Die Rolle der nSMase3 in der Regulation des postnatalen Wachstums der Maus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von Thomas Franz Kwasny aus Olesno, Polen

Köln 2012

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens C. Brüning Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 05. 2012

Für Kamila

Reich wird man erst durch Dinge, die man nicht begehrt-

Mohandas Karamchand Ghandi

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Sphingolipide	1
1.1.1 Ceramide	1
1.2 Sphingomyelinasen (SMasen)	3
1.2.1 Saure SMase (aSMase)	4
1.2.2 Basische Sphingomyelinase (bSMase)	5
1.3 Neutrale Sphingomyelinasen (nSMasen)	5
1.3.1 Neutrale Sphingomyelinase1 (nSMase1)	6
1.3.2 Neutrale Sphingomyelinase2 (nSMase2)	6
1.3.3 Neutrale Sphingomyelinase 3 (nSMase3)	9
1.3.4 Rolle der nSMase3 in zellulären Signalwegen	9
1.4 Die Tumornekrosefaktor (TNF) Signalkaskade	10
1.5 Die Rolle der nSMasen im endokrinen System	11
1.6 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Chemikalien	

	2.1.2 Puffer und Lösungen	15
	2.1.3 Enzyme	17
	2.1.4 Längenstandards	18
	2.1.5 Kits	19
	2.1.6 RNA Northern Blots	20
	2.1.7 Vektoren	20
	2.1.8 Sonden für Southern- und Northern- Blot-Analysen	21
	2.1.9 Oligonukleotide	21
	2.1.10 Verwendete Bakterien	24
	2.1.11 Verwendete Zelllinien	25
2.	2 Methoden	26
	2.2.1 Molekularbiologische Methoden	26
	2.2.2 Biochemische Methoden	30
	2.2.3 Zellbiologie	30
	2.2.4 Versuchstierarbeiten	33
3. E	rgebnisse	36
3.	1 Funktionelle Charakterisierung der nSMase3 in vitro	36
3. 	2 Expression der nSMase 3 in neuronalen und reproduktiven Geweben der Ma	ius 40
3.	3 Generierung eines loxP-flankierten nSMase3 Allels in der Maus	41
3.	4 Generierung von nSMase3 defizienten Mäusen (nSMase3 ^{Δ/Δ})	44
3.	5 nSMase3 Defizienz führt zu hoher postnataler Sterblichkeit in Mäusen	49

3.6 Knochenstruktur von nSMase3 ^{∆/∆} Mäusen ähnelt dem Aufbau der Wildtyp- Mäuse, unterscheidet sich jedoch in der Länge der Knochen
3.7 nSMase3 ^{Δ/Δ} Mäuse zeigen partielle Veränderungen in der mRNA Expression von Wachstumshormonen in endokrinen Organen der Wachstumsachse
3.8 Ablation der nSMase3 in Mäusen führt zu reduzierter IGF1 Konzentration im Serum
3.9 nSMase3 Defizienz führt zu einer gestörten Spermatogenese
3.10 Generierung einer konditional induzierbaren nSMase3 Defizienz in der Maus
3.11 Mäuse mit induzierbarer Deletion der nSMase3 weisen keinen
Wachstumsphänotyp auf61
4. Diskussion
4.1 Die Rolle des C-Terminus der nSMase3 für die zelluläre Lokalisation65
4.2 nSMase3-defiziente Mäuse leiden an verzögertem Wachstum und weisen eine erhöhte Sterblichkeit auf
4.3 Eine nSMase3 Defizienz führt zu gestörter Spermatogenese
4.4 Inaktivierung der nSMase3 verändert die Lipid-zusammensetzung von spezifischen Organen
5. Literaturverzeichnis
Danksagung
Erklärung
Lebenslauf

Zusammenfassung

Ein wichtiger Effekt von diversen Stimuli, wie Zytokinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Stress, ist die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Diese Reaktion wird durch die Familie der Sphingomyelinasen (SMasen) katalysiert. Es sind mindestens 7 verschiedene SMasen identifiziert, die sich in ihrem pH Optimum (saure, basi oder neutrale SMasen) und Kation-Abhängigkeit unterscheiden. Jedoch ist die physiologische Bedeutung vieler Mitglieder dieser Proteinfamilie noch weitestgehend unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die neutrale, Mg²⁺-abhängige nSMase3 der Maus in vivo charakterisiert, welche im ER und Golgi lokalisiert ist. Zur Analyse der physiologischen Rolle der nSMase3 wurde in dieser Arbeit eine nSMase3 defiziente Maus (nSMase3^{Δ/Δ}) generiert. Dazu wurde ein Targeting-Vektor erstellt, der einen kurzen und einen langen Homologiearm, ein Neomycingen, ein Thymidinkinase Gen und loxP flankierte Exone 4 bis 8 der nSMase3 beinhaltet. Eine durch die Cre-Rekombinase vermittelte DNA-Rekombination führt zur Deletion der loxP flankierten Exone und somit zur Inaktivierung des nSMase3 Gens. Der komplette Verlust der nSMase3 führte zu einem teilweise pränatal letalen Phänotyp mit einer starken Verzögerung des postnatalen Wachstums. Zudem wiesen nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse eine gestörte Spermatogenese auf und zeigten eine veränderte Lipidkomposition der Leber, des weißem Fettgewebes und des Hodens. Expressionsanalysen der nSMase3 in diversen Mausgeweben zeigten eine starke Expression der nSMase3 in neuronalen und reproduktiven Geweben. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die endokrinen Achsen in nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen untersucht. Die Ursache für die beobachtete Wachstumsverzögerung nach dem Verlust der nSMase3 kann auf eine signifikant reduzierte IGF1 Serumkonzentration in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen zurückgeführt werden. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Infertilität der männlichen Mäuse auf einer unvollständigen Spermatogenese basiert, die durch eine stark reduzierte Testosteron-Produktion hervorgerufen wird. Zusammengefasst unterstreichen diese Ergebnisse die zentrale Rolle der Sphingomyelinasen in der systemischen endokrinen Regulation und identifizieren die nSMase3 als zentralen Regulator der Wachstumsachse und der Fertilität.

Abstract

An important cellular effect of various stimuli such as cytokines, G protein-coupled receptors and stress, is the hydrolysis of sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine. This reaction is catalyzed by the family of sphingomyelinases (SMases). Currently 7 different SMases are identified which differ in their pH optimum (acid, basic or neutral SMases) and cation dependency. However, the physiological significance of many members of this family of proteins is still largely unknown.

In this study, the neutral, Mg²⁺dependent nSMase3 that is localized in the endoplasmatic reticulum and Golgi network was characterized *in vivo*. To analyze the physiological role of nSMase3, a conventional knockout mouse was generated. Upon Cre-mediated recombination, exons 4-8 were deleted, thus inactivating the nSMase3 gene. The complete loss of nSMase3 caused a pleiotropic, partially prenatally lethal phenotype with a strong delay of postnatal growth. In addition, nSMase3 deficient animals exhibited an impaired spermatogenesis and altered lipid composition of liver, white adipose tissue and testis.

