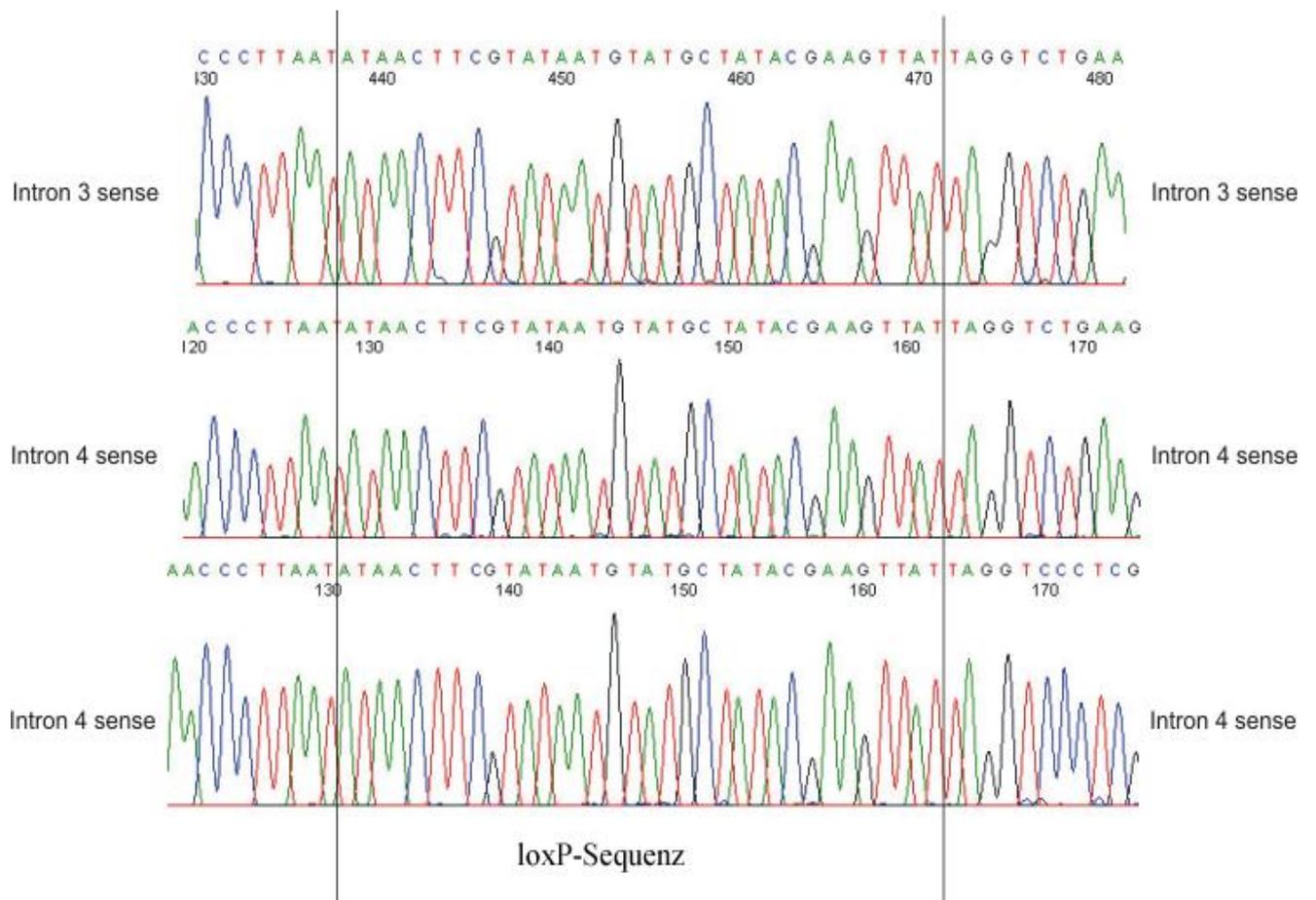


Abbildung 42: Sequenzierung der drei loxP-Sequenzen im konditionellen Konstrukt

3.10.2.3 294-Cre

Die Funktionalität der loxP-Sequenzen des konditionellen Konstruktes wurde auf bakterieller Ebene untersucht. Bei dieser Methode wird der Vektor in kompetente *E.coli* Bakterien (294 Cre-Zellen) transformiert, die die Cre-Rekombinase stabil exprimieren (Buchholz et al., 1996). Dabei ist eine Exzision des Bereiches zwischen den äußeren loxP-Sequenzen zu erwarten, da eine dauerhafte Cre Einwirkung vorliegt.

Die aus diesen speziellen *E.coli* Zellen gewonnene DNA wurde im Southern Blot mittels spezifischer Sonden auf das Vorhandensein des Exon 4 und der Neo-Box hin untersucht. Dafür wurde die isolierte DNA mit NotI linearisiert. Wie erwartet fand keine Hybridisierung der Sonden mit der isolierten DNA aller acht Klone statt (Abb.:43). Als Kontrolle wurde das mit NotI linearisierte Konstrukt mit DNA aus DH5 α Zellen verwendet. Hier wurde eine Hybridisierung mit beiden Sonden beobachtet (Abb.:43). Damit wurde die Funktionalität der äußeren loxP-Sequenzen auf bakterieller Ebene bestätigt.

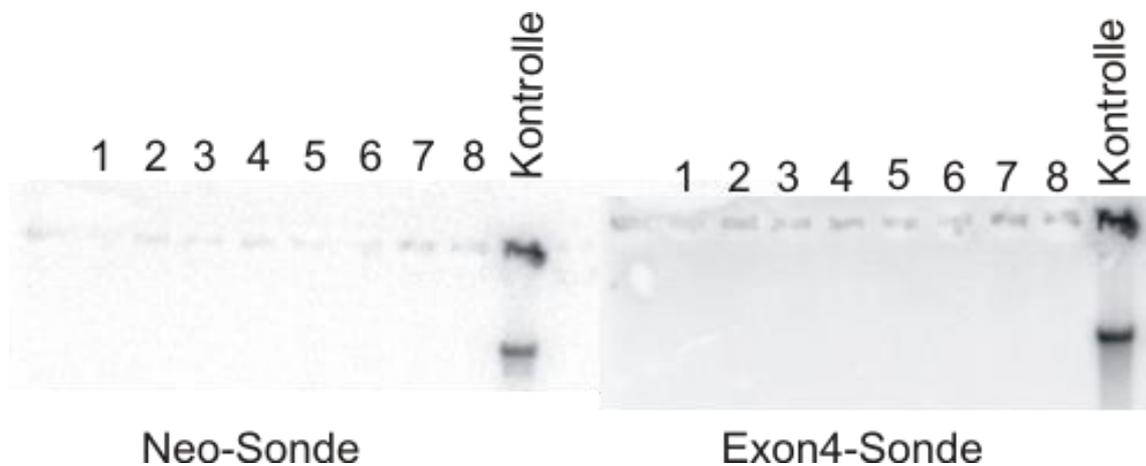


Abbildung 43: Überprüfung der Funktionalität der loxP-Sequenzen auf Bakterienebene
Southern Blot Analyse mit den spezifischen Sonden der Neo-Box und des Exons 4. 1-8 bezeichnet die linearisierte DNA aus den 294 Cre-Zellen. Als Kontrolle wurde die aus DH5 α Zellen gewonnene linearisierte DNA verwendet.

3.11 Herstellung und Analyse von ES-Zellklonen

Zur Herstellung rekombinanter ES-Zellklone wurden die ES-Zelllinien V8.1 (Eggan et al., 2001) und Bruce 4.0 (Kontgen et al., 1993) verwendet. Um zu gewährleisten, daß die ES-Zellen ihren undifferenzierten Zustand beibehalten, wurden sie auf Mitose inaktivierten embryonalen Fibroblasten kultiviert. Zudem wurde dem Medium das Cytokin LIF beigefügt. Die ES-Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert. Dafür wurden 2×10^7 Zellen mit $40 \mu\text{g}$ des durch NotI linearisierten Vektors transfiziert. Im Anschluß an die Selektion wurden die ES-Zellklone isoliert und expandiert. Ein Teil der Zellen wurde kryokonserviert, der andere auf Gelatine gesplittet, um die DNA aus den Zellen zu gewinnen.

Zum Nachweis der homologen Rekombination wurde die DNA des konventionellen Konstruktes per PCR mit den Primern Intron 2 sense (extern) und Neo ATG überprüft. Eine Bande sollte daher nur bei einer homologen Rekombination entstehen (Abb.44).

Tabelle 4: Zusammenfassung der Elektroporationsexperimente für das konventionelle Konstrukt

ES-Zelllinie	Anzahl der analysierten Klone	homolog rekombinierte Klone
V8.1	40	0
Bruce 4.0	210	1

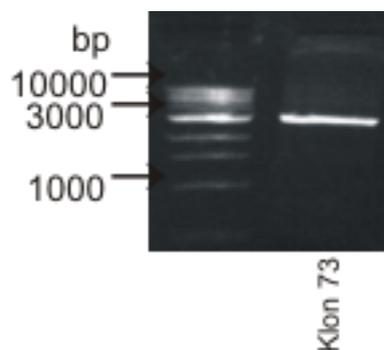


Abbildung 44: Nachweis der homologen Rekombination beim konventionellen Konstrukt
PCR Nachweis der homologen Rekombination mit der Primerpaarung Intron 2 sense und Neo ATG

Beim Nachweis der homologen Rekombination der DNA der Klone des konditionellen Konstruktes wurden die Primer Neo3' sense und Intron 5 as (extern), bzw. Intron 2 sense

(extern) und Neo ATG verwendet. Bei dieser PCR eine Bande nur dann entstehen, wenn eine homologe Rekombination stattgefunden hatte (Abb.45).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Elektroporationsexperimente für das konditionelle Konstrukt

ES-Zelllinie	Anzahl der analysierten Klone	homolog rekombinierte Klone
V8.1	286	2

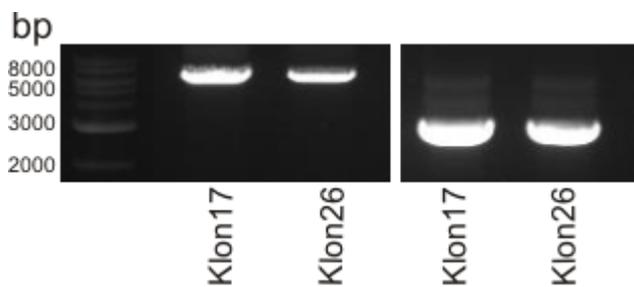


Abbildung 45: Nachweis der homologen Rekombination im konditionellen Konstrukt

(A) PCR-Nachweis der homologen Rekombination mit der Primerpaarung Intron 2 sense und Neo ATG (B) PCR-Nachweis der homologen Rekombination mit der Primerpaarung Neo 3` sense und Intron 5 as.

3.12 Charakterisierung der homolog rekombinierten ES-Zellklone

Grundvoraussetzung für den Erhalt keimbahnchimärer Tiere aus den ES-Zellen ist es, daß die Pluripotenz der Zellen aufrecht erhalten wird. Dies ist nicht immer gewährleistet, da es durch die Elektroporation, die Kultivierung, sowie das Einfrieren und Auftauen der Zellen zu chromosomalen Veränderungen kommen kann. Im Vordergrund stehen hier Mono-, und Trisomien, sowie Aneuploidien. Treten diese Veränderungen auf, kann eine Integration in die Keimbahn verhindert werden (Liu et al., 1997). Um chromosomale Veränderungen an den positiven Klonen auszuschließen, wurden sie einer Karyotypisierung unterzogen. Hierfür wurden die ES-Zellen osmotisch lysiert und die Chromosomensätze nach Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch ausgezählt (Abb.:46).

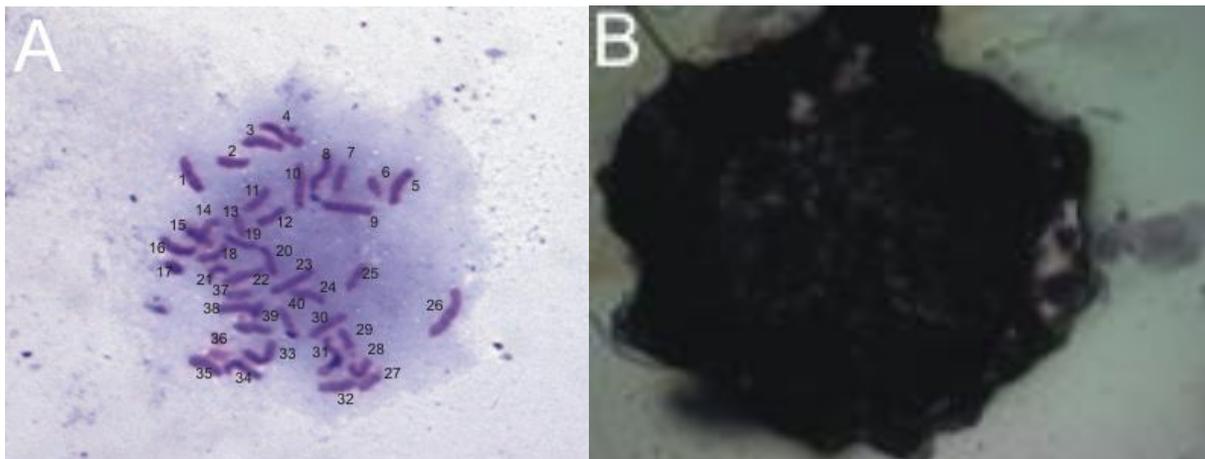


Abbildung 46: Charakterisierung der ES Zellklon anhand des Klons 26

(A) Karyogramm des Klons. Er enthält die korrekte Anzahl von 40 Chromosomen (100-fache Vergrößerung). (B) Alkalische Phosphatase Färbung (100-fache Vergrößerung).

Ein weiteres Zeichen für die Pluripotenz einer Zelle ist eine hohe alkalische Phosphataseaktivität (Pease et al., 1990). Die durchgeführte Färbung wurde lichtmikroskopisch ausgewertet und wies eine hohe alkalische Phosphataseaktivität nach.

3.13 Transiente Cre-Expression

Das konditionelle Konstrukt wurde mit drei loxP-Sequenzen erstellt. Dadurch bot sich die Möglichkeit die Neo-Box bereits auf ES-Zellebene zu entfernen. Durch die Einwirkung der Cre-Rekombinase bestanden allerdings zwei Möglichkeiten der Modifizierung der Klone. Zum einen konnte der gesamte, zwischen den äußeren loxP Sequenzen liegende, Bereich herausgeschnitten werden. Zum anderen bestand die Möglichkeit der Exzision der Neo-Box durch die sie umgebenden lox-P Sequenzen. Dabei bliebe das Exon 4 von loxP-Sequenzen flankiert und kann auf Mausebene deletiert werden. Für die Transfektion des homolog rekombinierten Zellklons wurden die Vektoren pBS 185 (Sauer, 1993) und pPGKCrebpA verwendet. Dabei ist die Cre-Expression im pBS 185 stärker, da die Cre Rekombinase in diesem Vektor unter der Kontrolle des humanen Cytomegalovirus (CMV) Promoters steht.

Nach Elektroporation der Zellen mit dem pBS185 Vektor wurden die Klone auf ihre Sensitivität gegenüber G418 überprüft. Ist diese vorhanden, kann von einer Exzision der Neo-Box ausgegangen werden. Diese Klone wurden per PCR genotypisiert. Eine Doppelbande mit den Primern Intron 4 sense (vor der Neo-Box gelegen) und Intron 5 as (extern) zeigte (Abb.:47), daß sowohl die Neo-Box, als auch das Exon 4 noch erhalten waren. Erschien jedoch nur eine einzelne Bande, konnte von der Exzision der Neo-Box ausgegangen werden (Abb.47). Zur Kontrolle wurde danach noch eine PCR mit einem Neo sense Primer durchgeführt. Ein Fehlen der Bande belegte die Exzision der Neo-Box (Abb.:47).

Bei der Analyse der Klone wurde, unabhängig von dem für die Transfektion verwendeten Vektor, immer nur eine Deletion der Neo-Box und die des gesamten Fragmentes beobachtet.

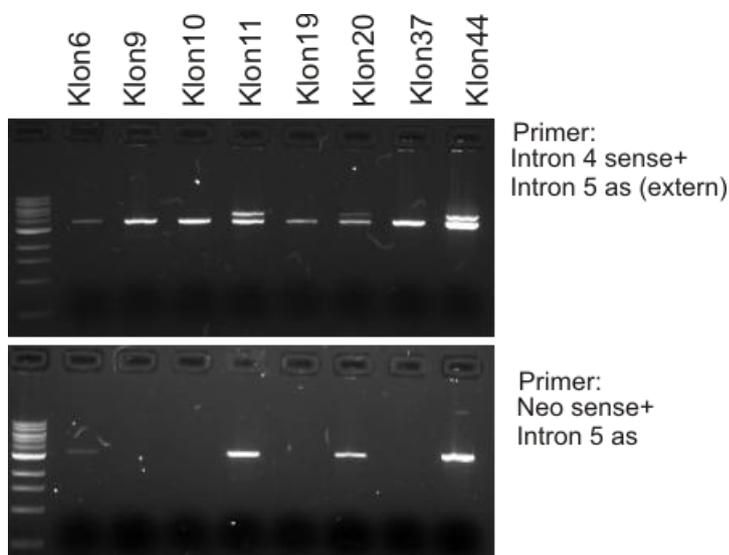


Abbildung 47: Nachweis der Deletion der loxP flankierten Bereiche

In der PCR mit dem Primerpaar Intron 4 sense + Intron 5 as wies die Doppelbande auf den unveränderten positiven Klon hin. Eine einzelne Bande deutete auf eine Neo-Exzision hin. Das Fehlen der Bande mit dem Primerpaar Neo sense und Intron 5 as zeigte die Neo-Exzision.

3.14 Blastozysteninjektion

Für die Blastozysteninjektionen wurden sowohl der Originalklon 26, als auch die modifizierten Klone ohne Neo-Box aus der transienten Cre Expression verwendet. Die Blastocysten wurden am Tag 3,5 p.c. aus C57/Bl6 Mäusen isoliert und 10-20 ES-Zellen mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur möglichst auf der inneren Zellmasse der Blastocyste abgelegt. Nach mindestens einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank wurden 6-10 Blastocysten in ein Uterushorn einer scheinchwangeren CD1 Maus (Tag 2,5 p.c.) reimplantiert. Anhand des Agouti Fellmarkers, der von den ES-Zellen weitergegeben wird, konnte der Chimaritätsgrad der Nachkommen bestimmt werden. Die Keimbahnchimarität der chimären Böcke wurde durch Rückkreuzungsversuche mit C57/Bl6 Weibchen getestet. Nur der Ausgangsklon 26 führte zu chimären Tieren. Von den sechs getesteten Böcken wiesen fünf eine Keimbahnchimarität auf.

Die genomische DNA der Nachkommen der chimären Böcke wurde aus Schwanzbiopsien gewonnen. Zur Genotypisierung wurde eine PCR mit dem Primerpaar Intron 4 sense und Intron 5 as durchgeführt (Abb.:48). Die heterozygoten Tiere wurden untereinander verpaart, so daß Wildtypen (+/+), heterozygote (+/-) und homozygote (-/-) Tiere aus den Verpaarungen hervorgingen.