Expression analysis of nSMase3 in various mouse tissues revealed that the nSMase3 is highly expressed in neuronal and reproductive tissues. Due to these findings, the endocrine axes were examined in nSMase3 deficient animals. The growth delay in nSMase3 deficient animals correlated to significantly reduced serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF1), which is a crucial regulator of growth. In addition the present data suggest that the infertility of the males is due to an incomplete spermatogenesis, characterized by greatly reduced testosterone production. Taken together, these results underscore the central role of sphingomyelinases in the systemic endocrine regulation and identify nSMase3 as a central regulator of spermatogenesis and the growth axis.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid / Desoxyribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA
C-Terminus	carboxyl-terminus
Cer	Ceramid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dNTP	desoxynucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EF	Embryonale Fibroblasten
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et alii
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	fetal calf serum
GTT	Glukose-Toleranz-Test
h	Stunde
НА	Human influenza hemagglutinin
ІТТ	Insulin-Toleranz-Test
Kb	Kilobasen
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar

mRNA	messenger RNA
mV	Milivolt
ng	Nano Gram
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
Ω	Ohm
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PS	Phosphatidylserin
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time quantitative PCR
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMPD	Sphingomyelin Phosphodiesterasen
SM	Sphingomyelin
sog.	Sogennant
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF	tumor necrosis factor
U	unit
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht

μg Mikrogramm

μF Mikrofarad

µl Mikroliter

- V Volt
- z.B. zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Sphingolipide

Sphingolipide gehören neben Phosphoglyceriden, aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung zu den Phospholipiden, welche wiederum die größte Hauptklasse der Membranlipide darstellen (Hannun et al., 1986). Phospholipide bestehen grundsätzlich aus einem Phosphatrest und zwei Fettsäuren welche am Glycerol-Grundgerüst gebunden sind. Die häufigsten, in einer Zellmembran vorkommenden Phospholipide sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS), welche mit weiteren Molekülen am Phosphatrest modifiziert sind. Im Gegensatz zu diesen auf Glycerol basierenden Molekülen besteht das Grundgerüst der Sphingolipide aus einem C:18 Aminoalkohol und dem Sphingosin (Ss). Sphingolipide werden in drei Hauptgruppen unterteilt: Ceramide (Cer), Sphingomyeline (SM) und Glycosphingolipide (GSP). Die Cer bestehen aus einem Sphingosinmolekül, das über eine Amidbindung am α -Kohlenstoff-Atom (α -C-Atom) an eine Fettsäure gebunden ist. Ist bei Cer am ersten Kohlenstoffatom des Sphingosin-Gerüstes ein Phosphocholin oder ein Zuckerrest gebunden, so handelt es sich um SM oder respektive ein Glycosphingolipid (Kolesnick et al., 2000).

Seit ihrer Entdeckung 1876 galten die Sphingolipide lange Zeit als biologisch inaktive Strukturkomponenten von Zellmembranen bzw. Permeabilitätsschranken zur extrazellulären Umgebung. Die Forschungsstudien der letzten Jahrzehnte über den Metabolismus und die Funktionen von Sphingolipiden zeigen, dass Sphingolipide eine wichtige Rolle bei der Regulierung einer Vielzahl von Signalwegen spielen (Adam-Klages et al., 1996; Hannun et al., 1986; Kim et al., 2009; Morales et al., 2007; Ogretmen and Hannun, 2004)

1.1.1 Ceramide

In der Gruppe der Sphingolipide sind die Cer als wichtige Signalmoleküle identifiziert und ihre zelluläre Funktion am intensivsten untersucht worden. So sind sie an diversen Vorgängen, wie Zellzyklusarrest, Differenzierung, Seneszenz, Apoptose und Inflammation beteiligt (Chalfant and Spiegel, 2005; El Alwani et al., 2006; Hannun and Obeid, 2008; Modrak et al., 2006). Ebenso steigern praktisch alle Stressstimuli (z.B. Entzündungsmediatoren, Hitze, UV-Strahlung, Hypoxie, Chemotherapeutika und oxidativer Stress) die Cer-Produktion als Teil einer evolutionär konservierten Zellreaktion (Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Li et al., 2010; Rozenova et al., 2010; Sawai and Hannun, 1999). Die Synthese von Cer kann hierbei auf verschiedenen Wegen erfolgen: Durch die Hydrolyse von SM mittels Sphingomyelinasen (SMasen) an der Zellmembran, der *de novo*-Synthese (am endoplasmatischen Retikulum) oder dem Abbau von Glycosphingolipiden in Lysosomen (Abb.1.1), (Ruvolo, 2003).



Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des Sphingolipid-Metabolismus. Abgewandelt von (Mullen et al., 2012)

Die *de novo*-Synthese ist der am besten verstandene Prozess zur Generierung der Ceramide. Diese beginnt mit der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT) katalysierten Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A zu 3-Keto-Sphingosin (3KSph) (Park et al., 2004). Die drei folgenden enzymatischen Reaktionen werden von 3-Keto-Sphingosin Reduktase (3-KR), (dihydro)Cer Synthase (CerS) und Dihydroceramid Desaturase (DES1 und -2) katalysiert. Diese Enzyme wandeln die

Intermediate Dihydrosphingosin (dHSph) und Dihydroceramid (dHCer) in Cer um (Bikman and Summers, 2011). Limitierender Faktor für die Neusynthese sind die Vorkommen von Serin und Palmitinsäure (sowie die Enzymaktivitäten aller beteiligten Enzyme). Im sogenannten "salvage-pathway" wird Cer durch Enzyme wie Sphingomyelin-Synthase, Glycosylceramid- bzw. Galactosylceramid Synthase und die Ceramidase oder Ceramid-Kinase im Endolysosom auf- und abgebaut (Bartke and Hannun, 2009; Jenkins et al., 2009). Der dritte und letzte Weg ist die Hydrolyse der SM durch die verschiedenen SMasen (Abb.1.2) (Wu et al., 2010a).



Abbildung 1.2: Die verschiedenen Wege der Ceramid-Synthese. Die Generierung von Cer kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: A, durch die *de novo*-Synthese im endoplasmatischen Retikulum, welche abhängig von der Verfügbarkeit von Palmitat und Serin ist. Oder B, durch die SM Hydrolyse und C, durch den sog. "salvage-pathway" (abgewandelt von (Bikman and Summers, 2011)).

1.2 Sphingomyelinasen (SMasen)

SMasen gehören zur Familie der Phosphodiesterasen und katalysieren die Hydrolyse von SM unter Bildung von Cer und Freisetzung von Phosphocholin (Abb.1.3). Die Enzymfamilie ist aufgrund des Phospholipase-C-ähnlichen Hydrolysemechanismus eines einzigen Substrates, des SM, funktionell definiert (Goni and Alonso, 2002). Die Enzymfamilie wird unterteilt in drei Hauptklassen: die sauren, neutralen und die basischen SMasen. Diese unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung, ihrer subzellulären Lokalisation, ihren enzymatischen Eigenschaften und ihrer Regulation.

1.2.1 Saure SMase (aSMase)

Die saure SMase (aSMase) war die erste klonierte (Ferlinz et al., 1991) und auf molekularer Basis beschriebene SMase (Kanfer et al., 1966). Bei diesem Enzym handelt es sich um ein hitzestabiles, ubiguitär exprimiertes Glycoprotein, welches in den Lysosomen lokalisiert ist. Dadurch erreicht es seine optimale Aktivität bei pH=5. Die aSMase wird durch TNF- und IL-1-Rezeptoren aktiviert (Cifone et al., 1994; Gulbins et al., 1995; Schutze et al., 1992; Wiegmann et al., 1994). Das dabei entstehende Cer führt u.a. zu einer Verdrängung von Cholesterin aus den lipid rafts (Wang et al., 2004). Durch die Tendenz der Ceramidmoleküle zur Selbstaggregation, einer Verschmelzung der *lipid rafts* kommt es zu zu ceramidreichen Membranplattformen (Brady et al., 1966; Gulbins and Kolesnick, 2003). Diese Plattformen weisen eine hohe Dichte von Rezeptoren auf, was deren effiziente Oligomerisierung erlaubt. Daher führt eine aSMase Defizienz zu einer ineffizienten Signalweiterleitung, da eben diese Oligomerisierung beeinträchtigt wird (Gulbins and Kolesnick, 2003). Weiterhin führt der gestörte lysosomale Abbau zu vielfältigen Erkrankungen. Die bekannteste ist die Niemann-Pick Krankheit, die durch die genetische Defizienz der aSMase verursacht wird (Brady et al., 1966; Schuchman, 2007). Patienten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung reichern vor allem in den Lysosomen des retikuloendothelialen Systems von Hirn, Leber und Milz SM an (Barnholz et al., 1966; Gatt, 1966; Horinouchi et al., 1995; Otterbach and Stoffel, 1995). Die Mutagenese der aSMase in Mäusen führt zu einem ähnlichen Phänotyp (Horinouchi et al., 1995).





1.2.2 Basische Sphingomyelinase (bSMase)

Die basische SMase (bSMase) wird ausschließlich im interstitialen Trakt exprimiert und benötigt Gallensalze für ihre Aktivität. Der Mangel dieses Enzyms konnte mit der Entstehung von Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht werden (Nilsson and Duan, 1999).

1.3 Neutrale Sphingomyelinasen (nSMasen)

Neutrale SMase-Aktivität wurde zum ersten Mal in Zellen von Patienten mit der Niemann-Pick Krankheit, welche für die saure SMase defizient waren und dennoch SMase Aktivität aufwiesen, entdeckt (Schneider and Kennedy, 1967). Jedoch konnte erst 20 Jahre später die erste nSMase aus einem Bakterium isoliert und kloniert werden (Coleman et al., 1986). Bis zur Klonierung der ersten nSMase (nSMase1) aus Säugern verging eine weitere Dekade (Tomiuk et al., 1998; Tomiuk et al., 2000). Nachfolgend wurden die nSMase Homologa ISC1 aus dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* (Sawai et al., 1999) und die CSS1 nSMase aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert (Feoktistova et al., 2001). Die nSMase2 wurde im Jahr 2000 (Hofmann et al., 2000) und die nSMase3 im Jahr 2006 (Krut et

al., 2006) in Säugetieren identifiziert und kloniert. Die nSMase3 zeigt wenig Homologie zu den anderen nSMasen, weist aber eine hohe Konservierung zwischen allen untersuchten Spezies auf (Krut et al., 2006). Zuletzt wurde im Jahr 2009 eine mitochondriale nSMase aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*) (Yabu et al., 2009) und ihr Pendant in Säugetieren, genannt die Mitochondrien-assozierte nSMase (MAnSMase) isoliert (Wu et al., 2010a; Wu et al., 2010b).

1.3.1 Neutrale Sphingomyelinase1 (nSMase1)

Die Magnesiumionen-abhängige nSMase1 ist die erste klonierte nSMase (Tomiuk et al., 1998; Tomiuk et al., 2000). Bei der *in vivo* Mutagenese dieses Enzyms zeigten nSMase1^{Δ/Δ} Mäuse keine phänotypischen Auffälligkeiten oder Veränderungen im Lipidstoffwechsel (Zumbansen and Stoffel, 2002). Zudem konnte der Nachweis erbracht werden, dass diese SMase physiologisch nicht als nSMase fungiert, sondern bei der Aktivierung von Blutplättchen bzw. deren Aggregation von Wichtigkeit ist (Sawai et al., 1999).

1.3.2 Neutrale Sphingomyelinase2 (nSMase2)

Über konservierte Sequenzmotive zu einer bakteriellen SMase konnte die nSMase2 über bioinformatische Analysen identifiziert werden (Hofmann et al., 2000) und gehört mittlerweile zu den am besten untersuchten nSMasen. Die cDNA der nSMase 2 kodiert für ein Protein von 655 Aminosäuren (AS) mit einer berechneten Masse von 71 kDa. Das Enzym besitzt am C-Terminus eine konservierte katalytische Domäne und am N-Terminus zwei hydrophobe Transmembrandomänen, gefolgt von einer 200 AS-langen Verbindungsregion, die potentiell Tripelhelices ausbilden kann (kollagenartige Domäne, Abb.1.4) (Hofmann et al., 2000).

Zusätzlich ist die nSMase2 an zwei Cystein-Gruppen palmitoyliert. Eins dieser Cysteine befindet sich zwischen den zwei hydrophobischen Segmenten und das zweite ist in der katalytischen Region lokalisiert. In Mutagenese-Experimenten wurde gezeigt, dass die Palmitoylierung der nSMase2 essentiell für deren Proteinstabilität und Lokalisierung in der Plasmamembran ist. (Tani and Hannun, 2007b). Obwohl ursprünglich die N-terminalen hydrophobischen Regionen als Transmembran-Domänen deklariert wurden, zeigten anschließende Studien der Enzym-Topologie, dass diese hydrophoben Regionen zwar in die Membran integriert sind, diese aber

nicht vollständig durchspannen (Tani and Hannun, 2007a). Die Lokalisierung der Nterminalen Palmitoylierungs-Regionen zwischen beiden hydrophoben Segmenten weist daraufhin, dass die Palmitoylierung nur auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran (PM) stattfinden kann (Tani and Hannun, 2007b).



Abbildung 1.4: Domänen-Struktur von Mitgliedern der eukaryotischen nSMase Enzym Familie. Gezeigt ist die schematische Darstellung der bekannten funktionellen Domänen der ISC1 aus der S.cerevisiae (Genbank, P40015), humane nSMase1 (O60906), humane nSMase2 (Q9NY59) und die murine MA-nSMase (NP_001182466). HD: Hydrophobische Domäne, MB: Mg²⁺ Bindungsdomäne, TM: Transmembrandomäne, PL: P-loop like Domäne, MS: potentielles mitochondriales Signalpeptid, PLB: Phospholipid Bindungsstelle, PB: potentielle Protein Interaktions Domäne (abgewandelt von (Clarke et al., 2011)).