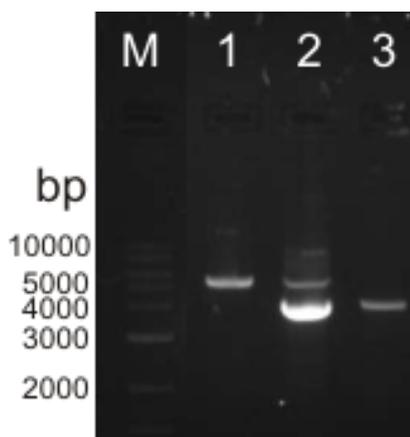


Abbildung 48: PCR zur Genotypisierung der Nachkommen der chimären Tiere

Durch PCR-Analyse wurde die Genotypisierung der Mäuse mit den Primerpaaren Intron 4 sense und Intron 5 as vorgenommen. Handelt es sich bei der Maus um ein homozygotes Tier, so erhält man wie in Lane 1 zu sehen eine Bande von 4600bp. Ist die Maus heterozygot, so tritt eine Doppelbande mit 3600+4600 bp auf. Bei einer wt-Maus erhält man eine Bande von 3600bp.

Während der Kreuzungen zum homozygoten Tier stellte sich die vordere loxP-Sequenz als nicht funktionell heraus. In der zu der Zeit bereits vorhandenen spt -/- Maus wurde der kritische Bereich sequenziert und es stellte sich heraus, daß es sich um eine unvollständige homologe Rekombination handelte, bei der die erste loxP-Sequenz nicht in das Genom der Maus integriert wurde.

3.15 Erstellung einer induzierbaren, leberspezifischen Mauslinie

Um den mit loxP Sequenzen geflochten Bereich der homozygoten spt-Maus auf Mausebene gewebs-, und zeitspezifisch zu deletieren, mußten Kreuzungen mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinien durchgeführt werden. Das Konstrukt zur Erstellung einer leberspezifischen induzierbaren Cre-Rekombinase Mauslinie sollte so konstruiert werden, daß es einen tetrazyklinabhängigen, reversen Transaktivator enthält, der unter der Kontrolle des leberspezifischen transthyretin (ttr) Promoters steht. Der klonierte Vektor ist bicistronisch, d.h., neben dem einklonierten Promoter sollten auch EGFP und Cre exprimiert werden. Eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES) erlaubt die effiziente Translation von EGFP und Cre. Die transgene Mauslinie sollte durch Mikroinjektion des linearisierten Vektors in den männlichen Vorkern einer Eizelle generiert werden. Die Integration von DNA durch Pronukleusinjektion in das Wirtsgenom geschieht immer heterolog.

Der leberspezifische Promoter wurde gewählt, da die Leber das zentrale Stoffwechselorgan des Organismus darstellt.

3.15.1 Klonierungsstrategie

Als Grundvektor für das Konstrukt zur Erstellung einer induzierbaren, leberspezifisch Cre exprimierenden Mauslinie wurde der Vektor pIRES-EGFP (Clontech) verwendet. Der Minimalpromoter wurde durch eine AseI, NheI Restriktion eliminiert, der Restvektor blunt end religiert. Daraufhin wurde der Minimalpromoter hCMV*-1, der tet-Operatoren beinhaltet, als XhoI, EcoRI Fragment aus dem pUHD10-3 Vektor gerichtet einkloniert. In den resultierenden Vektor wurde in die SalI Schnittstelle ein modifiziertes Cre Gen eingefügt, das eine nuclear leader Sequenz enthält.

Zuvor wurden der reverse Transaktivator, rtTA2^SM2 im pUHRt 62-1 Vektor, der freundlicherweise von Prof. Bujard zur Verfügung gestellt wurde, EcoRI, BamHI und β -Globin mit polyA BamHI, XhoI in den pSP73 einkloniert. Aus dem pSP73 wurden rtTA^S2M2, β -Globin und polyA EcoRV, XhoI in den pBluescript Vektor eingefügt. Der TTR-Promoter wurde gerichtet NotI, SpeI in den entstandenen Vektor einkloniert. Daraufhin wurde mit NotI restringiert und ein Xho Linker blunt end eingefügt.

Durch eine XhoI Restriktion konnte nun das gesamte Fragment, bestehend aus TTR-Promoter, reversem Transaktivator, β -Globin und polyA isoliert werden und ungerichtet in den XhoI linearisierten Vektor pCMVcreIRES2-EGFP eingefügt werden (Abb.:49). Die Richtung des Fragmentes wurde durch mehrere Restriktionen überprüft. Das zu injizierende Vorkernfragment erhielt man mittels AflII Restriktion.

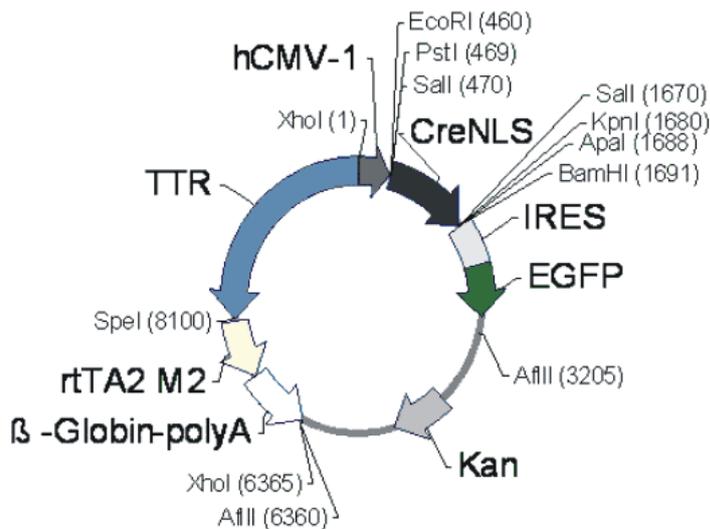


Abbildung 49: Vektor zur Erstellung der transgenen Mäuse

Die Pfeile geben die Orientierung der jeweiligen Fragmente an. Es sind nur teilweise die Restriktionsstellen angegeben.

3.15.2 Charakterisierung

Der so erstellte Vektor wurde vor der Verwendung durch verschiedene Restriktionen überprüft. Dadurch konnte die Korrektheit des Vektors nachgewiesen werden (Abb.:50).

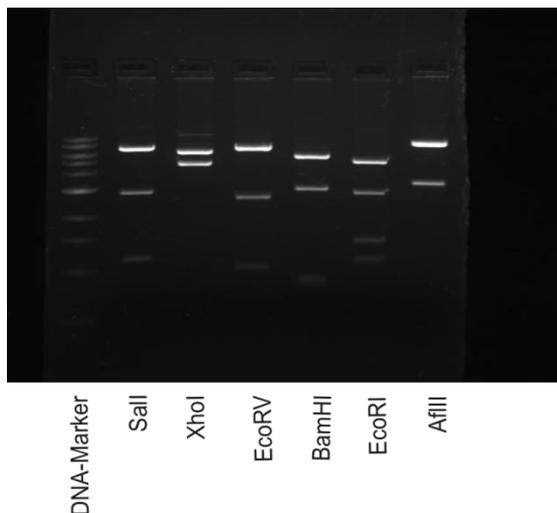


Abbildung 50: Überprüfung des Vektors zur Erstellung der induzierbaren Cre Mäuse durch Restriktion

Die Fragmente nach den verschiedenen Restriktionen ergaben die erwarteten Größen.

3.15.3 Vorkerninjektion

Mittels Injektion von Fremd-DNA in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle, kann diese heterolog in das Genom der Maus eingebaut werden. Diese ungerichtete Insertion der DNA steht im Gegensatz zur homologen Rekombination in den ES-Zellen. Die transgenen Mäuse wurden mittels Pronukleusinjektion hergestellt.

Für die Vorkerninjektion wurde das AflII Fragment isoliert, gereinigt und in einer Konzentration von 1-2 ng/μl in die männlichen Vorkerne injiziert. Auf diese Weise wurden zwei transgene Nachkommen generiert (Tab.:6). Von diesen transgenen Nachkommen wurde durch Verpaarung mit CD1 Mäusen eine transgene Linie erstellt.

Tabelle 6: Übersicht über die Vorkerninjektionsexperimente zur Erstellung der induzierbaren Mauslinie

Anzahl der reimplantierten Eier	Anzahl der Spender	Anzahl der Foster	Anzahl der transgenen Nachkommen
525	47	21	2

3.15.4 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die transgenen Mäuse der leberspezifischen, induzierbaren Cre Mauslinie wurden mittels PCR genotypisiert. Dafür wurden verschiedene Primerkombinationen verwendet. Nachgewiesen wurden das Cre- und das EGFP-Gen. Waren diese PCRs positiv, wurde eine abschließende PCR durchgeführt. Bei dieser wurde ein Primerpaar verwendet, durch das ein Fragment vom reversen Transaktivator bis zum Cre-Gen erfaßt wurde. Bei dieser PCR wurde die Vollständigkeit des Vektors im Genom der Maus bestätigt. Dies war nicht immer zwingend der Fall, auch wenn sowohl EGFP, als auch Cre nachgewiesen werden konnten (Abb. 51). Alle im Folgenden verwendeten Mäuse wiesen einen vollständigen Einbau des verwendeten Konstrukts auf.

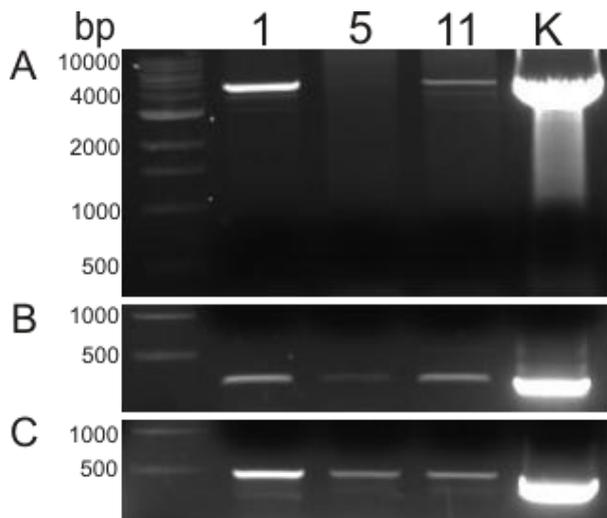


Abbildung 51: Nachweis der Transgenität der Mäuse

Mittels PCR wurde der Einbau des Vektors in das Genom der Mäuse nachgewiesen, hier am Beispiel der Mäuse 1, 5 und 11. K steht für Kontrolle (Ausgangsvektor). **(A)** PCR-Analyse mit der Primerkombination rTta2s as und Cre as. **(B)** PCR-Analyse mit der Primerkombination Cre sense und Cre as. **(C)** PCR-Analyse mit der Primerkombination EGFP sense und EGFP as.

3.15.5 Analyse der transgenen Mäuse

Zur weiteren Analyse der induzierbaren Cre-Mäuse wurde die Kopienzahl des TTR-Promoters der transgenen Tiere im Vergleich zu WT Mäusen bestimmt. Dafür wurde mit der aus der Schwanzbiopsie gewonnenen, genomischen DNA eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Als Primerpaar wurden Primer für den TTR-Promoter verwendet (Abb.:52).

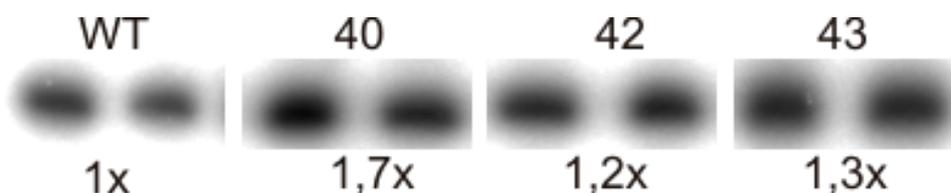


Abbildung 52: Bestimmung der Kopienzahl des TTR-Promoters in den transgenen Tieren

Es wurde mittels quantitativer RT-PCR die Kopienzahl des TTR-Promoters der transgenen Tiere in Bezug auf den WT bestimmt. In dieser Abbildung am Beispiel der Mäuse 40, 42 und 43.

3.15.6 Induktion von Cre

In den transgenen Mäusen sollte durch Doxycyclingabe die Expression von Cre induziert werden. Hierzu wurden die Tiere über 5 Tage mit doxycyclinhaltigem Wasser versorgt. Anschließend wurde die Leber isoliert und das entstandene Cre-Protein mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen (Abb.: 53).

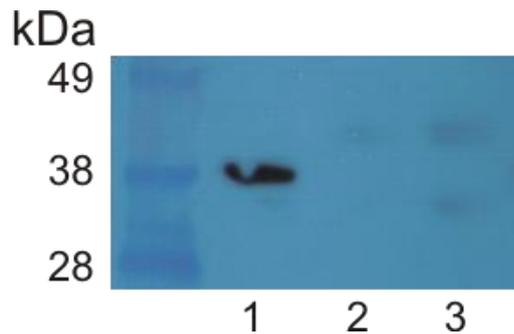


Abbildung 53: Western Blot Analyse der induzierbaren, leberspezifischen Mäuse

Es wurde der Leberextrakt nach Induktion (2) und ohne Induktion (3) mit Doxycyclin verwendet. Als Positiv-Kontrolle (1) diente der Hirnextrakt einer induzierten mbp-Cre Maus.

Es wurde keine Cre Aktivität in den transgenen Tieren mit oder ohne Cre Induktion festgestellt.

3.16 Erstellung eines neuen Konstruktes zur Generierung eines konditionellen Knock-out

Als Grundlage für das neue Konstrukt zur konditionalen Genausschaltung diente der Rapidflirt Vektor (A. Bruehl und A. Waisman, unveröffentlicht). Dieser ist mit loxP-Sequenzen, die den zu deletierenden Bereich des Gens flankieren, ausgestattet. Darüberhinaus verfügt der Vektor über frt-Sequenzen, die die Neo-Box umgeben. Es besteht somit die Möglichkeit auf ES-Zellebene durch Einwirkung der Flipase die Neo-Box zu deletieren. Auf Mausebene folgt daraufhin die Deletion des durch die loxP-Sequenzen umgebenen Bereiches durch Kreuzungen mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase exprimieren. Dadurch ist eine zeit-, und gewebsspezifische Deletion des Gens gegeben. Desweiteren kann eine transiente Cre-Expression die embryonalen Stammzellen so modifizieren, daß sich ein konventioneller ES-Zellklon ergibt. Wirkt die Ausschaltung des Gens nicht letal, so ist dies eine Möglichkeit, diesen Geno- und Phänotyp der Maus zeitnah zu untersuchen.

3.16.1 Klonierungsstrategie

Zur Inaktivierung des Gens sollten das Exon 8, sowie dessen umliegenden Intronbereiche, deletiert werden. Im Exon 8 befindet sich die Pyridoxal-5-Phosphat Bindungsstelle. Wird das Exon 8 entfernt, ist die katalytisch wichtige Aminosäure Lysin 377 deletiert. Daraus resultiert eine vollständige Inaktivierung des Reaktionsmechanismus der spt.

Die Primer zur Gewinnung der drei Fragmente, wurden so konstruiert, daß das erste Fragment durch BamHI-Restriktionsstellen flankiert wurde. Der sense Primer des zweiten Fragments enthielt eine Sall-, der antisense Primer eine SbfI-Schnittstelle, die Primer des dritten Fragmentes je eine XhoI-Schnittstelle.

Das TK-Gen wurde durch eine folgende Klonierung in den pPNT-Vektor eingebracht. Der neo-Selektionsmarker wurde aus dem Rapidflirt-Vektor übernommen (Abb.:54).

Die Konstruktion des targeting Vektors erfolgte in folgenden Schritten:

- 1.: Amplifikation der drei Fragmente durch PCR und darauffolgende Klonierung in den pCR2.1-Vektor.
- 2.: Exzision des Fragments 1 durch BamHI Restriktion und Insertion in den Rapidflirt-Vektor.

- 3.: Exzision des 2. Fragmentes durch SbfI und SalI Restriktion, sowie anschließender Ligation in den Rapidflirt-Vektor.
- 4.: pRapidflirt NotI und XhoI restringieren und gerichtet in den pBlueskript insertieren.
- 5.: Das dritte Fragment XhoI aus dem PCR2.1 Vektor ausschneiden, gefolgt von einer Insertion in den pFlirt/pBlueskript.
- 6.: Exzision des NotI/KpnI Fragmentes und gerichtete Klonierung in den pPNT-Vektor.

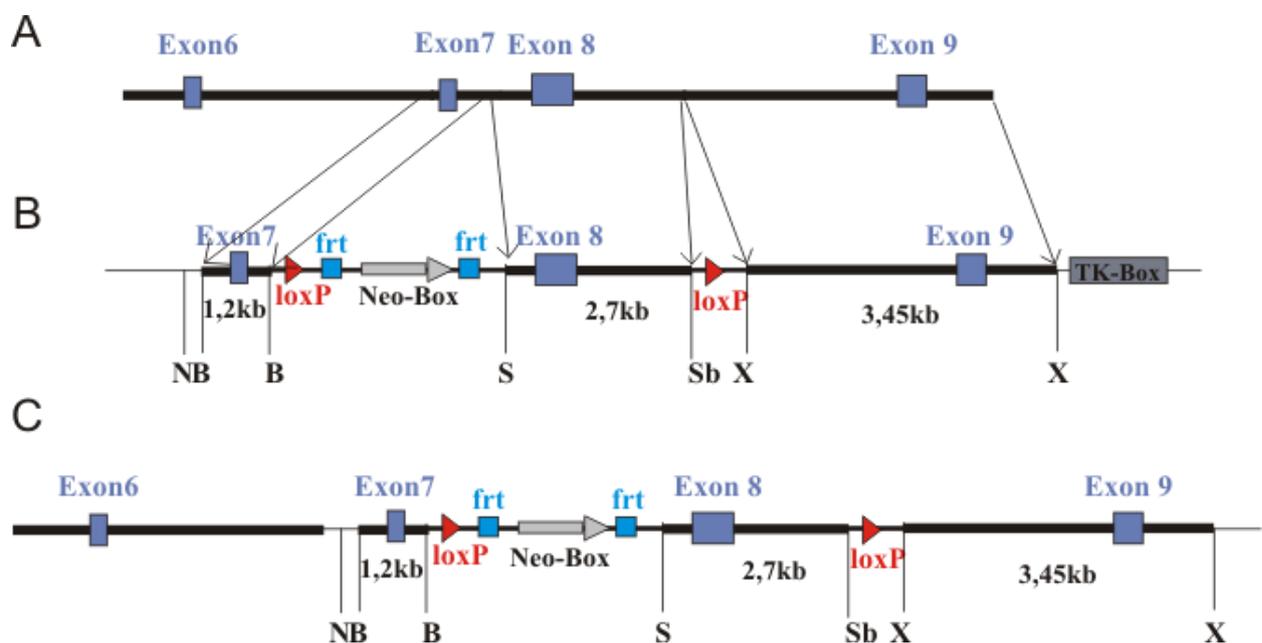


Abbildung 54 :Konstrukterstellung gene targeting des spt Locus

(A) Ausschnitt aus dem spt Locus (B) Targeting Vektor Rapidflirt mit eingefügten spt Fragmenten und den verwendeten Restriktionsschnittstellen (C) Homolog rekombinierter Genlocus. N, Not; B, BamHI; S, SalI; Sb, SbfI; X, XhoI

3.16.2 Überprüfung des erstellten Konstruktes

Die Funktionalität der loxP- und frt-Sequenzen im erstellten Konstrukt wurden in 294 Cre-, und 294 Flp-Zellen getestet. Dabei exprimieren die 294 Cre-Zellen die Cre-Rekombinase stabil. Das Fragment zwischen den loxP-Sequenzen wurde deletiert. Die 294 Flp-Zellen exprimieren die Flipase stabil, was zu einer Exzision der Neo-Box führte. Als Kontrolle wurde der mit NotI linearisierte Vektor aus DH5 α -Zellen verwendet.