Die enzymatische Charakterisierung der nSMase2 zeigte eine spezifische SM Mq²⁺-Ionen neutralen pH-Bereich, abhängig von und Spaltung im dem Stimulierung wird Redoxpotential. Eine der nSMase2 durch anionische Phospholipide, Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylethanolamine (PE), Diphosphatidylglycerine ungesättigte Fettsäuren, insbesondere sowie Arachidonsäure erreicht (Marchesini et al., 2003). Inhibiert wird die nSMase2 in vitro und in vivo durch den synthetischen Inhibitor GW 4869. Heterologe Expression der nSMase2 cDNA führte in MCF-7 Zellen zu einer Steigerung der spezifischen SMase Aktivität (40% niedrigere SM-Level und um 60% erhöhte Cer-Level) (Marchesini et al., 2003). Bestätigt wurden diese Ergebnisse in primären Hepatozyten (Karakashian et al., 2004). RNA- und Proteinexpressionsstudien zeigten auf, dass die nSMase2 hauptsächlich im Hirn detektiert wurde (Hofmann et al., 2000). Immunofluoreszenz-

7

Experimente an verschiedenen Zelllinien zeigten zuerst eine Lokalisation des rekombinanten Proteins im Golgi-Apparat (Hofmann et al., 2000). Darauffolgende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das nSMase2-Protein hauptsächlich in der PM lokalisiert ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PM Lokalisation nach Stimulation mit TNF oder H_2O_2 in konfluenten Zellen gesteigert werden kann (Clarke et al., 2006; Clarke et al., 2007; Levy et al., 2006; Marchesini et al., 2004). Publizierte Daten weisen darauf hin, dass die nSMase2 auf der zytosolischen Seite der PM lokalisiert ist und somit auch auf die Lokalisation des Substrates SM hindeutet (Abb.1.5) (Tani and Hannun, 2007a).



Abbildung 1.5: Die Rolle der nSMase2 bei der Bildung von Exosomen. Proteolipidprotein-haltigen Exosomen werden durch nach innen gerichtete Einstülpungen der endosomalen Membranen gebildet. Dafür wird Cer benötigt, welches an der zytosolischen Seite von nSMase2 gebildet wird. Nach (Tani and Hannun, 2007b).

Durch die Generierung einer nSMase2 defizienten Maus (nSMase2^{Δ/Δ}) wurden große Fortschritte in der Analyse der funktionellen Rolle der nSMase2 erzielt. Überraschenderweise wurden in den nSMase2 defizienten Mäusen keine Änderungen im SM oder Cer-Gehalt detektiert. Des Weiteren zeigen die nSMase2^{Δ/Δ} Mäuse einen pleiotropen Phänotyp mit einer starken Verzögerung im späten embryonalen und postnatalen Wachstum. Eine der auffälligsten phänotypischen Merkmale der nSMase2^{Δ/Δ} Mäuse waren die verkürzten Röhrenknochen und die deutlichen Verformungen der Gelenke im Vergleich mit den nSMase2^{WT/WT} Mäusen. Weitere Analysen ergaben, dass die nSMase2^{Δ/Δ} Mäuse niedrigere Konzentrationen an Wachstumshormon (GH) und Insulin Wachstums Faktor-1 (IGF1) im Blutserum aufwiesen, was der Grund für den verlängerten Zellzyklusarrest und die Organhypoplasie sein kann (Stoffel et al., 2005). Durch transgene Re-Expression von nSMase2 konnten die phänotypischen Defekte in nSMase2^{Δ/Δ} Mäusen korrigiert werden (Stoffel et al., 2007). Zusätzlich ist belegt, dass nSMase2 in Detergenz resistenten Subdomänen in der Golgimembran hypothalamischen von neurosekretorischen Neuronen segregiert, wo ihre transiente Aktivierung zur Modifizierung der Lipiddoppelschicht führt. Dies stellt einen entscheidenden Schritt im sekretorischen Weg des Golgi-Apparates dar und unterstreicht die Rolle der SMasen in der Signaltransduktion.

1.3.3 Neutrale Sphingomyelinase 3 (nSMase3)

Im Jahr 2000 wurde die Mg²⁺ abhängige nSMase3 biochemisch aus bovinen Hirnzellen aufgereinigt (Bernardo et al., 2000). Das Gen für die nSMase3 ist auf dem humanen Chromosom 2q21.1 lokalisiert. Die 4,6 kb große mRNA beinhaltet einen *open reading frame* (ORF), welches für ein 866 AS großes Protein mit einem theoretischen molekularen Gewicht von 97,8 kDa kodiert. Dieses Enzym weist sehr wenige Sequenzhomologien zu der bis dato bekannten nSMase1 und nSMase2 auf. Durch Überexpression in einem Hefe Stamm (JK9-3d∆lsc1p), dem eine eigene SMase Aktivität fehlt, wurde dieses Protein als echte (*bona fide*) nSMase verifiziert (Krut et al., 2006). Auch die *in vitro* Transkription und Translation der nSMase3 cDNA in Retikulozytlysaten ergab eindeutige SMase Aktivität (Chipuk et al., 2012). Die Aktivität des Enzyms ist maximal bei pH 7,2 und wird verstärkt durch die Anwesenheit von Phosphatidylserinen und gehemmt durch Scyphostatin. Die nSMase3 ist am ER/Golgi lokalisiert und wird ubiquitär exprimiert. Das Enzym enthält eine prolinreiche Region am N-Terminus, welche für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich sein kann (Krut et al., 2006).

1.3.4 Rolle der nSMase3 in zellulären Signalwegen

Die bisher durchgeführten Studien zur nSMase3 belegen, dass durch die Stimulation von MCF-7 Zellen mit TNF die nSMase3 aktiviert wird. Jedoch wird dieser Effekt unterbunden durch die Expression von dominant-negativen FAN (*factor associated with nSMase activity*), was daraufhin deutet, dass die nSMase3 *downstream* von FAN im Signalweg von TNF liegt (Krut et al., 2006). FAN ist ein TNF-RI

Adaptorprotein. Weitere Daten belegen, dass die nSMase3 durch TNF und DNA schädigende Reagenzien in Darmkrebszellen transkriptionell induziert wird. Im Gegensatz dazu wird die nSMase3-Expression von p53, einem der Hauptregulatoren vom genotoxischen Stress herunterreguliert (Corcoran et al., 2008).