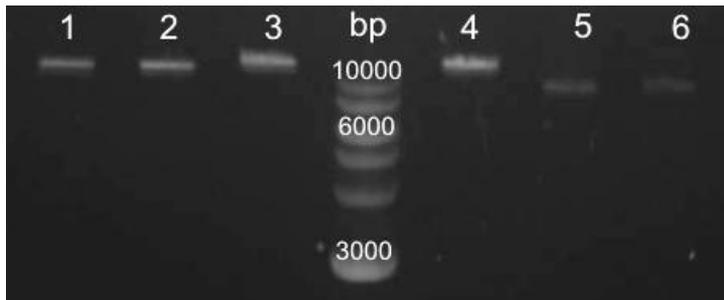


Abbildung 55: Überprüfung der Funktionalität der loxP-Sequenzen, sowie der frt-Sequenzen auf Bakterienebene

Nach Transformation des Vektors in 294 Cre-, bzw. 294 Flp-Zellen wurde die DNA isoliert und mit Not I linearisiert. 1+2 bezeichnet die linearisierte DNA aus den 294 Flp-Zellen, 3+4 bezeichnen die zur Kontrolle verwendete aus DH5 α Zellen gewonnene linearisierte DNA und 5+6 ist die linearisierte aus den 294 Cre-Zellen gewonnene DNA.

Nach der Linearisierung der isolierten DNA mit NotI wurde der Größenunterschied des Ausgangskonstruktes im Vergleich zum Flp- und Cre- rekombinierten Plasmid deutlich (Abb.: 55). In beiden Fällen ist eine deutliche Reduktion der Größe des Vektors zu beobachten, wobei sich diese bei den 294 Flp-Zellen um die Größe der Neo-Box, bei den 294 Cre-Zellen um die Größe der Neo-Box, sowie des Exon 8 mit umliegendem Intronbereich verringert hat. Daher wurde sowohl die Funktionalität der loxP-Sequenzen, als auch die der frt-Sequenzen nachgewiesen.

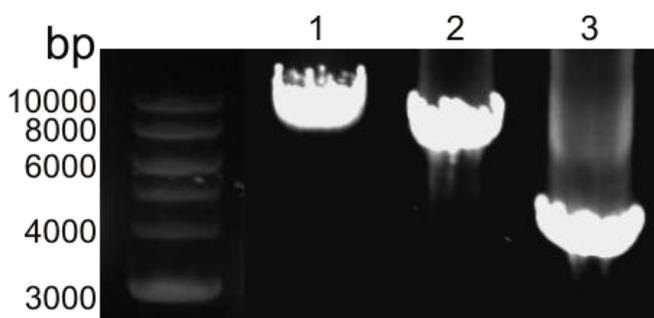


Abbildung 56: PCR-Analyse der durch 294Cre-, und 294Flp-Zellen gewonnenen Plasmide mit dem Primerpaar Intron 6 sense und Exon 9 as

1: Originalkonstrukt, 2: Plasmid aus 294 Flp-Zellen, 3: Plasmid aus 294 Cre-Zellen

Durch eine anschließende PCR-Analyse mit den Primern Intron 6 sense und Exon 9 as wurden diese Ergebnisse bestätigt (Abb.:56) und die Funktionalität der loxP-, sowie der frt-Sequenzen nachgewiesen.

3.17 Expression der sptlc3 in der Maus

Hornemann (Hornemann et al., 2006) verglich die Quantität der Expressionen von sptlc2 und sptlc3 in verschiedenen Geweben des Menschen. In 15 von 24 getesteten menschlichen cDNAs wurde sptlc3 stärker exprimiert als sptlc2. Hohe Expressionen von sptlc3 wurden dabei vor allem im Herz, der Leber, der Niere, dem Uterus und der Haut beobachtet. Darüberhinaus war durch silencing von sptlc3 in unterschiedlichen Zelllinien die spt Aktivität herabgesetzt (Hornemann et al., 2006). Daher scheint das sptlc3 Gen eine entscheidende Rolle im spt Komplex zu spielen (Hornemann et al., 2007).

Da nicht abschließend geklärt ist, ob durch sptlc3 eine verringerte bzw. nicht vorhandene sptlc2 Aktivität ausgeglichen werden kann, wurden die Expressionsraten von sptlc2 und sptlc3 in der Maus vergleichend zu denen vom Menschen betrachtet.

Für die Überprüfung der Expressionsstärken wurden das Hirn, die Leber, die Haut und das Herz einer WT-Maus auf die Expression der beiden Gene hin untersucht. Dabei wurden für sptlc2 und sptlc3 spezifische Primer verwendet.

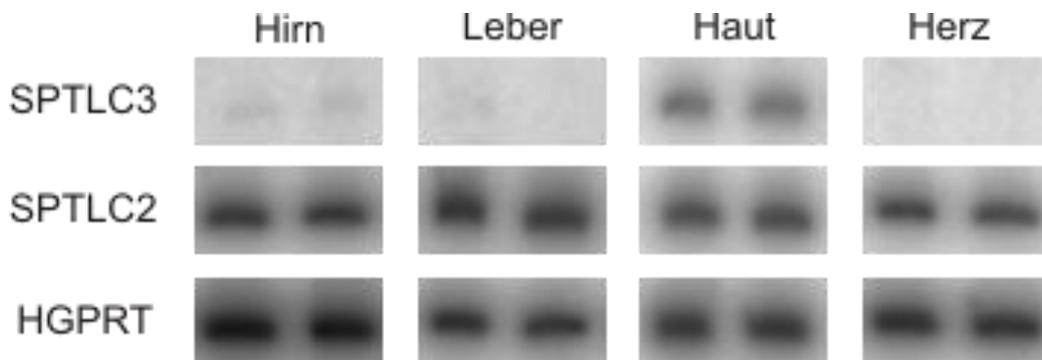


Abbildung 57: RT-PCR zur Ermittlung der Expression von sptlc2 und sptlc3 in unterschiedlichen Geweben der WT-Maus

Quantitativer Vergleich der Expressionsstärke von sptlc2 und sptlc3 in den unterschiedlichen Organen einer WT-Maus. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bemerkenswert ist, daß in der Maus in allen vier untersuchten Organen sptlc2 im Vergleich zu sptlc3 stärker exprimiert wurde (Abb.:57). Zudem wurde in der Leber und im Herz keine sptlc3 Expression nachgewiesen. Im Vergleich dazu ist die sptlc3 Expression in der menschlichen Leber 6-fach höher als die sptlc2 Expression, im Herzen liegt sie sogar 18-fach über der von sptlc2 (Hornemann et al., 2006).

Im Gehirn der Maus wurde eine sehr schwache sptlc3 Expression detektiert, allerdings ist auch im Menschen die sptlc3 Expression im Gehirn geringer als die sptlc2 Expression. In der Haut der Maus ist eine deutliche sptlc3 Expression nachweisbar. In der Haut des Menschen liegt die Expression von sptlc3 jedoch um das 15-fache über der von sptlc2 (Hornemann et al., 2006).

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (spt) mit Hilfe von Enzymexpressionsstudien charakterisiert, und die Grundlage zur Erstellung einer induzierbaren konditionellen spt defizienten Maus geschaffen. Darüber hinaus wurden die Sphingosinkinase und die Sphingosin-1-phosphat Lyase als katabolische Enzyme des Sphingolipidmetabolismus in Enzymexpressionsstudien vergleichend zur Serin Palmitoyl-CoA-Transferase betrachtet.

Untersuchungen der gewebsspezifischen Verteilung der spt ergaben, daß die stärkste Expression in Darm und Niere der Maus, die schwächste in Herz und Gehirn erfolgt.

Es wurde gezeigt, daß eine 17-fache Transkription der spt nicht zu Proteinmengen führte, die dem Niveau der Transkription entsprachen, sondern auf WT-Ebene lagen. Desweiteren wurde mit Hilfe eines *in vivo*-Assay mit [1-¹⁴C]-Palmitinsäure eine Veränderung im Lipidstoffwechsel des transfizierten Klons festgestellt. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde eine Erhöhung des Glucocerebrosids im transfizierten Klon nachgewiesen.

Ferner wurde untersucht, ob sich die Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus bei der Überexpression von spt im Vergleich zu den WT-Zellen ändert. Der einzige Unterschied lag in der Abnahme des longevity assurance homologue gene (lass) 2. Darüber hinaus konnte kein Unterschied der spt-Expression in verschiedenen Organen von Sphingomyelinase-defizienten Mäusen festgestellt werden.

Bei der Inkubation der spt-überexprimierenden Zellen mit Monoensäuren wurde weder eine Verwendung dieser Säuren als Substrate der SPT noch ein Einbau in die Ceramid Komponente der Sphingolipide beobachtet.

Durch verschiedene Apoptose-Assays wurde nachgewiesen, daß durch die Überexpression von spt keine Apoptose induziert wurde.

Bei der Betrachtung der katabolischen Enzyme ergab sich beim Expressionsvergleich der Gene des Sphingolipidmetabolismus in den Expressionsmodellen der Sphingosinkinase und der Sphingosin-1-phosphat Lyase, daß sich nur in Lyase transfizierten Zellen die Expression von lass 2 und lass 6 verringerte. Bei den die Kinase exprimierenden Zellen wurde kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt.

In den Sphingomyelinase defizienten Mausmodellen wurde keine Veränderung der Expression der Sphingosinkinase detektiert. Die Lyase wurde jedoch vermindert exprimiert in der Leber der SMPD2/3 $-/-$ Maus, sowie mit erhöhter Expression im Gehirn der aSMase $-/-$ Maus im Vergleich zur WT-Maus gefunden.

Eine apoptotische Wirkung der Überexpression der Sphingosinkinase, sowie der Sphingosin-1-phosphat-Lyase wurde durch die in dieser Arbeit mit Hilfe eines TUNEL-Assay erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen.

Für die konventionelle *spt* Genausschaltung wurde ein replacement Vektor verwendet, der durch das Fehlen des Exon 4, sowie Teilen des Intronbereiches um das Exon, zu einer Deletion von *spt* führen sollte. Durch Elektroporation wurde ein homolog rekombinierter ES-Zellklon identifiziert.

Um die konditionelle *spt* defiziente Maus zu erstellen, wurde ein replacement Vektor verwendet, der drei loxP Sequenzen beinhaltet. Durch Transformation in Cre-exprimierende *E. coli* Zellen wurde die Funktionalität der loxP-Sequenzen auf Bakterienebene sowie durch Sequenzierung die Nukleotidsequenz der loxP-Sequenzen bestätigt. Durch Elektroporation wurden zwei homolog rekombinierte ES-Zellklone generiert. Die Pluripotenz der Klone wurde mit Hilfe von alkalischer Phosphatase Färbung und eines Karyogramms nachgewiesen. Mittels transienter Cre-Expression stellte sich heraus, daß die vordere loxP-Sequenz nicht funktionell war. Eine anschließende Sequenzierung zeigte, daß es sich um eine unvollständige homologe Rekombination handelte.

Es wurde ein weiteres konditionelles Konstrukt erstellt, bei dem neben zwei loxP-Sequenzen auch zwei *frt*-Sequenzen vorhanden sind. Nach Transformation in Cre-, bzw. FLP-exprimierende *E. coli* Zellen, wurde deren Funktionalität auf Bakterienebene festgestellt.

Um die zeit-, und gewebsspezifische Ausschaltung von *spt* zu gewährleisten, wurde ein Konstrukt zur Generierung einer induzierbaren Mauslinie erstellt. Mittels Doxycyclingabe sollte eine leberspezifische Cre-Expression erreicht werden. Nach Überprüfung des Konstruktes wurde dieses mittels Pronukleusinjektion in das Genom der Maus gebracht. Die auf diesem Weg erhaltenen Mäuse wurden auf Vollständigkeit des Konstruktes überprüft und die Cre-Induktion durch Doxycyclingabe getestet. Die bisher gewonnenen transgenen Tiere zeigten jedoch keine Cre-Expression.

Eine Überprüfung der Expressionsstärke von *sptlc3* ergab, daß diese weit unter der im Menschen gefundenen liegt. Zudem wurde herausgefunden, daß die *sptlc3*-Expression in der Maus teilweise gar nicht nachweisbar ist.

5. Diskussion

Enzymexpressionsstudien

I. *In vitro* Studien zum Sphingosinstoffwechsel

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Serin Palmitoyl-CoA Transferase charakterisiert und eine Knock-Out Maus erstellt werden. Zu Beginn der Arbeit waren zwei Untereinheiten (sptlc1 und sptlc2) des spt Komplexes bekannt, wobei sptlc2 die Bindungsstelle des von spt benötigten Coenzym Pyridoxal-5-Phosphat trägt und daher die katalytische Untereinheit darstellt (Hanada et al., 2000). Aus früheren Untersuchungen in diesem Institut ging hervor, daß sptlc1 keine Aktivierung der sptlc2 ausübte. Seine Funktion für die sptlc2 Katalyse ist ungeklärt. Daher bildete sptlc2 den Schwerpunkt dieser Arbeit.

Für die Charakterisierung mit Hilfe von Expressionsstudien des Enzyms wurden geeignete Modelle entwickelt, um die möglichen Auswirkungen der sptlc2 zu untersuchen. Als heterologes Expressionssystem wurden HEK293 Zellen verwendet.

Lokalisation und gewebsspezifische spt-Expression in der Maus

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an mit spt transfizierten HEK293 Zellen zeigten eine korrekte intrazelluläre Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (Abb.11) (Mandon et al., 1992). Eine Lokalisation im Golgi-Apparat konnte nicht komplett ausgeschlossen werden.

Die quantitative RT-PCR zeigte eine ubiquitäre Verteilung von sptlc2 in den untersuchten Geweben (Abb.12) mit der stärksten Expression im Darm, in der Niere und Lunge, der schwächsten im Herz und Gehirn. Diese Expressionsverteilung entspricht weitgehendst der spt-Aktivität, die in den Mikrosomen verschiedener Rattengewebe bestimmt wurde (Merrill et al., 1985).

Expressionsunterschied zwischen der Transkriptions-, und der Translationsebene

Durch stabile Transfektion von HEK293 Zellen mit *sptlc2*, wurde eine Expression von *spt* erzielt, die auf Transkriptionsebene 17-fach über der der Wildtypexpression lag (Abb.8). Die Western Blot-Analysen zeigten jedoch keine entsprechende Expressionserhöhung auf Translationsebene an. Überraschenderweise entsprach sie der des WT (Abb.9). Aufgrund der Diskrepanz der Expression auf Transkriptions- und Translationsebene kann der Schluß gezogen werden, daß bei SPTLC2 eine Regulation der Proteinsynthese stattfindet. Dies könnte zum einen durch eine Inhibition der Proteinsynthese durch eine feedback Regulation, oder aber durch einen raschen Abbau des synthetisierten Proteins geschehen.

Untersuchungen zu Veränderungen des Lipidstoffwechsels im *spt*-Klon

Das Dihydrosphingosin (DHSPH) in den *spt* transfizierten HEK293 Zellen wurde mittels eines *in vitro*-Assays mit [U - ^{14}C]-Serin (Abb.13), sowie eines *in vivo*-Assays mit [1 - ^{14}C]-Palmitinsäure nachgewiesen (Abb.14A). In beiden Fällen wurde eine im Vergleich zu den HEK293 Wildtypzellen 2-3fach höhere Expression an gebildetem DHSPH gemessen. Dies bestätigt die bereits beobachtete niedrige Expression auf Translationsebene. Hohe Spiegel an freiem DHSPH wirken sich toxisch auf die Zelle aus, was ebenfalls die relativ niedrige DHSPH-Menge erklärt (Hannun & Bell, 1989).

Neben der Quantifizierung des DHSPH, diente der *in vivo*-Assay mit [1 - ^{14}C]-Palmitinsäure zur Feststellung von Veränderungen im Lipidstoffwechsel des transfizierten Zellklons. Die einzig erkennbare Veränderung in der Lipidzusammensetzung war, daß Glucocerebrosid beim *spt*-Klon im Vergleich zu den WT-Zellen deutlich erhöht war (Abb.15A), nicht hingegen die Ceramid-, und Sphingomyelin-Konzentrationen. Gebildetes Ceramid wird offenbar schnell weiter zu Cerebrosiden metabolisiert, wie die Erhöhung des Glucocerebrosids im *spt* Klon beweist. Die Bildung von Sphingomyelin scheint unabhängig von der Zunahme des Ceramids zu sein, da der Sphingomyelinspiegel nicht ansteigt. Hojjati und Mitarbeiter (Hojjati et al., 2005) beschreiben ebenfalls eine Unabhängigkeit des Sphingomyelins bei der Untersuchung der Plasmakonzentration in einer konventionellen *sptlc2* +/- Maus. Im Vergleich zur WT-Maus wurde eine Reduktion verschiedener Sphingolipide, nicht aber des Sphingomyelins festgestellt. Die Änderung des Glucocerebrosids im Lipidstoffwechsel hatte keine Auswirkung auf die Morphologie der Zelle.

Untersuchung zur Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus im spt-Klon

Um eine mögliche Interaktion von spt mit anderen Genen des Sphingolipidmetabolismus zu überprüfen, wurde die Expression sowohl von Genen des Anabolismus als auch des Katabolismus in spt transfizierten Zellen und den wt-Zellen vergleichend untersucht. verwendet. Der einzige Unterschied in der Genexpression zwischen heterolog exprimierenden Zellen und WT-Zellen wurde bei den longevity assurance homologue genes (lass) festgestellt (Abb.16 und Tabelle7). Die Expression des lass 2 Gen war im spt transfizierten Zellklon im Vergleich zum WT auf die Hälfte reduziert, alle anderen lass-Gene unterschieden sich nicht signifikant.

Tabelle 7: Übersicht über die Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus

	x-fache Genexpression:					
	Lyase	saure Ceramidase	lass 1	lass 2	lass 5	lass 6
WT HEK293-Zellen	1,1	0,76	0,16	1,15	0,25	1,1
spt-transfizierte HEK293-Zellen	0,9	0,58	0,16	0,63	0,33	1,15

Die lass-Gene kodieren Ceramidsynthasen. Dabei besitzen die verschiedenen lass-Gene Spezifitäten für die unterschiedlichen Kettenlängen der Fettsäuren (Mizutani et al., 2005). So bevorzugen lass 1+3-Gene bei der Ceramidsynthese die Fettsäurenkettenlänge C_{18:0}, die lass 2+4-Gene eine Fettsäurenkettenlänge von C_{22:0} und C_{24:0}, (Mizutani et al., 2006) und die lass 5+6-Gene eine Fettsäurenkettenlänge von C_{16:0}.