1.4 Die Tumornekrosefaktor (TNF) Signalkaskade

Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein vielseitiges Zytokin, das unter anderem eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Inflammation, Differenzierung, Hämatopoese, Morphogenese und der Proliferation spielt (Aggarwal, 2003). Die Expression von TNF erfolgt zuerst als 212 Aminosäuren langes TypII Transmembranprotein, welches in stabilen Homotrimeren arrangiert vorliegt (Kriegler et al., 1988; Tang et al., 1996). Diese Membran-gebundene Vorstufe wird nach proteolytischer Spaltung durch das TNF converting enzyme (TACE/ADAM17) als lösliches homotrimeres Zytokin (sTNF) freigesetzt. Das 17 kDa große TNF-Molekül besteht aus zwei antiparallelen β-Faltblättern mit antiparallelen β-Strängen, die zusammen die in TNF-Familien typische *jelly-roll* β-Struktur formen (Aggarwal et al., 1987; Aggarwal et al., 1986; Goeddel et al., 1986). Es existieren mindestens zwei Rezeptoren für TNF: TNF-R1 und TNFR2. Beide sind ubiquitär exprimierte Transmembranrezeptoren, wobei TNFR1 durch eine sogenannte "Todesdomäne" ("death domain") Apoptose auslösen kann (Guicciardi and Gores, 2003). Bindung von TNF an TNFR1 resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Rekrutierung von Signalmediatoren führt, wie z.B: TNFR-assoziierter Faktor 2 (TRAF-2) und Fas-assoziiertes Protein mit Todesdomäne (FADD) (Aggarwal et al., 1987; Guicciardi and Gores, 2003). Die intrazellulären Signalkaskaden, die durch TNF Stimulation ausgelöst werden, sind sehr divers und oftmals konträr. So kann TNF pro-apoptotisch oder anti-apoptotisch wirken; es kann Proliferation stimulieren und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen steigern. Darüber hinaus wurde berichtet, dass TNF auch die Aktivität der SMasen induzieren kann. Hierbei steigert das ligandgebundene TNF-RI die Aktivität der aSMase und der nSMasen mithilfe zweier unterschiedlicher zytoplasmatischer Domänen. ASMase wird über die Todesdomäne des TNF-RI aktiviert (Adam-Klages et al., 1998; Wiegmann et al., 1994). Hingegen wird die Aktivierung der nSMasen durch die nSMase activation domain (NSD) des Rezeptors an welche FAN bindet, initiiert (Adam et al., 1995). FAN besitzt eine N-terminale PH Domäne (pleckstrin homologie) und C-terminale *WD repeats,* die eine BEACH Domäne (Beige and Chediak-Higashi) flankieren (Adam-Klages et al., 1996). Die PH Domäne ist für die spezifische Bindung des Proteins an das membranständige Phosphatidylinositol-4,5biphosphat (Ptdlns(4,5)P) verantwortlich. Ptdlns(4,5)P ist an Wachstums- und Differenzierungs-Prozessen beteiligt (Raucher et al., 2000). Die *WD-repeats* am C-Terminus sind notwendig für die Bindung an die NSD Domäne des TNF-RI (Adam-Klages et al., 1996) und gehören zu einer immer größer werdenden Familie von sog. *WD-repeat-containing-proteins*. Die Proteine dieser Familie wurden in allen Eukaryoten beschrieben und sind in einer Vielzahl von Funktionen involviert, darunter Signaltransduktion und Regulation des Zellzyklus (Smith et al., 1999).

1.5 Die Rolle der nSMasen im endokrinen System

Die Mutagenese der nSMase2 führte zu einem unerwarteten pleiotropischen Phänotyp mit signifikanten Verzögerungen des späten embryonalen und postnatalen Wachstums, einer verzögerten Pubertät und einer neuen Form eines kombinierten Mangel an hypophysären Hormonen. Die Arbeitsgruppe um Wilhelm Stoffel (Uniklinik Köln) zeigte eine Schlüsselrolle der nSMase2 in der Kontrolle der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden Achse (Stoffel et al., 2005). Hormone werden in Säugetieren von den endokrinen Organen, zu denen u.a. der Hypothalamus, die Hypophyse und die Gonaden zählen, produziert und dann in das Blut sezerniert. Gebunden an Trägerproteine gelangen sie über den Blutkreislauf zu ihren Zielzellen, um dann durch die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren weitere Vorgänge zu steuern. Dabei kommt den Hormonen des Hypothalamus und der Hypophyse besonders zu Beginn der Pubertät besondere Bedeutung zu. Das Erreichen einer normalen Größe und Fortpflanzungsfähigkeit ab einem bestimmten Alter benötigt adäguate Serumkonzentrationen an GH und IGF1 (Chandrashekar et al., 2001; Chandrashekar et al., 1999; Keene et al., 2002). So regelt das hypothalamische Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH) die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) aus den somatotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens. GH ist die Hauptdeterminante für Körpergröße und Gewicht. Zudem stimuliert GH die hepatische Synthese und

Sekretion von insulinähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF1) (Daughaday and Rotwein, 1989; Rubin and Baserga, 1995).



Abbildung 1.6: Graphische Darstellung der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden Achse. Dieses Diagramm zeigt die Rolle von GHRH, GH und IGF1 in der Kontrolle der Sekretion von Hormonen aus endokrinen Drüsen. Durchgezogene Pfeile stellen positive- und punktierte Pfeile negative Effekte auf ihre Zielorgane dar (abgewandelt von (Chandrashekar et al., 2004).

IGF1 reguliert den Zellzyklus und niedrigere Level von IGF1 im Blutserum führen zu schwerwiegenden Verzögerungen des Zellzyklus. Ebenso spielt IGF1 eine wichtige Rolle in der Regulation des Knochenwachstums (Lupu et al., 2001; Ohlsson et al., 1998). Neben dem gestörten Wachstum hat die nSMase2 Defizienz auch erheblichen Einfluss auf die Gonadenreifung. Zwar ist hinreichend bekannt, dass die testikulären Funktionen hauptsächlich von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) reguliert werden (O'Shaughnessy et al., 2009; Webb et al., 2004), aber eine zunehmende Anzahl an Studien postuliert, dass auch IGF1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Leydig-Zellen von Säugetieren spielt. Die Leydig-Zwischenzellen produzieren Testosteron, welches u.a. die

Spermienproduktion stimuliert. So wurde die wichtige Rolle von IGF1 auf die Steroidgenese der Leydig-Zellen in *Snell dwarf* Mäusen gezeigt. Nach IGF1 Applikation zeigten diese Mäuse eine erhöhte Ansprechbarkeit der Leydig-Zellen auf die Behandlung mit Gonadotropinen (Chatelain et al., 1991). Ebenso hatte die Gabe von GH an GH/IGF1 defiziente *Ames dwarf* Mäuse (die durch eine Mutation an einer Fehlbildung der Hypophyse und Mangel an hypophysärer Hormone leiden) eine erhöhte IGF1 Serumkonzentration, sowie eine erhöhte Sekretion von Androstendion und Testosteron aus dem isolierten Hoden zu Folge (Chandrashekar and Bartke, 1993). Des Weiteren wurde gezeigt, dass in IGF1-defizienten Mäuse die Reifung der Leydig-Zellen beeinträchtigt war, wodurch die Testosteronsynthese nur marginal detektierbar war (Wang et al., 2003). Die *in vivo* Effekte von IGF1 auf die Androgen-Sekretion sind einerseits auf die direkte Wirkung von IGF1 auf den Hoden und andererseits auf den Einfluss von IGF1 auf die Hypothalamus-Hypophyse Achse zurückzuführen.



Abbildung 1.7: Graphische Darstellung der Rolle von IGF1 in testikulären System. Die Zahlen repräsentieren die mögliche Abfolge von Ereignissen, die zur Sekretion von Androgenen führen. Nach (Chandrashekar et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass GH ebenso ein wichtiger Faktor bei der Hypophysen- und Gonaden-Funktion ist, was auf die Interaktion von Somatotropinen und Gonadotropinen hindeutet (Chandrashekar and Bartke, 2003; Chandrashekar et al., 2001; Chandrashekar et al., 1999; Chandrashekar et al., 1991; Childs, 2000; Hull and Harvey, 2000; Wilson, 2001). Diese Daten machen deutlich, welche wichtige Rolle die hormonale Signaltransduktion in Säugetieren und anderen Lebewesen hat. Für eine funktionierende Signalübermittlung ist eine gewisse Membrandynamik unerlässlich. Diese Membrandynamik erlaubt die Bildung von sog. *lipid rafts* in welchen, vermehrt Signalproteine lokalisiert sind (Cremesti et al., 2002). Für die Bildung der *lipid rafts* sind wiederum SM und Cer unerlässlich, wodurch SMasen welche SM zu Cer hydrolisieren, eine essentielle Stellung im Zusammenspiel der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden Achse einnehmen.