In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Sphingolipide in HEK293 Zellen vor allem aus mit langkettigen Fettsäuren C_{24:0} und C_{24:1}, und kurzkettigen Fettsäuren wie C_{16:0} substituierten Ceramiden bestehen (Riebeling et al., 2003, Venkataraman et al., 2002). Aus diesen Untersuchungen erklärt sich, daß lass 1+3 mit der Präferenz zu C_{18:0} nicht von den Veränderungen betroffen sind. Zudem wird lass 3 in der Maus nur testisspezifisch exprimiert. Lass 4 wurde trotz der Tendenz zu C_{22:0} und C_{24:0} Fettsäuren in einigen Studien ein Vorzug eher mittelkettiger Fettsäuren zugeschrieben (Riebeling et al., 2003).

Zudem wurde gezeigt, daß zumindest in der Maus nicht in allen Organen jedes lass-Gen exprimiert wird (Mizutani et al., 2005). So werden in der Niere der Maus nur lass 2, lass 5 und lass 6 exprimiert.

Über die Verteilung der Expression der unterschiedlichen lass-Gene in den Organen im Menschen ist wenig bekannt, jedoch kann auch hier von einer Organspezifität bei den verschiedenen Genen ausgegangen werden. Dies würde erklären, warum weder bei lass3, noch bei lass 4 eine messbare Expression zu finden war. Die in den Sphingolipiden der HEK293 Zellen vorwiegend gefundenen C_{16:0} und C_{24:0} Fettsäuren, sowie die vermutlich gewebsspezifische Expression der lass-Gene könnten erklären, daß nur lass 2 im überexprimierenden spt-Klon eine veränderte Expression zeigt. Die durch die erhöhte spt-Aktivität neu gebildeten Sphingosine und Ceramide akkumulieren wie vorher gezeigt nicht (Abb.15A). Mit kurzer Lebensdauer treten sie in der *de novo* Synthese auf. Das Ceramid wird überwiegend zur Glucocerebrosid Synthese verwendet. Offenbar wird die Acyltransferase lass 2 entweder direkt durch spt, oder durch das gebildete Ceramid durch Produkthemmung reprimiert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Regulation der Gene des Sphingolipidstoffwechsels in der heterologen Expression als eine Anpassung an die erhöhte spt-Expression vorliegt.

Expression von spt in Sphingomyelinase defizienten Mäusen

Zusätzlich zur Überprüfung der Expressionsänderung verschiedener Gene des Sphingolipidmetabolismus im spt überexprimierenden Klon wurde untersucht, ob sich die Expression von spt in Sphingomyelinase defizienten Mäusen zu der in WT Mäusen unterscheidet. Es wurde die spt-Expression im Gehirn, der Leber und der Milz untersucht. Der Anstieg des Sphingomyelins bewirkt in den Sphingomyelinase defizienten Mäusen keinen signifikanten Expressionsunterschied von spt im Gehirn, der Leber und der Milz (Abb.17). Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für eine Unabhängigkeit zwischen der Sphingomyelinase und spt, wie sie auch schon im Lipidstoffwechsel des spt überexprimierenden Klons und in anderen Untersuchungen (Hojjati et al., 2005) zu beobachten war.

Substratspezifität von spt

Die Substratspezifität von spt bezüglich der Fettsäuren wurde mit Hilfe von Monoensäuren verschiedener Kettenlängen überprüft. Nachdem der spt überexprimierende Zellklon einem 24-stündigen Serumentzug ausgesetzt war, wurden dem Medium Monoensäuren verschiedener Kettenlänge zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die aus den Zellen isolierten Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt. Es ergab sich im Vergleich zu den Kontroll-Zellen keinerlei Änderung in der Fettsäurezusammensetzung (Abb.18+19). Dies bestätigt frühere Untersuchungen, die besagen, daß die spt gesättigte Fettsäuren den ungesättigten vorzieht (Hanada et al., 2000, Merrill, 1983, Williams et al., 1984).

Apoptoseuntersuchungen

Ein großes Interesse gilt der erhöhten intrazelluläre Konzentration an Ceramid bei durch extrazelluläre Signale induzierter Apoptose (Gulbins et al., 1993, Mathias et al., 1998). In einigen Veröffentlichungen wird nun die Rolle der spt in der Apoptose darauf festgelegt, daß die *de novo* Ceramidsynthese die Folge einer spt Aktivierung ist (Herget et al., 2000, Holleran et al., 1995, Perry, 1999, Shimabukuro et al., 1998).

Um zu klären, ob durch eine erhöhte Transkription von spt die Apoptose induziert wird, wurden die mit spt transfizierten HEK293 Zellen mit Hilfe eines TUNEL-Assays und einer AnnexinV-Färbung auf apoptotische Stadien hin untersucht. In beiden Fällen wurde keine apoptotische Aktivität festgestellt (Abb.20+21). Wie bereits durch den spt-Aktivitätsassay mit [1-¹⁴C]-Palmitinsäure nachgewiesen, akkumuliert das Ceramid bei einer erhöhten spt Transkription im Vergleich zum WT nicht, sondern wird umgehend weiter zu Glucocerebrosid metabolisiert (Abb.15A).

Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Herget überein. Auch hier wurde durch Überprüfung der spt Transkription keine Erhöhung festgestellt (Herget et al., 2000). In einer anderen Veröffentlichung wurde eine erhöhte Transkription von spt festgestellt und in direkte Verbindung mit einer Erhöhung der Ceramid Konzentration gesetzt. Ein Assay zur Bestimmung der spt-Aktivität wurde nicht durchgeführt (Shimabukuro et al., 1998). Allerdings wurde die Transkription von *sptlc1* bestimmt und bewiesenermaßen führt eine Erhöhung der *sptlc1* Transkription nicht zu einer Erhöhung von DHSPH (Hornemann et al., 2006, Weiss & Stoffel, 1997).

In anderen Veröffentlichungen ist eine Erhöhung der spt-Aktivität nach Behandlung von Zellen mit Aceton, Etoposid oder Retinolsäure beschrieben (Herget et al., 2000, Holleran et al., 1995, Perry, 1999), was in Folge zu einer Akkumulation von Ceramid geführt haben soll. Außer in der Arbeit von Herget wurde in keiner der vorliegenden Arbeiten die spt Transkription überprüft. Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse steht fest, daß die Erhöhung der spt Aktivität nicht zur Apoptose führt.

Sphingosin-1-Phosphat Lyase-, und Sphingosinkinase-Enzymexpressionsstudien

Um Katabolismus und Anabolismus der Sphingolipide zu vergleichen, wurden die Sphingosin-1-Phosphat Lyase und die Sphingosinkinase stabil in HEK293 Zellen exprimiert.

Immunfluoreszenzstudien an stabil transfizierten HEK293 Zellen zeigten sowohl die cytoplasmatische Lokalisation der Sphingosinkinase (Stoffel et al., 1973), als auch die ER-ständige Lokalisation der Sphingosin-1-Phosphat Lyase (Stoffel et al., 1969) (Abb.28+29).

Bei der biochemischen Charakterisierung der Enzyme wurde die Enzymaktivität *in vitro* bestimmt. Sowohl die Kinase, als auch die Lyase zeigten eine signifikante Zunahme der Produkte in den transfizierten Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp-Zellen (Abb.30+32).

Eine mögliche Beeinflussung der Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus durch die Überexpression der Sphingosinkinase und der Sphingosin-1-Phosphat Lyase wurde geprüft. Bei den die Kinase überexprimierenden Zellen wurde keine Regulierung der Genexpression beobachtet (Abb.33). Gleichwohl führte die Überexpression der Sphingosin-1-Phosphat Lyase zu einer Reduktion der Expression der Ceramidsynthasen lass 2 und lass 6 (Abb.34 und Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über die Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus

	x-fache Genexpression:				
	saure Ceramidase	lass 1	lass2	lass5	lass6
WT HEK293-Zellen	1,2	0,3	3,7	0,7	2,5
Lyase-transfizierte HEK293-Zellen	1	0,3	2,7	0,5	1,5

Sphingolipide nehmen neben der Funktion als Komponenten von Membranen auch eine Rolle als Signalmoleküle in der Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose ein. Die vermehrte Expression der Sphingosin-1-Phosphat Lyase führt zum verstärkten Abbau des Sphingosin-1-phosphats (Abb.6). Gerade das Gleichgewicht zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat muß in der Zelle gewahrt bleiben, da Ceramid in unterschiedlichen Zelllinien proapoptotisch wirkt (Craighead et al., 2000, Martin et al., 1995, Obeid et al., 1993, Vento et al., 1998) und Sphingosin-1-Phosphat die Zelle vor Apoptose schützt, auch wenn diese durch verstärkte Ceramidexpression induziert wurde (Cuvillier et al., 1998, Cuvillier et al., 1996). Das Verhältnis zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat ist daher ein

kritischer Faktor für das Überleben der Zellen und erklärt die Reduktion der *lass 2-*, und *lass 6*-Expression in den die Sphingosin-1-Phosphat Lyase überexprimierenden HEK293 Zellen als Antwort auf den vermehrten Abbau des Sphingosin-1-Phosphats (Le Stunff et al., 2002, Le Stunff et al., 2002). Wie bereits bei spt beschrieben, sind von der Expressionsänderung nur diese spezifischen *lass*-Gene betroffen, da zum einen in HEK293-Zellen überwiegend C_{16:0} und C_{24:0}-Fettsäuren als Acylreste in Ceramiden zu finden sind (Riebeling et al., 2003, Venkataraman et al., 2002), und zum anderen die verschiedenen *lass*-Gene vermutlich nicht in jedem Organ gleich stark bzw. überhaupt exprimiert werden.

Diese Expressionsstudien weisen auf eine Anpassung der Gene des Sphingolipidstoffwechsels an eine verstärkte Lyase-Aktivität hin.

Desweiteren wurden die Expressionen der Sphingosinkinase und der Sphingosin-1-Phosphat Lyase in Sphingomyelinase defizienten Mäusen analysiert. Die Kinase zeigte keine Expressionsänderung. Die Lyase Expression im Gehirn der aSMase defizienten Maus war erhöht, in der Leber der SMPD2/3 defizienten Maus vermindert.

Die Zunahme der Lyaseexpression im Gehirn der aSMase defizienten Maus kann durch das für das Überleben der Zelle notwendige Gleichgewicht zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat erklärt werden, die beide aus den anabolischen Reaktionen stammen, die zur Ceramid-, und zur Sphingosin-Neusynthese führen. Durch die Deletion der sauren Sphingomyelinase kommt es zur Akkumulation des Sphingomyelins, nicht aber zur Bildung von Ceramid durch den Sphingomyelin-Katabolismus (Otterbach & Stoffel, 1995). Verstärkter Abbau des Sphingosin-1-Phosphats durch die Lyase kann dieses Ungleichgewicht ausgleichen.

Eine ähnliche Regulation wird in den anderen Organen nicht beobachtet. Die Abnahme der Lyase-Expression in der Leber der SMPD2/3 defizienten Maus legt weiterführende Genregulationsstudien des Sphingolipidmetabolismus, wie beispielsweise der Ceramidasen, nahe.

Apoptoseuntersuchungen

Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Ceramid/Sphingosin als die Apoptose begünstigenden Faktoren, und dem Sphingosin-1-phosphat als antiapoptotischem Faktor ist essentiell, um einer Apoptose entgegenzuwirken (Cuvillier et al., 1996). Damit ist natürlich

vor allem der Fokus auf die Enzyme des Katabolismus zu richten, da diese für die Synthese bzw. den Abbau von Sphingosin-1-phosphat verantwortlich sind (Abb.5+6).

Die mit der Kinase transfizierten HEK293 Zellen wurden auf apoptotische Stadien mit Hilfe des TUNEL-Assays getestet. Wie bereits von Olivera und Mitarbeitern beschrieben, wurde keine Apoptose detektiert (Abb.37) (Olivera et al., 1999). Durch die erhöhte Sphingosinkinase-Aktivität wird verstärkt Sphingosin-1-Phosphat transkribiert, wodurch die Zelle vor Apoptose geschützt ist.

Bei der Sphingosin-1-Phosphat Lyase ist trotz des durch dieses Enzym verstärkten Abbaus des Sphingosin-1-Phosphats keine Apoptose mit Hilfe des TUNEL-Assays nachweisbar (Abb.38). In vorherigen Apoptose-Studien zur Bedeutung der Sphingosin-1-Phosphat Lyase, wurde die Apoptose entweder durch Staurosporin oder Etoposid induziert (Oskouian et al., 2006), oder die Studien wurden an der humanen Sphingosin-1-Phosphat-Lyase durchgeführt (Min et al., 2005, Reiss et al., 2004).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an den die Lyase überexprimierenden HEK293 Zellen wurde gezeigt, daß die Überexpression der murinen Sphingosin-1-Phosphat-Lyase *per se* nicht zur Induktion der Apoptose ausreicht.

Dieses Resultat läßt sich durch die oben beschriebenen Studien der Expression der anderen Gene im Sphingolipidmetabolismus, im die Lyase überexprimierenden Klon, erklären (Abb.34 und Tabelle 8) und führt zu dem Schluß, daß die Überexpression der Lyase zu einer Abnahme der Ceramidsynthese-Gene lass 2+6 führt. Durch diese Reduktion des Ceramids ist der vermehrte Abbau des Sphingosin-1-Phosphats ausgeglichen und das Gleichgewicht zwischen Ceramid und Sphingosin-1-Phosphat in der Zelle wieder hergestellt, und dadurch die Apoptose unterbunden.

II. Genetische Strategie zur Funktion der Sphingolipide durch Deletion des Schlüsselenzyms spt

Generierung einer spt defizienten Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei targeting-Vektoren zur Erzeugung konditioneller Mausmutanten verwendet. Von den 286 aus den Elektroporationen des ersten Konstruktes hervorgegangenen Klonen, konnten 2 homolog rekombinierte ES-Zell-Klone isoliert werden. Bei den Elektroporationen des neu entworfenen Konstrukts, das neben den loxP-Sequenzen frt-Sequenzen enthielt, ergaben sich bisher keine homolog rekombinierten ES-Zellklone.

Außerdem wurde in dieser Arbeit ein targeting-Vektor zur Erzeugung eines konventionellen Knock-Outs verwendet. Elektroporationen zur Transfektion des Konstruktes in V8.1, sowie Bruce 4.0 Zellen führten zu einem homolog rekombinierten Klon.

Durch Verwendung der Doppelselektion durch G418 und der Herpes-simplex Thymidinkinase (TK-Box), wurden bestmögliche Selektionsbedingungen für die Isolierung von Klonen mit homologer Rekombination geschaffen. Die Frequenz des Ereignisses der homologen Rekombination des Vektors in den embryonalen Stammzellen ist von mehreren Faktoren abhängig. Bei der Konstruktion des targeting-Vektors mußte auf die Länge der homologen Bereiche zwischen Zielgen und Konstrukt geachtet werden (Hasty et al., 1991). Ist diese zu gering, sinkt die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination rapide ab. Bei den erstellten Konstrukten ist die Länge der Arme des Konstruktes jedoch ausreichend. Zudem wird eine erhöhte Rekombination erreicht, wenn bei der Erstellung des Konstruktes isogene DNA verwendet wird (te Riele et al., 1992, van Deursen & Wieringa, 1992). Dies ist in den verwendeten Konstrukten nicht der Fall gewesen. Eine weitere Erklärung des Ausbleibens der homologen Rekombination kann in Mutationen liegen, die bei der Generierung des Konstruktes auftreten. Im vorliegenden Fall können jedoch größere Mutationen ausgeschlossen werden. Sie wurden sowohl durch Restriktionsanalysen, als auch Sequenzierungen von Teilbereichen der Konstrukte ausgeschlossen. Die Rekombination ist außerdem vom Genlokus abhängig, wobei dies hier vernachlässigt werden kann, da eine effiziente homologe Rekombination beim ersten Vektor beobachtet werden konnte.

Um die Pluripotenz der Stammzellen nachzuweisen, wurden die embryonalen Stammzellen nach der homologen Rekombination mittels Karyotypisierung und alkalischer Phosphatase-Färbung untersucht (Abb.46). Beide Untersuchungen bestätigten die Eignung der ES-Zellen zur Blastozysteninjektion.

Schon während der Arbeit wurde der Fokus auf die konditionelle Variante des Knock-Outs gelegt, da aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Sphingolipide im Organismus davon ausgegangen werden konnte, daß sich das konventionelle Modell embryonal letal auswirkt. Während der Verfassung dieser Arbeit bestätigte dann eine andere Arbeitsgruppe diese Annahme (Hojjati et al., 2005). Daher wurde die weitere Arbeit mit dem positiven Klon des konventionellen Konstruktes nicht fortgeführt.

Transiente Cre-Rekombination

Die als homolog rekombiniert identifizierten Stammzellen wurden einer transienten Cre Rekombination unterzogen. Dabei sollte die Exzision der Neo-Box auf ES-Zellebene erreicht werden. Es ist allgemein strittig, ob die Anwesenheit der Neo-Box zu einem Phänotyp in der Maus führen kann. Durch die Deletion des Selektionsmarker auf ES-Zellebene werden jedoch unerwünschte Nebenwirkungen im zu generierenden Tier in jedem Fall vermieden.

Als Vektor für die Cre Expression wurde der pPGKCrebpA-Vektor verwendet, der zu einer stark verminderten Cre-Expression führt und daher zur selektiven Deletion der Neo-Box führen sollte. Unter den untersuchten Klonen wurde tatsächlich immer nur die Deletion der Neo-Box, und nie des gesamten Cre flankierten Abschnittes beobachtet (Abb.47). Weder die Änderung der Konzentration des Vektors, noch der Elektroporationsbedingungen führten dazu, daß der gesamte Bereich deletiert wurde. Auch die Verwendung des pBS185 Vektors (Sauer, 1993), bei dem die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Cytomegaloviruses (hCMV) steht und daher stark exprimiert wird, änderte nichts an den Resultaten. Es wurde jedoch berichtet, daß die selektive Exzision des Resistenzgens bei diesem Vektor genauso wahrscheinlich ist, wie die Exzision des gesamten Bereiches (Gu et al., 1994). Ein Funktionsverlust der vorderen loxP-Sequenz durch Mutation wurde sowohl durch die durchgeführten Versuche auf die Funktionalität der loxP-Sequenzen des targeting Vektors mit Hilfe der Cre exprimierenden Zellen (Abb.43), sowie der Sequenzierung der loxP-Sequenzen (Abb.42) ausgeschlossen.

Blastozysteninjektion

Die ES-Zellen des positiven Klons wurden in Blastozysten injiziert. Der Vorteil dabei lag in einer großen Zeitersparnis gegenüber den erst durch die transiente Cre Rekombination zu modifizierenden Zellen. Zudem liegt ein kritischer Parameter für die Erzeugung von keimbahnchimären Tieren in der Pluripotenz der embryonalen Stammzellen bei der Injektion in die Blastozysten. Diese kann durch das mehrfache Auftauen und Einfrieren der homolog rekombinierten ES-Zellklone verloren gehen. Nach Erhalt der modifizierten Klone, in denen durch transiente Cre-Expression selektiv die Neo-Box entfernt wurde, wurden auch diese für Blastozysteninjektionen verwendet.

Lediglich der Ausgangsklon 26 führte nach Injektion in Blastozysten zu chimären Tieren. Aus den Blastozysteninjektionen der modifizierten Klone gingen keine chimären Tiere hervor. Von den sechs erzeugten chimären Böcken erwiesen sich fünf als keimbahnchimär und einer als infertil. Der Erhalt der Keimbahnchimärität bestätigt die durch Untersuchungen nachgewiesene Pluripotenz des homolog rekombinierten Klons (Abb.46). Wie sich während der laufenden Kreuzung zur *spt*^{-/-} Maus bei der transienten Cre-Expression herausstellte, erwies sich die vordere loxP-Sequenz als nicht funktionell. Daraufhin wurde die vordere loxP-Sequenz aus der zu der Zeit bereits vorhandenen *spt*^{-/-} Maus sequenziert und der kritische Bereich überprüft. Tatsächlich ergab sich aus der Sequenzierung, daß es sich um eine unvollständige homologe Rekombination des Konstruktes handelte, bei der die erste loxP-Sequenz nicht in das Genom eingeführt wurde. Diese unvollständige Rekombination konnte anhand der verwendeten Nachweise zur homologen Rekombination nicht detektiert werden, obwohl zwei verschiedene Analysen durch PCR durchgeführt wurden, um sowohl das 5`Ende, als auch das 3`Ende des Klons zu überprüfen.

Erstellung einer induzierbaren Cre-Mauslinie

Der konventionelle Knock-Out von *spt* wirkt embryonal letal (Hojjati et al., 2005). Daher sollte durch den konditionellen Knock-Out eine zeit-, und gewebsspezifische Deletion von *spt* durch Kreuzung der konditionellen *spt*-Mäuse mit Cre exprimierenden induzierbaren Mausstämmen geschaffen werden.

Als geeignetes Modell zur Kontrolle der Genexpression in Eukaryonten hat sich ein durch Tetrazyklin induzierbares System bewährt (Gossen et al., 1994, Gossen & Bujard, 1992). Um die Gewebsspezifität zu gewährleisten, wurde ein transthyretin (ttr) Promoter verwendet, der eine leberspezifische Expression induziert (Costa et al., 1986, Costa et al., 1988).

Es wurde ein Konstrukt erstellt, das sowohl den reversen Transaktivator, als auch die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des TTR Promoters codiert.

Der Vektor wurde eingehend durch Restriktionsanalyse auf seine Richtigkeit überprüft.

Nach oraler Applikation von Doxycyclin über fünf Tage, war kein Cre-Transkript im Western Blot nachweisbar (Abb.53). Es wurde bereits mehrfach gezeigt, daß sowohl die Menge des verabreichten Doxycyclin, als auch die Dauer der Applikation weder für den Organismus der Maus schädlich sind, noch die Applikation zu gering ist, um eine Cre-Expression zu erzielen (Branda & Dymecki, 2004). Desweiteren wurde zeitgleich im Labor der gleiche Vektor mit einem anderen Promoter ausgestattet, bei dem das Cre-Transkript per Western Blot nachzuweisen war (Abb.53).

Bei der Pronukleusinjektion integriert die DNA zufällig in das Genom der Maus. Dies hat zur Folge, daß bei der Integration die Expression unter die Kontrolle cis-aktivierender, regulatorischer Elemente kommen kann. Die das Transgen umgebenden Elemente können Einfluß auf dessen Expression nehmen. Handelt es sich bei den Elementen um Silencer oder Heterochromatin, so kann das die fehlende Cre Expression erklären.

Um diese sogenannten Positionseffekte zu vermindern, könnten Insulatorelemente, sowie Matrix/Scaffold attachment regions (MAR/SAR) oder Locus control regions (LCR) in das Konstrukt eingebracht werden. Insulatoren können gegen die sogenannten Positionseffekte schützen, so daß die Expression des Transgens nicht beeinflußt wird. Dabei bilden sie Barrieren zwischen stillgelegten Chromatinbereichen und Enhancern. Dahingegen aktivieren LCR`s die Genexpression. Sogar wenn sie sich an einer Heterochromatin Centromer-Region im Mausgenom befinden können sie für eine offene Chromatinstruktur sorgen (Festenstein et al., 1996) und zudem MAR`s als Teilelemente enthalten.

Eine erfolgreiche Transkription ist jedoch sowohl durch den Einsatz von MAR`s (Barash et al., 1996, Neznanov et al., 1996), als auch durch LCR`s (Robertson et al., 1996) nicht gewährleistet.

Vergleich der Expression von sptlc3 zu sptlc2 in der Maus

Während der Erstellung der Arbeit wurde eine neue Untereinheit von spt entdeckt, die sptlc3 genannt wurde (Hornemann et al., 2006). Diese neue Untereinheit besitzt genau wie sptlc2 eine PLP-Bindungsstelle, wodurch man davon ausgehen muß, daß es sich wie bei sptlc2 um eine katalytische Untereinheit handelt. Zudem wurde in 15 von 24 getesteten menschlichen cDNAs verschiedener Organe sptlc3 sehr viel stärker exprimiert als sptlc2 (Hornemann et al., 2006). Dadurch stellte sich die Frage, ob eine verminderte bzw. deletierte sptlc2 Expression mit Hilfe eines Knock-Out Modells möglicherweise durch eine vermehrte sptlc3-Expression ausgeglichen werden kann. Dadurch würde dieses Modell unbrauchbar in Bezug auf die Fragestellung, was eine gewebs-, und zeitspezifische Deletion von spt für Folgen nach sich zieht.

Um diese Problematik zu klären wurde die Expression von sptlc3 in der Maus vergleichend zu der im Menschen betrachtet. Dabei wurde nicht nur deutlich, daß die Expression von sptlc3 weit unter der des Menschen lag, sondern auch, daß die sptlc2 Expression in der Maus weit über der von sptlc3 liegt (Abb.57). Darüber hinaus war in zwei der vier untersuchten Organe gar keine sptlc3 Expression detektierbar.

Ein Mausmodell, in dem die sptlc2 deletiert wird, ist nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen durchaus aussagekräftig. Es scheint ausgeschlossen, daß durch eine vermehrte sptlc3-Expression eine gewebspezifische spt Deletion ausgeglichen werden kann.

6. Material und Methoden

6.1 Zellkultur-Methoden

6.1.1 HEK293-Zellen

Kultivierung: HEK293-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM mit 10 % FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 1 mM Natrium-Pyruvat kultiviert.

Stabile Transfektion und Selektion: Für die stabile Transfektion wurden 5x10⁶ HEK-Zellen mit 1 µg linearisierter Plasmid-DNA in 0,8 ml Kulturmedium bei 450 V und 250 µF (0,4 cm Küvette) elektroporiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen (500-2000 µl) in 90 mm Schalen kultiviert.

Zur Selektion wurde das HEK-Medium nach 24 Stunden durch G418-haltiges HEK-Medium ersetzt. Nach zweiwöchiger Selektion wurden die resistenten HEK-Klone auf eine 24-Loch-Platte transferiert.

6.1.2 Embryonale Fibroblasten

Kultivierung: Embryonale Fibroblasten wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 0,03% Glutamin inkubiert.

6.1.3 COS-Zellen

Kultivierung: COS-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 1 mM Natrium-Pyruvat kultiviert.

Stabile Transfektion und Selektion: Für die stabile Transfektion wurden 5x10⁶ COS-Zellen mit 1µg linearisierter Plasmid-DNA in 0,8 ml Kulturmedium bei 450 V und 250 µF (0,4 cm Küvette) elektroporiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in verschiedenen Konzentrationen (500 – 2000 µl) in 90 mm Schalen kultiviert.

Zur Selektion wurde das COS-Medium nach 24 Stunden durch G418-haltiges COS-Medium ersetzt. Nach zweiwöchiger Selektion wurden die resistenten COS-Klone auf eine 24-Loch-Platte transferiert.

6.1.4 ES-Zellen

Kultivierung: ES-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM mit 15 % FCS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 0,03 % Glutamin, 1250U LIF und 1 mM 2-Mercapthoethanol auf embryonalen Fibroblasten kultiviert.

Transfektion und Selektion: Vier Stunden vor der Elektroporation wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen wurden mit 40 µg linearisierter Plasmid-DNA in 0,8 ml Medium aufgenommen und bei 450 Volt und 25 µF elektroporiert. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die Zellen auf vier 90er Platten überführt.

6.1.4.1 Selektion potentiell positiver ES-Zell-Klone

Einen Tag nach der Elektroporation wurde das Medium der Platte mit den elektroporierten Zellen durch G418-haltiges Medium ersetzt. Nach weiteren 5 Tagen wurde das G418 Medium gegen ein Gancyclovir C-haltiges Medium ausgetauscht. Die GanC Selektion wurde nach weiteren 5 Tagen beendet. Mit den nun auf der Platte verbliebenen selektionsresistenten Klonen wurde weitergearbeitet.

6.1.4.2 Isolation selektionierter ES-Zell-Klone

Die Platten wurden mit PBS gewaschen, und die Klone unter PBS mit einer Pippetenspitze abgelöst und in ein Loch einer 96-er Platte überführt. Die Klone wurden für 5 Minuten unter Trypsin vereinzelt und daraufhin auf eine mit embryonalen Fibroblasten beschichtete 96-er Platte überführt. Nach 3-4 Tagen wurden 50% der Zellen nach Trypsinisierung auf eine gelatinebeschichtete 96-Loch-Platte überführt, die der DNA-Präparation diene. Die restlichen Zellen wurden kryokonserviert.

6.1.4.3 Kryokonservierung von ES-Zellen

Die für die Kryokonservierung bestimmten Zellen der 96-Loch-Platte wurden unter 50 µl Einfriermedium (Kulturmedium auf 20% FCS erhöht, sowie Zugabe von 10% DMSO) pro Loch bei -80°C eingefroren.

Befanden sich die ES-Zellen auf einer 90 mm Platte, so wurden die Zellen beim Erreichen einer Dichte von 10^7 Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Das Zellsediment wurde in 4 ml Einfriermedium aufgenommen und in 1 ml Aliquote bei -80°C eingefroren.

6.1.4.4 Auftauen und Expansion positiver Zellklone

Die Klone, die das targeting-Konstrukt homolog eingebaut hatten, wurden zum weiteren Gebrauch aufgetaut und expandiert. Hierzu wurde die 96-Loch-Platte im 37°C Brutschrank angetaut, und die Klone auf eine mit Fibroblasten beschichtete 24-Loch-Platte transferiert. Nach 2-3 Tagen wurden die Klone auf eine 90 mm Platte expandiert.

6.1.4.5 Karyotypbestimmung

Die Karyotyp-Bestimmung von ES-Zellen erfolgte nach dreimaliger Passage auf Gelatine beschichteten 90 mm Kulturschalen.

Der Zellzyklus wurde durch Zugabe von 33 µl Colchicininlösung (Demecolone solution, Sigma) zu 5 ml Medium und anschließender 50-minütiger Inkubation bei 37°C erreicht. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Platte abgelöst. Nach mehrfachem Waschen mit PBS und anschließender Präzipitation wurden die Zellen zur Osmolyse in 0,56% KCl aufgenommen. Hierbei wurde das Präzipitat vorsichtig abgelöst und 1 ml KCl tropfenweise hinzugegeben. Nach Resuspension der Zellen wurden weitere 3 ml KCl zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde für 5 Minuten bei 500g zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Die Zellen wurden in der Restflüssigkeit vorsichtig resuspendiert und dreimal mit je 2 ml eiskalter Fixierlösung [Methanol/Eisessig(3:1)] durch tropfenweise Zugabe versetzt, anschließend bei 500g präzipitiert und der Überstand abgesaugt.

Hiernach wurde das Präzipitat in 0,5-1 ml Fixierlösung aufgenommen und mit einer Pasteurpipette aus mindestens 30 cm Höhe auf einen sauberen Objektträger getropft. Nach

dem Eintrocknen wurden die Objektträger in Giemsalösung (Giemsa stain, GS-500 Sigma) gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Nach dem Eindeckeln (Entellan NEU, Merck) wurden unter 40facher Vergrößerung die Chromosomensätze der Zellen untersucht. Pro Zellklon wurden je 30 Chromosomensätze ausgezählt und statistisch ausgewertet.

6.1.4.6 Transiente Cre-Expression

Die Vektoren pBS185 und pPGKCrebpA kodieren die Cre Rekombinase unter der Kontrolle eines Promoters, der eine ubiquitäre Expression des Cre-Gens ermöglichen soll. Zur transienten Cre-Expression wurden homolog rekombinierte ES-Zellen durch Elektroporation mit 40 µg des nicht linearisierten Vektors transfiziert. Die Elektroporationsbedingungen betragen 400 V und 25 µF. Da der Selektionsmarker das Ziel der Exzision war, wurden die Klone auf eine 96-Loch-Platte „gepickt“ und nach 4-5 Tagen 1:3 gesplittet. Ein Teil wurde auf eine gelatinebeschichtete, ein anderer auf eine mit embryonalen Fibroblasten bestückte transferiert, und der dritte Teil kryokonserviert. Die Klone der gelatinebeschichteten Platte erhielten WT-Medium, die mit Fibroblasten versehene Platte G418-haltiges Medium. Die Klone, die sensitiv auf das G418-haltige Medium reagierten, wurden nach Lyse der Gelatineplatte auf die Exzision hin untersucht.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparationen aus 3 ml Übernachtskultur erfolgten nach der Methode von Birnboim (Birnboim, 1979). Plasmid-Maxi-Präparationen wurden mit Hilfe von Qiagen tip-500-Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus TBE (Tris-Borat-EDTA)-Gelen mittels Nucleospin-Säulen (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben eluiert.

6.2.3 Gewinnung von genomischer DNA

6.2.3.1 DNA aus ES-Zellen

ES-Zellen wurden auf mit Gelatine beschichteten 24-Lochplatten bis zur Konfluenz kultiviert, das Medium abgezogen, und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Die Inkubation erfolgte in 500 µl Lysispuffer (100 mM Tris/HCl [pH 8,5], 5 mM EDTA [pH 8], 200 mM NaCl, 0,2% SDS) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) ÜN bei 37°C. Danach wurde das Lysat in Eppendorfgefäße überführt und mit 450 µl Isopropanol versetzt. Nach 10 Minuten über Kopfschütteln bei RT wurde 15 Minuten mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und das resultierende DNA-Sediment mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen der DNA wurde diese in 200 µl TE oder 10 mM Tris/HCl (pH 8) aufgenommen und für mindestens 3 Stunden bei 55°C gelöst.

Auch für die DNA-Präparation aus 90 mm Schalen wurde das oben beschriebene Protokoll verwendet. Die ES-Zellen wurden jedoch vor der Lyse trypsinisiert, mit PBS gewaschen und präzipitiert.

6.2.3.2 DNA aus Schwanzspitzen-Biopsien

Für die Präparation genomischer DNA aus Schwanzspitzen wurde ca. 1 cm des Schwanzes abgeschnitten und über Nacht bei 55°C und 1100 rpm in 700 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS) und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) verdaut. Anschließend wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70%-igem Alkohol gewaschen. und in 200 µl TE aufgenommen.

6.2.4 Restriktionsanalysen

Plasmid-DNA wurde mit 1U der entsprechenden Restriktionsendonuklease 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert, wobei eine DNA-Konzentration von 1 µg / 10 µl Ansatz nicht überschritten wurde.

6.2.5 Radioaktive DNA-Markierung

Mittels des *Random Primed DNA Labeling Kit* (Boehringer) wurde, den Herstellerangaben folgend, die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP oder [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham) durchgeführt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch *ProbeQuant G-50 Micro Columns* (Amersham). Vor Zugabe der markierten DNA zum prähybridisierten Blot wurde die aufgefangene Fraktion 5-10 Minuten bei 96°C denaturiert und danach 5 Minuten auf Eis abgekühlt.

6.2.6 Ligation

Zur Herstellung von Konstrukten durch Insertion von DNA-Fragmenten in entsprechend linearisierte Vektoren wurden die Vektoren, falls notwendig, am 5'-Ende mittels alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert und bei 14°C in 20 µl Volumen ÜN mit 1U T₄-DNA-Ligase inkubiert.

Die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde mit dem *TA Cloning Kit* (Invitrogen) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter E.coli Zellen (DH5 α) wurde nach den Angaben von Hanahan (Hanahan, 1983) vorgegangen.

6.2.7.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 20 µl Ligationsansatz wurden vorsichtig mit den kompetenten Zellen gemischt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C folgte die Zugabe von 1000 µl kaltem LB-Medium, sowie eine

einstündige Inkubation bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen auf einer, mit entsprechendem Antibiotikum beschichteten LB-Platte ausgestrichen.

6.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Reaktionen wurden in 20 µl oder 50 µl Ansätzen (je 10 mM dNTP's, je 10 pmol Oligonukleotide, 1-5 ng Plasmid DNA, 2U Taq-DNA-Polymerase, 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine) in einem *Peltier Thermal Cycler* (Biozym) durchgeführt.

PCR Reaktionen wurden mit dem Expand-High-Fidelity-PCR Kit (Roche) oder dem Long Template PCR-Kit (Roche) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Annealing-Temperatur wurde 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide festgelegt. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Länge des zu erwartenden Amplifikats (~1 min/kb). Der PCR-Ansatz wurde zur Analyse mittels Gelelektrophorese auf ein TBE-Agarose-Gel aufgetragen.

6.2.9 RNA Präparation

RNA Präparationen erfolgten mit dem TRIzol ®LS Reagent (Life Technologies) nach den Angaben des Herstellers.

6.2.10 Reverse-Transkription

Für die Herstellung von cDNA wurden je 10 µg RNA revers transkribiert. Hierzu wurden zu der RNA 2 µl p(dN6) (50 µM, Boehringer) zugegeben und mit Wasser auf eine Gesamtmenge von 31,5 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, 2 Minuten auf Eis gekühlt und mit 10 µl 5x RT Puffer (Gibco/BRL), 4 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl RNAsin (Boehringer) und 2 µl dNTP-Mix (10 mM) versetzt. Danach folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C. Daran schloß sich eine zweiminütige Inkubation bei 42°C an. Es wurden 2 µl SuperscriptII (Gibco/BRL) zum Ansatz zugegeben. Die Lösung wurde für 50 Minuten bei 42°C inkubiert und darauf für die Enzyminhibition für 15 Minuten bei 70°C erhitzt.

6.2.11 Quantitative PCR

Es wurden je 2 µl der erhaltenen cDNA für eine PCR Reaktion eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und nach dem Trocknen des Geles mittels Phosphoimager SI 445 und der ImageQuant Software Version 5.1 (*Molecular Dynamics*) ausgewertet.

10x Ansatz: 16 µl MgCl₂, 6 µl sense Primer (10 pmol/µl), 6 µl antisense Primer (10 pmol/µl), 4 µl dNTP's, 20 µl 10x PCR Puffer, 1 µl ³²P-dCTP, 8 µl Taq-Polymerase, 120 µl H₂O.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 Proteinkonzentration

Die Proteinquantifizierung erfolgte durch photometrischen Bestimmung mit dem BCA-Assay (Smith, 1985) (Pierce; Protein-Cu⁺-BCA-Komplex) entsprechend den Hersteller-Angaben.