1.6 Zielsetzung

Im Jahr 2000 wurde die Mg²⁺ abhängige nSMase3, welche die Spaltung von SM zu Cer und Phosphocholin hydrolysiert, entdeckt. Sie wurde als ein im ER/Golgi lokalisiertes Enzym beschrieben. Die nSMase3 weist eine hohe Konservierung zwischen allen untersuchten Spezies auf, was auf ihre essentielle Bedeutung für die Physiologie der Organismen liefern könnte. Als ein ER/Golgi-ständiges Enzym könnte die nSMase3 die Sphingolipidkomposition von Zellen modulieren und damit an vielen verschieden zellulären Prozessen beteiligt sein. So kann der Verlust der nSMase3 eine Veränderung der biochemischen Eigenschaften vom ER bewirken, was viele zelluläre Prozesse, u.a. Vesikeltransport, die sekretorischen Signalwege und Kalziumhomöostase, beeinflusst. Diese Veränderungen könnten insbesondere für den lebendigen Organismus dramatische Folgen haben, wie z.B. eine fehlende Sekretion von Hormonen oder Zytokinen. Zur Analyse der Funktion dieses Enzyms *in vivo* sollte eine nSMase3 defiziente Maus generiert und analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Buchs, Schweiz) bezogen. Agarose wurde von Peqlab (Erlangen, Deutschland) erworben.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1: Eingesetzte Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen	Bestandteile
ES-Zell DNA Lysis Puffer	10mM Tris-HCI pH 7,5, 10mM EDTA, 1mM NaCI, 0,5% Lauroylsarcosine (w/v), 2mg/ml Proteinase K
1x Freezing Medium (Einfriermedium für ES-Zellen)	90% ES-FCS (v/v), 10% DMSO (v/v)
Lysepuffer (Maxipräparation)	200mM NaOH, 1% SDS (w/v)
Mausschwanz Lysis Puffer	100mM Tris-HCl pH 8,5, 5mM EDTA pH 8,0, 0,2% SDS (w/v), 200mM NaCl, 2mg/ml Proteinase K
Medium für embryonale Feederzellen	400ml D-MEM (GlutaMAX), 60ml EF-Zell FCS, 6ml 100x Natrium-Pyruvat, 6ml 100x NEAA

Medium für embryonale Stammzellen	400ml D-MEM (+Glucose/+Glutamin) 90ml ES-FCS, 6ml 100x Penicillin /Streptomycin, 1,8ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF), 6ml 100x NEAA, 6ml 100x Natrium-Pyruvat, 6ml 100x Glutamin, 1,2ml β- Mercaptoethanol (50mM)
1 x PBS-Puffer (Phosphat gepufferte Saline)	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7.4
Prähybridisierungslösung	1M NaCl, 50mM Tris pH 7,5,10% Dextransulfat (w/v), 1% SDS (w/v), 250 μg/ml Lachssperma DNA (sonifiziert)
20 x SSC	175,3g NaCl, 88,2g Natrium-Citrat pH 7
TAE-Puffer (50x)	2M Tris, 50mM EDTA, pH 8
TE-Puffer (10 mM)	10mM TrisHCl pH 7.4, 1mM EDTA pH 7.8
Blockierungspuffer (Western Blot Analyse)	10mM Tris-HCl, 150mMNaCl, 5% Magermilch, 2% BSA, 0,1% Tween-20 (pH7,4-7,6)
Luria-Bertani (LB) Medium (1I)	10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, pH wird auf 7 eingestellt und autoklaviert
Luria-Bertani (LB) Agar	LB mit 15 g/l Agar, autoklavieren und bei 55°C mit entsprechenden Antibiotikeaversetzt in Platten gießen
20 x S-PBS (2I)	14g NaCl, 2,76g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 3,12g NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O, 10,9g K ₂ HPO ₄ , (pH 7,6)
5 x Proteinprobenpuffer	1mM Tris (pH 6,8), 20% Glycerol, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 65 frisch: 5%β-Mercaptoethanol

10 x SDS Laufpuffer (SDS-PAGE)	0,25M Tris, 2M Glycin, 1% SDS	
SOB (1I)	20g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5g NaCl, 2,5mM KCl (pH 7,0), Autoklavieren, frisch:10mM steriles MgCl ₂	
SOC	Siehe SOB, jedoch zusätzlich mit 20mM Glukose (frisch)	
Laemmli-Puffer	4% SDS; 20% Glycerin; 250 mM Tris pH 6,8; 5% ß-Mercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau	
4% Sammelgel (10 ml)	2,5ml 0,5M Tris (pH 6,8), 6,4ml H ₂ O, 100 μ l 10% SDS, 1ml 40% Polyacrylamid, 150 μ l 10 % APS (Ammoniumpersulfat), 15 μ l TEMED (N,N, N', N',-Tetramethylethan-1,2- diamin)	
12% Trenngel (10 ml)	2,5ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4,5ml H ₂ O, 100µl 10% SDS, 3ml 40% Polyacrylamid, 150µl 10% APS, 15µl TEMED	
Blockierungspuffer (Immunofluoreszenz)	0,1% Saponin, 3% BSA in PBS	

2.1.3 Enzyme

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme

DNA-Polymerase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
ProteinaseK	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
Phusion DNA-Polymerase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
T4 Ligasen Rapid Ligation Kit	Fermentas; (Leon-Roth, Deutschland)
PuReTaq Ready-To-Go [™] PCR Beats	GE Healthcare;(Piscataway, USA)
Phusion [™] High Fidelity DNA Polymerase	NEB, (Ipswich, England)
High Fidelity Master Mix (HFMM)	Roche Diagnostics, (Mannheim, Deutschland)
RedTaq [™] DNA-Polymerase	Sigma, (Deisenhofen, Deutschland)
RNase A	Fermentas, (Leon-Rot, Deutschland)
DNasel	Promega, (Mannheim, Deutschland)

2.1.4 Längenstandards

Tabelle 2.3:	Verwendete Längenstandards
--------------	----------------------------

GeneRuler [™] DNA Ladder Mix	Fermentas	(St.Leon-Carl	Roth,
	Deutschland)		

Lambda DNA/HindIII Marker, 2	Fermentas Deutschland)	(St.I	Leon-Carl	Roth,
Prestained PageRuler [™]	Fermentas Germany)	(St.	Leon-Carl	Roth,
6 x DNA Loading dye	Fermentas Germany)	(St.	Leon-Carl	Roth,

2.1.5 Kits

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

DNA Präparation	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RNA Präparation	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Radioaktive Markierung	Ladderman [™] Labeling Kit (Takara, Japan)
Insulin ELISA	GenWay (San Diego, USA)
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Sequenzierungen	Big Dye [™] Terminator Cycle (PE Applied Biosystems; Massachusetts, USA
Gel Extraction Kit, QIAEX II (150)	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Reverse Transkriptase	Core Kit Eurogentec (Köln, Deutschland)
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TaqMan 20x Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)

2.1.6 RNA Northern Blots

Tabelle 2.5: Kommerziell erworbene und verwendete Northern Blots

Mouse Neuronal Tissue	Zyagen (San Diego, USA)
Northern Blot	
Mouse Reproductive Tissue	Zyagen (San Diego, USA)
Northern Blot	

2.1.7 Vektoren

pwtNSM-HA, nSMase3-GFP-N3, nSMase3-GFP-C3 wurden in folgender Publikation beschrieben (Krut et al., 2006).

Die N-terminalen Konstrukte pwtNSM-Δ1-HA und pwtNSM-Δ2-HA wurden mit den Primern (P1) *EcoRI*/322-2598, (P2) EcoRI/622-2598 und (Px) *XhoI*-HA nSMase-3[′] aus dem pwtNSM-HA Vektor amplifiziert und kloniert.

Der pKOmp97 Vektor wurde in der Diplomarbeit von Peter Milanov, IMMIH, Köln generiert.

2.1.8 Sonden für Southern- und Northern- Blot-Analysen

Name	Größe (bp)	Charakteristik	
Sonde "6"	600	Hybridisiert in einer intronischen Sequenz zwischen Exon 10 und 11 des Maus- nSMase3-Gens.	
"NB"-Sonde	250	Die Primer hybridisieren in Exon 6 und 10	

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Real-Time PCR Oligonukleotide

Tabelle 2.7: Real-Time PCR Oligonukleotide

Glucuronidase, beta (GUSB)	Mm01197698_m1, Applied Biosystems
Gonadotropin releasing hormone (GnRH)	Mm01315605_m1, Applied Biosystems
Growth hormone (GH), kommerziell	Mm00433590_g1, Applied Biosystems

Growth hormone (GH), custom	GH sense GCCCTTGTCCAGTCTGTTTTC
	GH probe GTTCGAGCGTGC- CTACATTC
	GH antisense GATGGTCTCTGAGAAGCAGAAAG
Growth hormone releasing hormone (GHRH)	Mm00439100_m1, Applied Biosystems
Growth-hormone releasing hormone receptor (GHRHR)	Mm01326479_m1, Applied Biosystems
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT)	Mm01545399_m1, Applied Biosystems
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	Mm00439560_m1, Applied Biosystems
Longevity Assurance Gene 6 (LASS6)	Mm00556165_m1, Applied Biosystems
Luteinizing Hormone (LH)	LH sense: ACTCTGGCCGCAGAGAATGAG LH probe: ACAGATGCGAAGCGCAGCTC LH antisense: ATGGTCCGAGTACTGCCGGC
nSMase3, kommerziell	Mm00547173_m1, Applied Biosystems

nSMase3, custom	nSMase3 Sense TACCCACTGAAGGCAGCGTA
	nSMase3 antisense TTTGGTACATCTCCAGGGAG
	nSMase3 probe CTCCAGGTTTTTGTGGAAATGTG
Prolaktin (PRL)	Mm00599950_m1, Applied Biosystems

2.1.9.2 Oligonukleotide zur Maus-Genotypisierung

Alle Primer sind in 5' \rightarrow 3' dargestellt. Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer	Sequenz	T _{annealing} °C	Richtung
5'MxCre	CATGTGTCTTGGTGGGCTGAG	62	sense
3'MxCre	CGCATAACCAGTGAAACAGCAT	58	antisense
5'loxP-fw2	ACACTTGTACTCATGTGCAC	55	sense
3'loxP-fw1	CTTATCTCTAGCCTCATTGACAC	59	sense
3'loxP-rev1	CTTGTGTAGCCTGGCACAAATG	60	antisense
5'loxP-fw1	TAGTCAAAGGGCAACTTAGCAC	58	sense
5'loxP-rev1	CCAGACTGCCTTGGGAAAAG	59	antisense
---------------------	--------------------------	----	-----------
5'loxP-flx- rev1	GAGTAACTGAATTCTCCCACTAG	59	antisense
5'loxP-fw3	ACACACTCATGCATATACAC	53	sense
5'loxP-fw4	AAGGTTGGTGTGTTATGCCG	57	sense
Uni-Cre1	ACCTGAAGATGTTCGCGATTATCT	59	sense
Uni-Cre2	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	59	antisense

2.1.9.3 Oligonukleotide für Klonierungen

Tabelle 2.9: Oligonukleotide für Klonierungen

(P1) <i>EcoRl</i> /322- 2598und	GGAATTCACCATGCGCTGCTT ACAGGGGCGCGTGAAT	60	sense
(P2) EcoRI/622- 2598	GGAATTCACCATGAAGCCACTT CCTGTGTCCCTCCA	61	sense
(Px) <i>Xhol</i> -HA nSMase-3´	CCCCTCGAGTCAAGCGTAATCTG GAACATCGTATGGGTAGGGCTGGTGCAGCTT	63	antisense

2.1.10 Verwendete Bakterien

XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ' proAB lacl^q Z\DeltaM15 Tn10 (Tet')]

Stbl3TM: F⁻ mcrB mrr hsdS20 ($r_B^- m_B^-$) recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl5 λ^- leu mtl1

2.1.11 Verwendete Zelllinien

Die humane Brustkrebs-Zelllinie MCF7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), die Cos-7 Zelllinie (*Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40*) aus der Grünen Meerkatze und die humane HeLa Zelllinie (Henrietta Lacks) aus einem Zervixkarzinom wurden von der amerikanischen Zell-linien Sammlung (ATCC,Rockville, MD, USA) bezogen. Die Haltung der Zell-Linien ist unter 2.2.3. beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Standardmethoden molekularbiologischer Laboratorien, die hier nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei (Sambrook et al., 2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.1.1 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde gewonnen, indem Schwanzbiopsien von Mäusen oder embryonale Stammzellen ÜN mit Mausschwanz-Lyse-Puffer bei 56°C inkubiert wurden. DNA aus Mausschwanzspitzen wurde mit 700 µl Isopropanol gefällt, bei embryonalen Stammzellen mit 100 µl Isopropanol. Anschließend wurde die DNA mit 70%-igen Ethanol (v/v) gewaschen, abzentrifugiert, bei RT getrocknet und in TE-Puffer (pH 8) aufgenommen.

2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Präzipitation

Aufgereingte DNA (siehe Maxi-Prep) wurde in 1 ml H₂O resuspendiert und im Verhältnis 1:1 mit Phenol-Chloroform gemischt. Anschließend wurde die Lösung 10 min bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die untere Phase wurde verworfen, die obere DNA-haltige Phase wurde durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Das abzentrifugierte DNA-Pellet wurde mit 70%-igen Ethanol (v/v) gewaschen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.3 DNA Isolation aus ES-Zellen

Die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und mit DNA-Lysepuffer ÜN bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert. Die auf RT abgekühlten Platten wurden anschließend mit je 200 µl 100% Isopropanol versehen und 1 h bei RT inkubiert. Isopropanol

wurde vorsichtig abgeschüttet und die DNA mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Die getrockneten DNA Pellets wurden anschließend direkt mit dem unten aufgeführten Restriktionsansatz (35 µl) versetzt, und bei 37°C ÜN inkubiert.

35 µl Restriktionsansatz: EcoRV-Puffer	3,5 µl
EcoRV	1 µl
BSA (100x)	0.35 µl
Spermidin (0,5 M)	0,02 µl
DTT (1M)	0,01 µl
RNase A (10mg/ml)	1 µl
ddH ₂ O	29,12 µl

2.2.1.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Nanodrops (peQLab Biotechnologie GmbH) vermessen. Die Proben wurden bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm vermessen.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurde PCR zur Genotypisierung, Klonierung und Sequenzierung verwendet. Die Reaktionen wurden im T3 Thermocycler (Biometra, Stadt, Land) oder im Thermocycler iCycler- (MJ Research, Waltham, USA) durchgeführt.