6.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse der Proteinexpression wurden 4-12%-ige Bis-Tris-Gele (Invitrogen) verwendet. Die SDS-PAGE Gele wurden mit Coomassie-Blau für 15-30 Minuten gefärbt und in Entfärbelösung bis zum gewünschten Kontrast entfärbt. Nach 2-3 Stunden Inkubation in 50% Methanol / 47% H₂O / 3% Glycerin wurden die Gele zwischen zwei aufgespannten Einmachfolien getrocknet und bei Bedarf digital ausgewertet.

6.3.3 Extraktion Proteine

HEK293 Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Zellen in PBS mit einem rubber-policeman von der Platte in ein Eppendorf Gefäß überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation mit 900g wurde der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 5 mM DTT, 0,32 M Sucrose, 2x Complete (Roche) und 0,5% Triton X-100) aufgenommen und 20x auf- und abpipettiert. Unlösliche

Proteine und Zelldebris wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt. Der Überstand enthielt die SPT Aktivität.

6.3.4 Lipid-Analyse

6.3.4.1 SPT-Serin Assay

Der SPT- Assay wurde in einem Volumen von 100 μ l, das aus 100 mM HEPES pH 8,0, 50 mM KCl, 5 mM DTT, 0,4% CHAPS und 0,5 mM Pyridoxal-5-Phosphat bestand, und 0,4 mM Palmitoyl CoA, 15 mg/ml BSA, sowie 200 μ g Enzym-Protein enthielt, durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200.000 dpm [U- 14 C]-Serin gestartet und über 30 Minuten bei 37°C durchgeführt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von 200 μ l NaOH und Natriumborhydrid gestoppt und die Lipide zweimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O gewaschen, unter Stickstoff eingedampft und mittels Dünnschichtchromatographie (Silicagel 60, Merck) aufgetrennt (Lösungsmittelsystem CHCl₃/ CH₃OH/ 2N NH₄OH 40:10:1). Die Platte wurde im Phosphoimager entwickelt.

6.3.4.2 Palmitat-Assay

HEK-Zellen wurden in einer Dichte von ca. 2×10^6 Zellen pro 90 mm Schale ausplattiert und für 24 Stunden ohne FBS inkubiert. Daraufhin wurde [1- 14 C]-Palmitinsäure in EtOH in einer Endkonzentration von $3,45 \times 10^5$ dpm zu den Zellen gegeben. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in ein Sovirellglas überführt. Die Lipide wurden zweimal mit CHCl₃/ CH₃OH (1:1) extrahiert und danach einmal mit H₂O gewaschen. Der Extrakt wurde unter N₂ eingedampft und der Rückstand in CHCl₃ gelöst. Die Extrakte der WT-, und transfizierten Zellen wurden für die anstehenden Hydrolysen geteilt und durch einen Lipidextrakt aus HEK-WT Zellen für die Analyse supplementiert.

Alkalische Hydrolyse:

Der Lipidextrakt wurde eingedampft und in 1 ml 0,5 N methanolischer KOH für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Extrakt 1:1 mit H₂O verdünnt und die Lipide zweimal mit CHCl₃ extrahiert. Die Lipide wurden mit H₂O gewaschen, unter N₂ zur Trockene eingengt, in CHCl₃ aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt

(Laufmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (60:30:5), bis zum ersten Drittel der Höhe, und Hexan/ Diethylether/ AcOH (80:20:1,5) bis oben).

Saure Hydrolyse:

Die vollständig abgedampften Proben wurden in 1 ml methanolischer HCl aufgenommen und für 2 Stunden bei 80°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Proben 1:1 mit H_2O versetzt und daraufhin mit Hexan/Ether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2N NaOH alkalisiert und die Sphingosin-Basen zweimal mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) extrahiert. Der Extrakt wurde mit H_2O gewaschen unter N_2 zur Trockene eingengt, in CHCl_3 aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Laufmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4).

6.3.4.3 Sphingosin -1-Phosphat Lyase-Assay

Synthese von [4,5- ^3H] DHSPH-1-P]

Sphingosylphosphocholin (SPC) wurde mittels Natriumbor[^3H]hydrid in 0,1 M Natriumhydroxid Lösung in Gegenwart von PdCl_2 reduziert und mit Hilfe der Phospholipase D in Dihydrosphingosin-1-Phosphat und Cholin gespalten. Die Dihydrosphingosin-1-Phosphat Bande wurde nach dünnschichtchromatographischer Trennung isoliert und mit Hilfe von Methanol eluiert.

Für den Assay wurden die in Kultur befindlichen Zellen mit PBS gewaschen und pro 90 mm Platte 1,5 ml 0,25 M Sucrose zugegeben. Die Zellen wurden von der Platte geschabt und im gekühlten Potter homogenisiert. Die Mikrosomenfraktion wurde durch Zell- Fraktionierung bei 4°C gewonnen: 15 Minuten bei 900 g zentrifugiert, mit 10.000 g für weitere 15 Minuten zentrifugiert, anschließend eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert. Das so erhaltenen Pellet enthielt die Mikrosomen.

Die so gewonnenen Mikrosomen wurden in 250 μl Phosphatpuffer (K_2HPO_4 pH7,4) resuspendiert. Der Inkubationsansatz betrug 500 μl , dafür wurden 400.000 dpm DHSPH-1-P mit kaltem DHSPH-1-P versetzt, abgedampft und mit 0.2% Triton X-100 in Phosphatpuffer versetzt.

Die Mikrosomenfraktion wurde zur Hemmung der Phosphatasen mit 10 μl einer 1 M NaF-Lösung für 15 Minuten bei 37°C präinkubiert. Danach folgte die Zugabe von 12,5 μl einer 10 mM Pyridoxal-5-Phosphat-Lösung und der Radioaktivität. Nach einer Inkubation von 60

Minuten bei 37°C erfolgte eine dreimalige Extraktion mit Methylenchlorid, die Proben wurden unter N₂ zur Trockene eingeengt, in Methylenchlorid aufgenommen und im Szintillationszähler gemessen.

6.3.4.4 Kinase-Assay

Die HEK-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 1000 µl Kinasepuffer (200 µl 1 M Tris-HCl pH 7,4, 100 µl 0,1 M EDTA, 150 µl 1 M NaF, 0,7 µl Mercaptoethanol, 400 µl Complete®, 86,4 mg β-Glycerolphosphat, 4 ml 50% Glycerol und 5,1 ml Wasser) aufgenommen. Sie wurden durch mehrmaliges freezing (flüssiger Stickstoff) and thawing (37°C Bad) lysiert. Danach wurde der Zellextrakt für 60 Minuten mit 55.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, und der Überstand verwendet.

40-120 µg Protein wurden pro Assay in 180 µl Assay-Volumen gebracht. 10 µl eines 1 mM Sphingosin/BSA-Komplexes (4 mg/ml BSA-Lösung wurden zugegeben und die resultierende Lösung 1-2 Minuten im Ultraschallbad homogenisiert) wurde zugegeben. Danach wurden 10 µl einer [³²P] ATP-Lösung, verdünnt mit neun Teilen einer inaktiven Lösung: 20 mM ATP und 200 mM MgCl₂, zugefügt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde mit 20 µl 1 M HCl gestoppt und mit 800 µl CHCl₃/ CH₃OH/ HCl (100:200:1) extrahiert. Daraufhin wurden 240 µl CHCl₃ und 240 µl 2 M KCl zugefügt, stark gevortext und wiederum für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine kurze Zentrifugation. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Laufmittelsystem 1-Butanol/ CH₃OH/ AcOH/ H₂O (80:20:10:20)).

6.3.5 Gaschromatographie

Die gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuremethylester wurde mit einem Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor durchgeführt. Der Gradient lief von 160°C bis 240°C, wobei die Temperatur pro Minute um 4°C anstieg. Zur Quantifizierung der Gaschromatographie wurde das Programm ChromCard 1.21 (CE Instruments) verwendet.

6.4 Immunologische Methoden

6.4.1 Western Blot

Es wurde das *NuPage* Western Blot System (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers benutzt.

Die Nitrocellulose Membran (Schleicher Schuell) wurde für 2 Stunden bei RT oder ÜN in TBS und 5% Milchpulver zur Absättigung freier Bindungsstellen hybridisiert, wonach eine Inkubation mit dem ersten Antikörper für 1 Stunde bei RT oder ÜN bei 4° C in TBS und 5% Milchpulver stattfinden konnte. Nachfolgend wurde der Blot dreimal für 10 Minuten mit TBS-T (TBS, 0,1% Tween20) gewaschen und mit dem 2. Antikörper, konjugiert mit Peroxidase, in TBS und 5% Milchpulver für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit TBS-T wurde der Blot entwickelt. Die Peroxidase Färbung wurde mittels Luminol-Detektionsreagenz (100 mM Tris/ HCl [pH8,5]; 2,5 mM Luminol; 0,35 mM Cumarsäure; 0,01% H₂O₂) durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde durch das Auflegen von Röntgenfilmen (Kodak, Fuji) detektiert.

6.4.2.1 Immunfärbungen an Zellen

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläser plattiert. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten, anschließend wurden die Zellen mit PBS/ 0,5% Triton-X-100 für 15 Minuten permeabilisiert. Das Blocken der Zellen erfolgte für 1 Stunde bei RT mit 3% BSA in PBS. Danach wurde dreimal je 5 Minuten mit PBS gespült, und der Antikörper bzw. das Antiserum in der vorher bestimmten Verdünnung für 1 Stunde bei RT in PBS, 1% BSA auf die Zellen gegeben. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Für Doppelfärbungen wurden ein anti-Maus IgG (*Sigma*) Cy3 oder FITC markierter Antikörper verwendet.

Die Präparate wurden anschließend dreimal mit PBS/ 0,2% Triton X-100 und zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Glyceringelatine eingedeckelt.

6.4.2 Immunfärbungen an Gewebsschnitten

Gefrierschnitte wurden für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 3% BSA in PBS für 1 Stunde bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper fand in 1% BSA/ PBS für 2 Stunden bei RT statt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1% BSA / 0.2% Triton X-100) wurde der 2. Antikörper für 1 Stunde bei RT in Dunkelheit aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/ 1% BSA, 0.2% Triton X-100 wurde das Objekt mit Glyceringelatine (Merck, mit 2.5% DABCO als Radikalfänger) und großen Deckgläschen einbettet.

6.4.3 EGFP Fluoreszenz Analyse

Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Kulturplatten (Nunc) ausplattiert und mittels eines Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskops (Filterset für Enhanced -GFP; Chroma Analysetechnik) mit einem Flüssigimmersionsobjektivs (Zeiss) betrachtet und mit dem Zeiss Axiovision System dokumentiert. Alternativ wurden die Zellen auf Chamberslides ausplattiert, mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 15 Minuten fixiert und anschließend mit Glycerin-Gelantine eingedeckelt.

6.4.4 Alkalische Phosphatase Färbung

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Aceton/ Methanol (1:1) für 10 Minuten bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) (0,5g in 10ml 70% Dimethylformamid) in Kombination mit Nitroblautetrazolin (NBT) (0,5g in 10ml 70% Dimethylformamid) als Substrat in 5 ml AP Puffer (100 mM Tris (pH9,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) zugegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Färbungen wurden mit einem Zeiss Axioscope ausgewertet.

6.5 Apoptose-Messungen

6.5.1 AnnexinV

Mit Hilfe von AnnexinV läßt sich Phosphatidylserin detektieren. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist dieses Phospholipid auf der cytosolische Seite der Plasmamembran lokalisiert. Im Verlauf der Apoptose wird das Phosphatidylserin nach extrazellulär transloziert. Dieses wird nun von Annexin erkannt und gebunden.

Die Zellen wurden auf Deckgläsern kultiviert und nach Induktion der Apoptose mittels AnnexinV-Cy3 nach Herstellerangaben (Alexis Biochemicals) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

6.5.2 TUNEL-Test

Der TUNEL-Test ermöglicht es, die durch die Apoptose eintretende Fragmentierung der DNA nachzuweisen. Nach Kultivierung der Zellen auf Deckgläsern wurde der Apoptose-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt (Roche Applied Science). Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

6.6 Methoden zur *in vivo* Mutagenese

6.6.1 Mäusezucht

Die Mäuse wurden bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus - von 5⁰⁰-19⁰⁰ Uhr beleuchtet und von 19⁰⁰-5⁰⁰ Uhr Dunkelheit - gehalten.

6.6.2 Mikroinjektion

Die DNA-Mikroinjektion in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen, wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Hogan, 1986). Als Oozytenspender dienten

superovulierte Weibchen die zwei Tage vor der Verpaarung mit 5U Gonadotropin und nach 46-48 Stunden mit 5U humanem Chorio-Gonadotropin stimuliert und direkt verpaart wurden. Oocytenspender wurden durch Plug Check ausgewählt. Die Eier wurden aus der Ampulle des Eileiters präpariert und in M16-Medium (s.o.) bis zur Injektion im Brutschrank (37°C, 4,8% CO₂) aufbewahrt. Die Injektion erfolgte in M2-Medium (Sigma) an einem Mikromanipulatorstand (Leitz TypM) mit einem Mikroinjektor (Eppendorff Typ 5242, Kompressor Jun-Air Modell 6). Die injizierten Eier wurden unter dem Mikroskop (Wild/Heerburg) in das Infundibulum einer scheinsschwangeren Maus (ein Tag p.c.; verpaart mit einem vasktomierten Männchen) reimplantiert.

6.6.3 Vasktomierte Männchen

Mindestens zwei Monate alte, zuvor nicht verpaarte Männchen wurden vasktomiert und nach ca. 14 Tagen Ruhe zur Verpaarung eingesetzt (Hogan, 1986).

6.6.4 Blastozysteninjektion

Blastozysten wurden aus den Uteri von mindestens vier Wochen alten Weibchen (C57/B16) 3,5 Tage p.c. mit DFH-Medium (DMEM; 10% FCS; 20 mM HEPES) ausgespült. Es wurden sowohl superovulierte Weibchen (zwei Tage vor der Verpaarung 5U Gonadotropin nach 47 Stunden 5U humanes Chorio-Gonadotropin und Verpaarung) als auch unbehandelte Tiere (Einschätzung der Empfängnisbereitschaft durch Östruskontrolle) als Blastozystenspender verwendet. 12 bis 18 Stunden nach der Verpaarung wurden die Weibchen auf das Vorkommen eines Vaginalpfropfes hin als Spender ausgewählt. Nach der Isolation wurden die Blastozysten in DF Medium (DMEM; 10% FCS) bis zur Injektion im Brutschrank (37°C, 4,8% CO₂) aufbewahrt.

Die Injektion erfolgte in DFH-Medium, wobei jeweils ca. 20 ES-Zellklone auf die innere Zellmasse der Blastozysten abgelegt wurden. Die Operation wurde mittels Mikromanipulatoren (Leitz TypM) unter einem Mikroskop (Leitz Axiovert 10) durchgeführt, wobei die Druckregulation in der Injektionskapillare durch Mineralölfüllung mit geringem Mediumspiegel und in der Haltekapillare durch ein luftgefülltes System mit geringem Mineralölstand erreicht wurde.

Nach der Injektion wurden die Blastozysten 1-2h in M16 Medium (16x Earle; 0,1 M Pyruvat; 100x P/ S; 37,5x NaHCO₃; 100 mg BSA) gehalten und zu jeweils 5-10 in das Uterushorn einer scheinchwangeren Maus, die 2,5 Tage p.c. mit einem vasktomierten Männchen verpaart wurde, reimplantiert.

7. Anhang

7.1 Verwendete Plasmide

pBS 185	Sauer (Sauer, 1993)
pBS 246	Gibco
pBluescriptII SK(+)	Stratagene
pcDNA3.1	Invitrogen
PCR 2.1	Invitrogen
pEGFPN-2	Clontech
pIRES-EGFP	Clontech
pPGKCrebpA	Genetik, Universität zu Köln
pPNT	Tybulewicz (Tybulewicz et al., 1991)
pRapidflirt	A. Bruehl und A. Waisman, unveröffentlicht
pUHD 10-3	Bujard,ZMBH
pUHG 17-1	Gossen
pUHrt62-1	Bujard, ZMBH

7.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
mSPTLC2 Intron 6 sense	gca atcg tct gcg gat cca tgc ata ttt ggt	Erstellung des konditionellen Rapidflirt-Vektors
mSPTLC2 Intron 7 as	gcc agg aaa gga tcc tac acc tac cca cat	
mSPTLC2 Intron 7 s	atg tgg gta ggt gtc gac tgc ttt cct ggc	
mSPTLC2 Intron 8 as	tga tag gag gtc gac aaa tac aga ggt ggg	
mSPTLC2 Intron 8 s	ccc acc tcg aga ttt gtc agg ctc cta tca	
mSPTLC2 Intron 9 as	cca gtg ttg ccc tgc tcg agg cct gac tcc	
Intron 2 sense	agc tta cta cca gtg ggg cta gtt tgg agt	Screening nach positivem Klon
Neo ATG	aag aac gga gcc ggt tgg cgc cta c	
Neo 3`sense	gcg cat cgc ctt ctc tcg cct tct tga cg	
Intron 5 as	gtt tac tgc ctg cct cat tgg ttc c	
spt EcoRI sense	ctg ctg ccg aat tct gcc ggg agg atg cgg	Erstellung des spt cDNA Fusionskonstrukt
spt Apal as	aaa ggg ccc ggt ctt ctg tct ctt cat agg	
Kinase HindIII sense	gag ccc cgg aag ctt gct atg gaa cca gta	Erstellung des Kinase cDNA Fusionskonstrukt
Kinase EcoRI as	ggc aca gaa ttc tgg ttc ttc tgg agg tgg	
Lyase XhoI sense	agc cgg ctc gag agg aag atg ccc gga acc	Erstellung der Lyase cDNA Fusionskonstrukte
Lyase pcDNA Apal as	aca agg gcc caa gtt cag cgg ggc ttt gga	
Lyase EGFP Apal as	ggt caa agt tca gcg ggg ccc tgg aga acc	

Name	Sequenz	Verwendung
ttr Promoter sense	ctt cac cag gag aag ccg tca cac aga tcc	Bestimmung der Transgenität der induzierbaren Cre Mäuse
Cre sense	gtc caa ttt act gac cgt aca c	
Cre as	ctg tca act tgg tcg tgg cag c	
rtTA2 3`as	atc ctt act tac tta ccc ggg gag cta gtc	
EGFP sense	tca cct tacc ccg tgc agt cct tca gc	
EGFP as	atc ccg aga gtg atc ccg gcg gc	
TTR copy sense	cct tct ggc cat gtc ctc agg gtt tac atg	
TTR copy as	tcg taa act ggc aaa gct gga ctg cca cct	
HGPRT sense	gct gac ctg ctg gat tac att aaa gca ctg	Primer für die quantitative reverse Transkriptase PCR
HGPRT as	att cct gaa gct ctc att ata gtc aag ggc	
Exon 3 sense	gtg tcc ttg tat cag gat ttt gaa aac ttc	
Exon 4 as	caa ttt cct gac gag tgc tgc aca c	
sptlc3 sense	aaa ttg tgg att att tac gga tgc agt cac	
sptlc3 as	gta tag cac gcc ctg att tct tga gtg gga	
Kinase sense	ggc ggc aag ggc aag gcc ttg cag ctc ttc	
Kinase as	cca gca tag tgg ttc aca gaa gct gcc agc	
Lyase sense	ggg tgt atg agc tta tct tcc agc cag aga	
Lyase as	gct ttc tgt tcc ccc aga agt cac aca tcc	
saure Ceramidase sense	tgt ggg cat gtt aac agg att caa acc agg	
saure Ceramidase as	gtt gag gac agg ttt tgt tga cag gac atc	
hlass1 sense	ctc cag ccc aga gat gcc gcc aag atg ccc	
hlass1 as	gat ggt agg agc cgc cgc ggg act tga agt	
hlass2 sense	cta cct gac cag tgg caa gca gcc caa gca	
hlass2 as	tcg gat gta att ggc aaa cca gga aaa gct	
hlass3 sense	aga agt gta act tga cgg agc gcc agg tgg	
hlass3 as	gac tcc agc caa atg tca gcc aca tcg tgt	
hlass4 sense	ctt cct cac gga agg gca cag gcc caa gga	
hlass4 as	gcg cag cag gtt ggc act gta gga gaa ggt	
hlass5 sense	gct ggt ttc gcc atc gga gga atc agg aca	
hlass5 as	ggc cag ttt ggc tgc ctc cag caa gaa gtc	
hlass6 sense	ggc ctc tcc aag caa ctg gac tgg gat gtt	
hlass6 as	cca gcg ttc cta ctc ggg cca tat tgt tga	

7.3 Abkürzungen

AK	Antikörper
aSMase	acide Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
CMV	Cytomegalovirus

CoA	Coenzym A
DAB	Diaminobenzidin
DHSPH	Dihydrosphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
Frt	FLP recombinase recognition target
GanC	Gancyclovir
HEK	human embryonic kidney
Hgprt	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
HRP	horseraddish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lass	longevity assurance homolog genes
LCB	longchain base
LIF	leukemia inhibitory factor
loxP	<i>locus of x over in P1</i>
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
Neo	Neomycin Phosphotransferase
PCR	polymerase chain reaction
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
PS	Phosphatidylserin
rtTa	reverser Transaktivator
SK	Sphingosinkinase
SMPD	Sphingomyelin Phosphodiesterase
SPC	Sphingosylphosphocholin
SPT	Serin Palmitoyl-CoA-Transferase
Tdt	Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TK	Thymidinkinase
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
U	Unit
UDP	Uridin-Diphosphat
WT	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

- ALLENDE, M. L., SASAKI, T., KAWAI, H., OLIVERA, A., MI, Y., VAN ECHTEN-DECKERT, G., HAJDU, R., ROSENBAACH, M., KEOHANE, C. A., MANDALA, S., SPIEGEL, S. & PROIA, R. L. (2004) Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem*, 279, 52487-92.
- BARASH, I., ILAN, N., KARI, R., HURWITZ, D. R. & SHANI, M. (1996) Co-integration of beta-lactoglobulin/human serum albumin hybrid genes with the entire beta-lactoglobulin gene or the matrix attachment region element: repression of human serum albumin and beta-lactoglobulin expression in the mammary gland and dual regulation of the transgenes. *Mol Reprod Dev*, 45, 421-30.
- BASU, S., KAUFMAN, B. & ROSEMAN, S. (1968) Enzymatic synthesis of ceramide-glucose and ceramide-lactose by glycosyltransferases from embryonic chicken brain. *J Biol Chem*, 243, 5802-4.
- BEJAOUI, K., UCHIDA, Y., YASUDA, S., HO, M., NISHIJIMA, M., BROWN, R. H., JR., HOLLERAN, W. M. & HANADA, K. (2002) Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest*, 110, 1301-8.
- BEJAOUI, K., WU, C., SCHEFFLER, M. D., HAAN, G., ASHBY, P., WU, L., DE JONG, P. & BROWN, R. H., JR. (2001) SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat Genet*, 27, 261-2.
- BERNARDO, K., HURWITZ, R., ZENK, T., DESNICK, R. J., FERLINZ, K., SCHUCHMAN, E. H. & SANDHOFF, K. (1995) Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem*, 270, 11098-102.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-23.
- BOSE, R., VERHEIJ, M., HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., SCOTTO, K., FUKS, Z. & KOLESNICK, R. (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 82, 405-14.
- BRADLEY, A., EVANS, M., KAUFMAN, M. H. & ROBERTSON, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-6.
- BRANDA, C. S. & DYMECKI, S. M. (2004) Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell*, 6, 7-28.
- BRAUN, P. E., MORELL, P. & RADIN, N. S. (1970) Synthesis of C18- and C20-dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines, and ceramides by microsomal preparations from mouse brain. *J Biol Chem*, 245, 335-41.

- BRAUN, P. E. & SNELL, E. E. (1967) The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparations of *Hansenula ciferri*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58, 298-303.
- BRAUN, P. E. & SNELL, E. E. (1968) Biosynthesis of sphingolipid bases. II. Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*. *J Biol Chem*, 243, 3775-83.
- BUCHHOLZ, F., ANGRAND, P. O. & STEWART, A. F. (1996) A simple assay to determine the functionality of Cre or FLP recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucleic Acids Res*, 24, 3118-9.
- BUEDE, R., RINKER-SCHAFFER, C., PINTO, W. J., LESTER, R. L. & DICKSON, R. C. (1991) Cloning and characterization of LCB1, a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids. *J Bacteriol*, 173, 4325-32.
- BUEHRER, B. M. & BELL, R. M. (1992) Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets. Implications for signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 267, 3154-9.
- CAI, Z., BETTAIEB, A., MAHDANI, N. E., LEGRES, L. G., STANCOU, R., MASLIAH, J. & CHOUAIB, S. (1997) Alteration of the sphingomyelin/ceramide pathway is associated with resistance of human breast carcinoma MCF7 cells to tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity. *J Biol Chem*, 272, 6918-26.
- CARTER, H. E., GLICK, F.J., NORRIS, W.P. & PHILLIPS, G.E. (1947) *J Biol Chem*, 142, 449.
- CARTER, H. E. & HUMISTON, C. G. (1951) Biochemistry of the sphingolipides. V. The structure of sphingine. *J Biol Chem*, 191, 727-33.
- COSTA, R. H., LAI, E. & DARNELL, J. E., JR. (1986) Transcriptional control of the mouse prealbumin (transthyretin) gene: both promoter sequences and a distinct enhancer are cell specific. *Mol Cell Biol*, 6, 4697-708.
- COSTA, R. H., LAI, E., GRAYSON, D. R. & DARNELL, J. E., JR. (1988) The cell-specific enhancer of the mouse transthyretin (prealbumin) gene binds a common factor at one site and a liver-specific factor(s) at two other sites. *Mol Cell Biol*, 8, 81-90.
- CRAIGHEAD, M., POLE, J. & WATERS, C. (2000) Caspases mediate C2-ceramide-induced apoptosis of the human oligodendroglial cell line, MO3.13. *Neurosci Lett*, 278, 125-8.
- CRAVES, F. B., ZALC, B., LEYBIN, L., BAUMANN, N. & LOH, H. H. (1980) Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and beta-endorphin. *Science*, 207, 75-6.
- CUATRECASAS, P. (1973) Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry*, 12, 3558-66.
- CUVILLIER, O., PIRIANOV, G., KLEUSER, B., VANEK, P. G., COSO, O. A., GUTKIND, S. & SPIEGEL, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381, 800-3.

- CUVILLIER, O., ROSENTHAL, D. S., SMULSON, M. E. & SPIEGEL, S. (1998) Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem*, 273, 2910-6.
- DANIEL, P. T., WIEDER, T., STURM, I. & SCHULZE-OSTHOFF, K. (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 15, 1022-32.
- DAWKINS, J. L., HULME, D. J., BRAHMBHATT, S. B., AUER-GRUMBACH, M. & NICHOLSON, G. A. (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet*, 27, 309-12.
- DYMECKI, S. M. (1996) Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6191-6.
- EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- EGGAN, K., AKUTSU, H., LORING, J., JACKSON-GRUSBY, L., KLEMM, M., RIDEOUT, W. M., 3RD, YANAGIMACHI, R. & JAENISCH, R. (2001) Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6209-14.
- FESTENSTEIN, R., TOLAINI, M., CORBELLA, P., MAMALAKI, C., PARRINGTON, J., FOX, M., MILIOU, A., JONES, M. & KIOUSSIS, D. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science*, 271, 1123-5.
- FREDMAN, P. (1998) The role of antiglycolipid antibodies in neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 845, 341-52.
- FUTERMAN, A. H. & PAGANO, R. E. (1991) Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver. *Biochem J*, 280 (Pt 2), 295-302.
- GABLE, K., HAN, G., MONAGHAN, E., BACIKOVA, D., NATARAJAN, M., WILLIAMS, R. & DUNN, T. M. (2002) Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem*, 277, 10194-200.
- GENTER, M. B., VAN VELDHoven, P. P., JEGGA, A. G., SAKTHIVEL, B., KONG, S., STANLEY, K., WITTE, D. P., EBERT, C. L. & ARONOW, B. J. (2003) Microarray-based discovery of highly expressed olfactory mucosal genes: potential roles in the various functions of the olfactory system. *Physiol Genomics*, 16, 67-81.

- GOLD, R., SCHMIED, M., GIEGERICH, G., BREITSCHOPF, H., HARTUNG, H. P., TOYKA, K. V. & LASSMANN, H. (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*, 71, 219-25.
- GORCZYCA, W., BIGMAN, K., MITTELMAN, A., AHMED, T., GONG, J., MELAMED, M. R. & DARZYNKIEWICZ, Z. (1993) Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia*, 7, 659-70.
- GOSSEN, M., BONIN, A. L., FREUNDLIEB, S. & BUJARD, H. (1994) Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells. *Curr Opin Biotechnol*, 5, 516-20.
- GOSSEN, M. & BUJARD, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5547-51.
- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H. & RAJEWSKY, K. (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 265, 103-6.
- GULBINS, E., SCHLOTTMANN, K., RAUTERBERG, E. W. & STEINHAUSEN, M. (1993) Effects of rC5a on the circulation of normal and split hydronephrotic rat kidneys. *Am J Physiol*, 265, F96-103.
- HANADA, K., HARA, T. & NISHIJIMA, M. (2000) Purification of the serine palmitoyltransferase complex responsible for sphingoid base synthesis by using affinity peptide chromatography techniques. *J Biol Chem*, 275, 8409-15.
- HANAHAHAN, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HANNUN, Y. A. & BELL, R. M. (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 243, 500-7.
- HASTY, P., RIVERA-PEREZ, J. & BRADLEY, A. (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 11, 5586-91.
- HELLBERG, A., POOLE, J. & OLSSON, M. L. (2002) Molecular basis of the globoside-deficient P(k) blood group phenotype. Identification of four inactivating mutations in the UDP-N-acetylgalactosamine: globotriaosylceramide 3-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. *J Biol Chem*, 277, 29455-9.
- HELMSTAEDT, E. R. (1963) [On a case of metachromatic leukodystrophy. A contribution to the development of teaching on leukodystrophy.]. *Dtsch Z Nervenheilkd*, 184, 213-34.
- HERGET, T., ESDAR, C., OEHRLEIN, S. A., HEINRICH, M., SCHUTZE, S., MAELICKE, A. & VAN ECHTEN-DECKERT, G. (2000) Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation in vitro. *J Biol Chem*, 275, 30344-54.
- HIRSCHBERG, K., RODGER, J. & FUTERMAN, A. H. (1993) The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem J*, 290 (Pt 3), 751-7.

- HOGAN, B., (1986) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.
- HOJJATI, M. R., LI, Z. & JIANG, X. C. (2005) Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta*, 1737, 44-51.
- HOLLERAN, W. M., GAO, W. N., FEINGOLD, K. R. & ELIAS, P. M. (1995) Localization of epidermal sphingolipid synthesis and serine palmitoyl transferase activity: alterations imposed by permeability barrier requirements. *Arch Dermatol Res*, 287, 254-8.
- HOLMGREN, J., LONNROTH, I., MANSSON, J. & SVENNERHOLM, L. (1975) Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 2520-4.
- HONKE, K., TSUDA, M., HIRAHARA, Y., ISHII, A., MAKITA, A. & WADA, Y. (1997) Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J Biol Chem*, 272, 4864-8.
- HONKE, K., YAMANE, M., ISHII, A., KOBAYASHI, T. & MAKITA, A. (1996) Purification and characterization of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate:GalCer sulfotransferase from human renal cancer cells. *J Biochem*, 119, 421-7.
- HORIBATA, Y. & HIRABAYASHI, Y. (2007) Identification and characterization of human ethanolaminephosphotransferase1. *J Lipid Res*, 48, 503-8.
- HORNEMANN, T., RICHARD, S., RUTTI, M. F., WEI, Y. & VON ECKARDSTEIN, A. (2006) Cloning and initial characterization of a new subunit for mammalian serine-palmitoyltransferase. *J Biol Chem*, 281, 37275-81.
- HORNEMANN, T., WEI, Y. & VON ECKARDSTEIN, A. (2007) Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? *Biochem J*, 405, 157-64.
- HUITEMA, K., VAN DEN DIKKENBERG, J., BROUWERS, J. F. & HOLTHUIS, J. C. (2004) Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *Embo J*, 23, 33-44.
- HURLE, J. M. (1988) Cell death in developing systems. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13, 55-86.
- HWANG, Y. H., TANI, M., NAKAGAWA, T., OKINO, N. & ITO, M. (2005) Subcellular localization of human neutral ceramidase expressed in HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 37-42.
- IKEDA, M., KIHARA, A. & IGARASHI, Y. (2004) Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 338-43.

- IKUSHIRO, H., HAYASHI, H. & KAGAMIYAMA, H. (2001) A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. Purification, characterization, cloning, and overproduction. *J Biol Chem*, 276, 18249-56.
- JECKEL, D., KARRENBAUER, A., BIRK, R., SCHMIDT, R. R. & WIELAND, F. (1990) Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett*, 261, 155-7.
- JECKEL, D., KARRENBAUER, A., BURGER, K. N., VAN MEER, G. & WIELAND, F. (1992) Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol*, 117, 259-67.
- JENNY, E. F. & GROB, C. A. (1953) *Helv Chim Acta*, 36, 1454.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KLENK, E. & FAILLARD, H. (1955) *Z Physiol Chem*, 299, 48.
- KIHARA, A., IKEDA, M., KARIYA, Y., LEE, E. Y., LEE, Y. M. & IGARASHI, Y. (2003) Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. *J Biol Chem*, 278, 14578-85.
- KIM, D. S., KIM, S. Y., MOON, S. J., CHUNG, J. H., KIM, K. H., CHO, K. H. & PARK, K. C. (2001) Ceramide inhibits cell proliferation through Akt/PKB inactivation and decreases melanin synthesis in Mel-Ab cells. *Pigment Cell Res*, 14, 110-5.
- KOHAMA, T., OLIVERA, A., EDSALL, L., NAGIEC, M. M., DICKSON, R. & SPIEGEL, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem*, 273, 23722-8.
- KOHNO, M., MOMOI, M., OO, M. L., PAIK, J. H., LEE, Y. M., VENKATARAMAN, K., AI, Y., RISTIMAKI, A. P., FYRST, H., SANO, H., ROSENBERG, D., SABA, J. D., PROIA, R. L. & HLA, T. (2006) Intracellular role for sphingosine kinase 1 in intestinal adenoma cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 26, 7211-23.
- KONTGEN, F., SUSS, G., STEWART, C., STEINMETZ, M. & BLUETHMANN, H. (1993) Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol*, 5, 957-64.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C. P., KUIJTEN, G. A., KEEHNEN, R. M., PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- LE STUNFF, H., GALVE-ROPERH, I., PETERSON, C., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J Cell Biol*, 158, 1039-49.

- LE STUNFF, H., PETERSON, C., LIU, H., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate and lipid phosphohydrolases. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 8-17.
- LIU, H., SUGIURA, M., NAVA, V. E., EDSALL, L. C., KONO, K., POULTON, S., MILSTIEN, S., KOHAMA, T. & SPIEGEL, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem*, 275, 19513-20.
- LIU, X., WU, H., LORING, J., HORMUZDI, S., DISTECHE, C. M., BORNSTEIN, P. & JAENISCH, R. (1997) Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn*, 209, 85-91.
- LOH, H. H., LAW, P. Y., OSTWALD, T., CHO, T. M. & WAY, E. L. (1978) Possible involvement of cerebroside sulfate in opiate receptor binding. *Fed Proc*, 37, 147-52.
- LUO, X., BUDIARDJO, I., ZOU, H., SLAUGHTER, C. & WANG, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94, 481-90.
- MACEYKA, M., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. (2005) Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 77, 15-22.
- MACEYKA, M., PAYNE, S. G., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. (2002) Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585, 193-201.
- MACEYKA, M., SANKALA, H., HAIT, N. C., LE STUNFF, H., LIU, H., TOMAN, R., COLLIER, C., ZHANG, M., SATIN, L. S., MERRILL, A. H., JR., MILSTIEN, S. & SPIEGEL, S. (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem*, 280, 37118-29.
- MALAGARIE-CAZENAVE, S., ANDRIEU-ABADIE, N., SEGUI, B., GOUAZE, V., TARDY, C., CUVILLIER, O. & LEVADE, T. (2002) Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death. *Expert Rev Mol Med*, 4, 1-15.
- MANDALA, S. M., FROMMER, B. R., THORNTON, R. A., KURTZ, M. B., YOUNG, N. M., CABELLO, M. A., GENILLOU, O., LIESCH, J. M., SMITH, J. L. & HORN, W. S. (1994) Inhibition of serine palmitoyl-transferase activity by lipoxamycin. *J Antibiot (Tokyo)*, 47, 376-9.
- MANDON, E. C., EHSES, I., ROTHER, J., VAN ECHTEN, G. & SANDHOFF, K. (1992) Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem*, 267, 11144-8.
- MAO, C., XU, R., SZULC, Z. M., BIELAWSKI, J., BECKER, K. P., BIELAWSKA, A., GALADARI, S. H., HU, W. & OBEID, L. M. (2003) Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: an enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. *J Biol Chem*, 278, 31184-91.

- MARINETTI, G. & STOTZ, E. (1954) *J Amer Chem Soc*, 76, 1347.
- MARTIN, S. J., NEWMeyer, D. D., MATHIAS, S., FARsCHON, D. M., WANG, H. G., REED, J. C., KOLESNICK, R. N. & GREEN, D. R. (1995) Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *Embo J*, 14, 5191-200.
- MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P., MCGAHON, A. J., RADER, J. A., VAN SCHIE, R. C., LAFACE, D. M. & GREEN, D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182, 1545-56.
- MATHIAS, S., PENA, L. A. & KOLESNICK, R. N. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J*, 335 (Pt 3), 465-80.
- MEDLOCK, K. A. & MERRILL, A. H., JR. (1988) Inhibition of serine palmitoyltransferase in vitro and long-chain base biosynthesis in intact Chinese hamster ovary cells by beta-chloroalanine. *Biochemistry*, 27, 7079-84.
- MERRILL, A. H., JR. (1983) Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta*, 754, 284-91.
- MERRILL, A. H., JR., NIXON, D. W. & WILLIAMS, R. D. (1985) Activities of serine palmitoyltransferase (3-ketosphinganine synthase) in microsomes from different rat tissues. *J Lipid Res*, 26, 617-22.
- MIN, J., VAN VELDHOVEN, P. P., ZHANG, L., HANIGAN, M. H., ALEXANDER, H. & ALEXANDER, S. (2005) Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. *Mol Cancer Res*, 3, 287-96.
- MISLOW, J. (1952) *J Amer Chem Soc*, 74, 5155.
- MIYAKE, Y., KOZUTSUMI, Y., NAKAMURA, S., FUJITA, T. & KAWASAKI, T. (1995) Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin. *Biochem Biophys Res Commun*, 211, 396-403.
- MIZUTANI, Y., KIHARA, A. & IGARASHI, Y. (2005) Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J*, 390, 263-71.
- MIZUTANI, Y., KIHARA, A. & IGARASHI, Y. (2006) LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem J*, 398, 531-8.
- NAGIEC, M. M., BALTISBERGER, J. A., WELLS, G. B., LESTER, R. L. & DICKSON, R. C. (1994) The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 7899-902.

- NAVA, V. E., CUVILLIER, O., EDSALL, L. C., KIMURA, K., MILSTIEN, S., GELMANN, E. P. & SPIEGEL, S. (2000) Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res*, 60, 4468-74.
- NEWRZELLA, D. & STOFFEL, W. (1996) Functional analysis of the glycosylation of murine acid sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 271, 32089-95.
- NEZNANOV, N., KOHWI-SHIGEMATSU, T. & OSHIMA, R. G. (1996) Contrasting effects of the SATB1 core nuclear matrix attachment region and flanking sequences of the keratin 18 gene in transgenic mice. *Mol Biol Cell*, 7, 541-52.
- NORTON, W. T. & PODUSLO, S. E. (1973) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem*, 21, 749-57.
- OBEID, L. M., LINARDIC, C. M., KAROLAK, L. A. & HANNUN, Y. A. (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259, 1769-71.
- OLIVERA, A., BARLOW, K. D. & SPIEGEL, S. (2000) Assaying sphingosine kinase activity. *Methods Enzymol*, 311, 215-23.
- OLIVERA, A., KOHAMA, T., EDSALL, L., NAVA, V., CUVILLIER, O., POULTON, S. & SPIEGEL, S. (1999) Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol*, 147, 545-58.
- OLIVERA, A. & SPIEGEL, S. (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365, 557-60.
- OSKOUIAN, B. & SABA, J. D. (2004) Death and taxis: what non-mammalian models tell us about sphingosine-1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 529-40.
- OSKOUIAN, B., SOORIYAKUMARAN, P., BOROWSKY, A. D., CRANS, A., DILLARD-TELM, L., TAM, Y. Y., BANDHUVULA, P. & SABA, J. D. (2006) Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17384-9.
- OTTERBACH, B. & STOFFEL, W. (1995) Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick Disease). *Cell*, 81, 1053-61.
- PEASE, S., BRAGHETTA, P., GEARING, D., GRAIL, D. & WILLIAMS, R. L. (1990) Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol*, 141, 344-52.
- PERRY, D. K. (1999) Ceramide and apoptosis. *Biochem Soc Trans*, 27, 399-404.
- PITSON, S. M., XIA, P., LECLERCQ, T. M., MORETTI, P. A., ZEBOL, J. R., LYNN, H. E., WATTENBERG, B. W. & VADAS, M. A. (2005) Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med*, 201, 49-54.

- QUINTERN, L. E., SCHUCHMAN, E. H., LEVRAN, O., SUCHI, M., FERLINZ, K., REINKE, H., SANDHOFF, K. & DESNICK, R. J. (1989) Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *Embo J*, 8, 2469-73.
- QUINTERN, L. E., WEITZ, G., NEHRKORN, H., TAGER, J. M., SCHRAM, A. W. & SANDHOFF, K. (1987) Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 922, 323-36.
- RAISOVA, M., HOSSINI, A. M., EBERLE, J., RIEBELING, C., WIEDER, T., STURM, I., DANIEL, P. T., ORFANOS, C. E. & GEILEN, C. C. (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*, 117, 333-40.
- RAO, B. G. & SPENCE, M. W. (1976) Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J Lipid Res*, 17, 506-15.
- REISS, U., OSKOUIAN, B., ZHOU, J., GUPTA, V., SOORIYAKUMARAN, P., KELLY, S., WANG, E., MERRILL, A. H., JR. & SABA, J. D. (2004) Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 1281-90.
- RICHARDS, R. L., MOSS, J., ALVING, C. R., FISHMAN, P. H. & BRADY, R. O. (1979) Cholera toxin (cholera toxin): a bacterial lectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1673-6.
- RIEBELING, C., ALLEGOOD, J. C., WANG, E., MERRILL, A. H., JR. & FUTERMAN, A. H. (2003) Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J Biol Chem*, 278, 43452-9.
- ROBERTSON, G., GARRICK, D., WILSON, M., MARTIN, D. I. & WHITELAW, E. (1996) Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res*, 24, 1465-71.
- SABA, J. D., NARA, F., BIELAWSKA, A., GARRETT, S. & HANNUN, Y. A. (1997) The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. *J Biol Chem*, 272, 26087-90.
- SARTORIUS, U., SCHMITZ, I. & KRAMMER, P. H. (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*, 2, 20-9.
- SAUER, B. (1993) Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase. *Methods Enzymol*, 225, 890-900.
- SCHENGRUND, C. L., DASGUPTA, B. R. & RINGLER, N. J. (1991) Binding of botulinum and tetanus neurotoxins to ganglioside GT1b and derivatives thereof. *J Neurochem*, 57, 1024-32.
- SCHULTE, S. & STOFFEL, W. (1993) Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10265-9.

- SGONC, R., BOECK, G., DIETRICH, H., GRUBER, J., RECHEIS, H. & WICK, G. (1994) Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet*, 10, 41-2.
- SHIMABUKURO, M., HIGA, M., ZHOU, Y. T., WANG, M. Y., NEWGARD, C. B. & UNGER, R. H. (1998) Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem*, 273, 32487-90.
- SKULACHEV, V. P. (2000) How proapoptotic proteins can escape from mitochondria? *Free Radic Biol Med*, 29, 1056-9.
- SMITH, A. G., HEATH, J. K., DONALDSON, D. D., WONG, G. G., MOREAU, J., STAHL, M. & ROGERS, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-90.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- SOMMER, I. & SCHACHNER, M. (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol*, 83, 311-27.
- SPRINSON, D. B. & COULON, A. (1954) The precursors of sphingosine in brain tissue. *J Biol Chem*, 207, 585-92.
- SPRONG, H., KRUIHOF, B., LEIJENDEKKER, R., SLOT, J. W., VAN MEER, G. & VAN DER SLUIJS, P. (1998) UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase is a class I integral membrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 273, 25880-8.
- STECK, A. J. (2000) Auto-antibody tests in peripheral neuropathies: pros and cons. *J Neurol*, 247, 423-8.
- STERNBERG, N. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J Mol Biol*, 150, 603-8.
- STERNBERG, N. & HAMILTON, D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, 150, 467-86.
- STERNBERG, N., HAMILTON, D., AUSTIN, S., YARMOLINSKY, M. & HOESS, R. (1981) Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 45 Pt 1, 297-309.
- STERNBERG, N., HAMILTON, D. & HOESS, R. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol*, 150, 487-507.

- STOFFEL, W. & ASSMANN, G. (1970) Metabolism of sphingosine bases. XV. Enzymatic degradation of 4t-sphingenine 1-phosphate (sphingosine 1-phosphate) to 2t-hexadecen-1-al and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 351, 1041-9.
- STOFFEL, W. & BOSIO, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 654-61.
- STOFFEL, W., HELLENBROICH, B. & HEIMANN, G. (1973) Properties and specificities of sphingosine kinase from blood platelets. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 354, 1311-6.
- STOFFEL, W., LEKIM, D. & STICHT, G. (1967) Metabolism of sphingosine bases. IV. 2-Amino-1-hydroxyoctadecane-3-one (3-oxodihydrosphingosine), the common intermediate in the biosynthesis of dihydrosphingosine and sphingosine and in the degradation of dihydrosphingosine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 348, 1570-4.
- STOFFEL, W., LEKIM, D. & STICHT, G. (1968) Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 349, 664-70.
- STOFFEL, W., LEKIM, D. & STICHT, G. (1968) Metabolism of sphingosine bases. 8. Distribution, isolation and properties of D-3-oxosphinganine reductase. Stereospecificity of the NADPH-dependent reaction of 3-oxodihydrosphingosine (2-amino-1-hydroxyoctadecane-3-one). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 349, 1637-44.
- STOFFEL, W., LEKIM, D. & STICHT, G. (1969) Distribution and properties of dihydrosphingosine-1-phosphate aldolase (sphinganine-1-phosphate alkanal-lyase). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 350, 1233-41.
- STOFFEL, W., STICHT, G. & LEKIM, D. (1968) Synthesis and degradation of sphingosine bases in *Hansenula ciferrii*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 349, 1149-56.
- SUNDARAM, K. S. & LEV, M. (1984) Comparative inhibition of bacterial and microsomal 3-ketodihydrosphingosine synthetases by L-cycloserine and other inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, 26, 211-3.
- SVENNERHOLM, L. (1963) Chromatographic Separation Of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem*, 10, 613-23.
- TANI, M., IIDA, H. & ITO, M. (2003) O-glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein. *J Biol Chem*, 278, 10523-30.
- TE RIELE, H., MAANDAG, E. R. & BERNIS, A. (1992) Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5128-32.
- THOMAS, K. R. & CAPECCHI, M. R. (1986) Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature*, 324, 34-8.
- THUDICHUM, J. L. W. (1882) *J prakt Chem*, 25, 19.

- TYBULEWICZ, V. L., CRAWFORD, C. E., JACKSON, P. K., BRONSON, R. T. & MULLIGAN, R. C. (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, 65, 1153-63.
- VAN DEURSEN, J. & WIERINGA, B. (1992) Targeting of the creatine kinase M gene in embryonic stem cells using isogenic and nonisogenic vectors. *Nucleic Acids Res*, 20, 3815-20.
- VAN VELDHOVEN, P. P. (2000) Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol*, 311, 244-54.
- VAN VELDHOVEN, P. P., GIJSBERS, S., MANNAERTS, G. P., VERMEESCH, J. R. & BRYNS, V. (2000) Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta*, 1487, 128-34.
- VAN VELDHOVEN, P. P. & MANNAERTS, G. P. (1991) Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. *J Biol Chem*, 266, 12502-7.
- VENKATARAMAN, K., RIEBELING, C., BODENNEC, J., RIEZMAN, H., ALLEGOOD, J. C., SULLARDS, M. C., MERRILL, A. H., JR. & FUTERMAN, A. H. (2002) Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem*, 277, 35642-9.
- VENTO, R., GIULIANO, M., LAURICELLA, M., CARABILLO, M., DI LIBERTO, D. & TESORIERE, G. (1998) Induction of programmed cell death in human retinoblastoma Y79 cells by C2-ceramide. *Mol Cell Biochem*, 185, 7-15.
- VON HAEFEN, C., WIEDER, T., GILLISSEN, B., STARCK, L., GRAUPNER, V., DORKEN, B. & DANIEL, P. T. (2002) Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene*, 21, 4009-19.
- WEI, M. C., ZONG, W. X., CHENG, E. H., LINDSTEN, T., PANOUTSAKOPOULOU, V., ROSS, A. J., ROTH, K. A., MACGREGOR, G. R., THOMPSON, C. B. & KORSMEYER, S. J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292, 727-30.
- WEISS, B. (1963) The biosynthesis of sphingosine. I. A study of the reaction with tritium-labeled serine. *J Biol Chem*, 238, 1953-9.
- WEISS, B. & STOFFEL, W. (1997) Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem*, 249, 239-47.
- WILLIAMS, G. T. (1991) Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65, 1097-8.

- WILLIAMS, R. D., WANG, E. & MERRILL, A. H., JR. (1984) Enzymology of long-chain base synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 228, 282-91.
- WRIGHT, S. C., ZHENG, H. & ZHONG, J. (1996) Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *Faseb J*, 10, 325-32.
- XU, R., JIN, J., HU, W., SUN, W., BIELAWSKI, J., SZULC, Z., TAHA, T., OBEID, L. M. & MAO, C. (2006) Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *Faseb J*, 20, 1813-25.
- YASUDA, S., NISHIJIMA, M. & HANADA, K. (2003) Localization, topology, and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J Biol Chem*, 278, 4176-83.
- YUKI, N. (2001) Infectious origins of, and molecular mimicry in, Guillain-Barre and Fisher syndromes. *Lancet Infect Dis*, 1, 29-37.
- ZABIN, I. & MEAD, J. F. (1953) The biosynthesis of sphingosine. I. The utilization of carboxyl-labeled acetate. *J Biol Chem*, 205, 271-7.
- ZABIN, I. & MEAD, J. F. (1954) The biosynthesis of sphingosine. II. The utilization of methyl-labeled acetate, formate, and ethanolamine. *J Biol Chem*, 211, 87-93.
- ZHOU, J. & SABA, J. D. (1998) Identification of the first mammalian sphingosine phosphate lyase gene and its functional expression in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 242, 502-7.
- ZWEERINK, M. M., EDISON, A. M., WELLS, G. B., PINTO, W. & LESTER, R. L. (1992) Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem*, 267, 25032-8.

Zusammenfassung

Die Serin Palmitoyl-CoA-Transferase (spt) stellt das Schlüsselenzym im Sphingolipidmetabolismus dar. Die von spt katalysierte Reaktion ist die Kondensation von Serin mit Palmitoyl-CoA unter Bildung von 3-Oxosphinganin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konstrukt zur heterologen Expression von spt in HEK293 Zellen erstellt. In diesem Konstrukt wurde spt am N-Terminus mit EGFP fusioniert, so daß eine Visualisierung des Enzyms möglich war.

Das Konstrukt wurde in der Arbeit zur näheren Charakterisierung der spt verwendet. Dafür wurden SPT-Aktivitätsmessungen an den HEK293 Zellen mit [U-¹⁴C]-Serin und [1-¹⁴C]-Palmitinsäure durchgeführt. Desweiteren wurden Veränderung des Lipidstoffwechsels untersucht. Dafür wurde ein *in vivo*-Assay mit [1-¹⁴C]-Palmitinsäure durchgeführt, durch den eine Zunahme des Glucocerebrosids beim spt-Klon im Vergleich zu den WT-Zellen festgestellt wurde. Weder änderten sich die Ceramid-, noch die Sphingomyelin-Konzentrationen. Gebildetes Ceramid wird offenbar schnell weiter zu Cerebrosiden metabolisiert. Diese Beobachtung erweitert unsere Kenntnisse über den Effekt der Zunahme der Dihydrosphingosin-Synthese.

Veränderungen der Expression anderer Gene des Sphingolipidmetabolismus sind untersucht worden. Eine Verringerung des longevity assurance homologe gene (lass) 2 scheint entweder durch Repression durch spt, oder das verstärkt gebildete Ceramid ausgelöst zu werden. Diese Ergebnisse zeigten die Anpassung der Gene des Sphingolipidstoffwechsels an die erhöhte spt-Expression als Regulationsmechanismus.

Zusätzlich wurde nachgewiesen, daß eine Überexpression von spt keine Apoptose auslöst.

Es wurde eine vergleichende Analyse des Katabolismus durch Verwendung der Enzyme Sphingosin-1-Phosphat Lyase und Sphingosinkinase durchgeführt. Auch bei der Lyase wurde eine Anpassung der Gene des Sphingolipidstoffwechsels an eine verstärkte Lyase-Aktivität gefunden. Im heterologen Expressionssystem wurden sowohl lass 2, als auch lass 6 verringert exprimiert.

Um die Bedeutung der kürzlich entdeckten neuen Untereinheit sptlc3 des spt-Komplexes in der Maus zu untersuchen, wurde deren Expression in verschiedenen Mausorganen kontrolliert. Da die Expression weit unter der von sptlc2 lag, bzw nicht vorhanden war, wurde ausgeschlossen, daß durch eine vermehrte sptlc3-Expression eine sptlc2 Deletion ausgeglichen werden kann.

Zum besseren Verständnis der Bedeutung von *spt*, sollte eine induzierbare konditionelle *spt* defiziente Mausmutante generiert werden. Dafür wurde ein *replacement* Vektor homolog rekombiniert in embryonale Stammzellen eingebracht. Die Rekombination trat in den vorliegenden homolog rekombinierten Klonen nur unvollständig auf, so daß eine Analyse des Mausmodells nicht möglich war. Durch die Klonierung eines neuen *replacement* Vektors wurden die Rahmenbedingungen für die Generierung eines *spt null* Mausmodells geschaffen. Durch Vorkern-Injektion sollte zudem eine leberspezifisch Cre exprimierende Mauslinie generiert werden. Der verwendete Vektor entsprach dem „tet on“ System, was eine Induktion von Cre nach Doxycyclin-Gabe ermöglichen sollte. Die Analyse der Mauslinie zeigte jedoch eine fehlende Cre-Expression.

Abstract

Serine palmitoyltransferase (spt) is the key enzyme of sphingolipid metabolism. Spt catalyses the condensation of serine with palmitoyl CoA to form 3-oxosphinganine, which is further transformed into shingosine containing ceramides

In this study a vector construct was established for heterologous expression in HEK293 cells. Spt was fused to the EGFP at the N-terminal end for visualization by fluorescence microscopy. The construct was used for the characterisation of SPTt-activity For quantification radioactive labeled [U-¹⁴C]-serine and [1-¹⁴C]-palmitic acid were used in HEK293 cells. Studies on sphingolipid metabolism were carried out in *in vivo* assay-systems with [1-¹⁴C]-palmitic acid. An elevated synthesis of glucocerebroside in the spt clone compared to the wildtype was observed but no change in ceramide- and sphingomyelin levels. Newly synthesised ceramide is apparently rapidly metabolised to cerebroside to prevent the toxic effect of the free long chain base. These observations expand our view on the regulation of dihydrosphingosine synthase.

Changes in the expression of other genes from the sphingolipid metabolism have been tested. A decrease of longevity assurance homologue gene (lass) 2 has been found which can be explained either through direct repression by spt or negative feedback by the newly synthesised ceramide. These results showed the regulatory role of spt expression on genes involved in sphingolipid metabolism.

Importantly, no apoptosis could be detected in the clone overexpressing spt.

A comparative analysis for the catabolic enzymes sphingosine-1-phosphate lyase and sphingosinase was made. Also in the lyase clone an adjustment of the genes active in sphingolipid metabolism was found such as a decrease of lass 2 and lass 6.

The role of the newly identified subunit sptlc3 was analyzed in the mouse by studies of the expression of the subunit in several tissues. Because the expression was far below or absent in some cases, a deleted sptlc2 expression as intended in a conditional spt null mouse will show the interrelationship between the two isozyme expression..

For the generation of a conditional spt knock out mouse a replacement vector was constructed for homologous recombination in ES-cell. Since the two homologously recombined clones were incomplete, a new targeting construct for generating a mouse mutant was established.

A transgenic mouse line, which directs cre-recombinase expression liver-specifically, was generated by pronuclear injection. This vector uses the “tet on” system, which is inducible by doxycycline. The analysis of the transgenic mice obtained so far showed no cre expression.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. mult. Stoffel betreut worden.

Ina Hammels

Köln, den 04.02.2009