2.2.1.7 RNA Extraktion, RT-PCR und quantitative Real-Time PCR

Murine Gewebe wurden unter Verwendung eines Ultra Turrax Homogenisators (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Die RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Kit extrahiert. Die komplementäre DNA (cDNA) wurde mit dem Transcriptase Core Kit[®] von Eurogentec synthetisiert. Hierfür wurden 200 ng/µl RNA-Lösung eingesetzt. Für die quantitative Real-Time PCR wurden 100 ng cDNA mit Hilfe des TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG und spezifischer TaqMan Sonden amplifiziert. Für einige Gene wurden benutzerdefinierte Sonden generiert (Tab.2.7). Der Gehalt der mRNA des Zielgens wurde auf die Expression des Haushalts-Gens (hier: Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und Glucuronidase β (GUSB)) normalisiert und auf einen Kalibrator relativiert. Als Kalibrator diente der Mittelwert der mit Haushalts-Genen normalisierten wildtypischen CT-Werte. Der CT-Wert ist ein Maß für die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt.

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente in einer Größe zwischen 50-20000 Basenpaaren wurden über ein 0,5 mg/ml Ethidiumbromid enthaltendes 0,8 %-3 % Agarosegel bei einer Spannung zwischen 30-100 V aufgetrennt. Als Lösungsmittel für die Agarose und als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

2.2.1.9 Southern Blot Analyse

5-10 µg DNA wurden mit 50-100 U Restriktionsenzym versetzt und ÜN inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem 0,8%-igen Ethidiumbromid Agarosegel aufgetrennt und durch alkalischen Transfer auf eine HybondTM–N⁺ (Amersham, Illinois, USA) geblottet. Die Membran wurde für ca. 30 min bei 80°C getrocknet, in 2x SSC angefeuchtet und für 2-4 h bei 65°C mit einer Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde hinzugegeben und bei 65°C ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran in 2x SSC/0,1%-ige SDS-Lösung zwischen 10 min und 6 h bei 65°C im Wasserbad gewaschen. Abschließend wurde ein Röntgenfilm ÜN auf die Membran gelegt, die zuvor in einer BioMax Kassette fixiert wurde.

2.2.1.10 Radioaktive Markierung der Sonde

Die Sonden (300 bis 700 bp) für den Southern- und Northern-Blot wurden mit Hilfe eines Thermocyclers hergestellt. Das mit Hilfe der Gel-Elektrophorese aufgetrennte PCR-Produkt wurde über eine Gelelution (Qiaex II) aufgereinigt und radioaktiv markiert. Hierzu wurde diese mit 2 µl Random Primer (TaKaRa Ladderman KIT) versetzt und mit ddH₂O auf 16.5 µl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde 5 min bei 100°C denaturiert und für 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl dNTP-Mix, 2.5 µl 10x BCA-Reaktionspuffer, 1 µl BCA-Polymerase (2 U/µl) und 2,5 µl α -[³²P]-dCTP (10 μCi/μl) zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde 2,5 h bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 10 mM Tris (pH 8,5) zu dem Reaktionsansatz dazugegeben und auf eine Micro-Spin HM Säule (zuvor mit 100 µl 10 mM Tris pH 8,5 equilibriert) überführt. Durch diesen Schritt wurde die markierte Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden befreit. Die so aufgereinigte Sonde wurde, nach einer Überprüfung mit einem Geigerzähler, bei 100°C 2-3 min denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und abschließend zu der prä-Hybridisierungslösung hinzugegeben, die die HybondTM– N^+ Membran umspült. Abschließend folgte eine Inkubation ÜN.

2.2.1.11 Entfernen der radioaktiv-markierten Sonde

Hierzu wurde der Blot dreimal für 10 min mit 0,1% SDS (w/v) aufgekocht und zwischendurch auf RT abgekühlt. Hiernach konnte die Membran erneut prähybridisiert werden.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 ELISA zur Quantifizierung von IGF1

Die Quantifizierung von IGF1 im Blutserum von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen wurde mit dem ELISA-Kit (#MG100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Diesem ELISA liegt das Sandwich-Prinzip zugrunde. Zur Probenvorbereitung wurde das zuvor gewonnene und bei -20°C gelagerte Serum aufgetaut und in der erforderlichen Verdünnung verwendet. Die Absorption wurde bei 450nm auf einem ELISA-Reader gemessen

2.2.2.2 Proteinextraktion für Western-Blot Analysen

Für die Isolation von Proteinen wurden mindestens 1x 10⁶ Zellen für 4 min bei 1200 rpm sedimentiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 20 µl 2 x Laemmli-Puffer pro 10⁶ Zellen lysiert und für 10 min bei 95°C aufgekocht. Gleiche Mengen an Protein wurden mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) aufgetrennt und für 60 min bei 300 mA auf eine PVDF Membran (Schleicher & Schuel, Whatman[®], Dassel, Deutschland) übertragen. Nach Blockierung unspezifischer Antikörperinteraktionen mit Blockierungspuffer wurde die Membran mit entsprechenenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert.

2.2.3 Zellbiologie

2.2.3.1 Allgemeine Zellkultur Techniken

Die Zellen wurden im Inkubator (Heraeus BBD 6220, Hanau, Deutschland) bei 37°C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde bei embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) jeden Tag gewechselt, bei embryonalen Fibroblastenzellen (EF-Zellen) jeden zweiten Tag. Um bei adhärenten Zellen eine gute Festsetzung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturplatten mit Gelatine beschichtet. Dazu wurden die Platten 15 min mit einer Gelatinelösung inkubiert (2 % Gelatine in PBS).

2.2.3.2 Erhaltung von Säugetierzellen Zelllinien

HeLa und COS-7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS (fötales Kälberserum) und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert (DMEM-10). Das Medium für stabil transduzierte HeLa Zellen wurde zusätzlich mit 3 µg/ml Blasticidin (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. HEK-293 FT Zellen (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) erhielten 400 µg/ml G418 in DMEM-10 (Geniticin, Biochrom; Berlin, Deutschland).

2.2.3.3 Kultivierung von embryonalen Fibroblastenzellen

Die hier verwendeten Fibroblasten (Feeder-Zellen; EF0) wurden aus 13-14 Tage alten Mausembryonen (Mauslinie; IL4 Pep-Neo) gewonnen. Diese EF0-Zellen wurden auf 15 cm² Gewebekulturschalen mit 0,1%-iger Gelatine in DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin, Glutamax (extra stabilisiertes Glutamin) gehalten (Gibco BRL, Stadt, Land),. EF0-Zellen wurden dreimal 1:3 passagiert, wodurch letztendlich aus einer Gewebeschale mit EF0-Zellen siebenundzwanzig 15 cm Schalen von EF-3 Zellen generiert wurden. In diesem Stadium wurden die Zellen mit Mitomycin-C behandelt und so mitotisch inaktiviert. Die Zellen konnten nun für die embryonale Stammzellkultur genutzt werden.

2.2.3.4 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Murine ES Zellen (Bruce4) wurden auf Feederzellplatten kultiviert. Die Teilung erfolgte einmal in 24 h. Bei einer Konfluenz von annährend 80% wurden die Zellen passagiert.

2.2.3.5 Generierung stabiler ES-Zell-Klone

Um stabile ES-Zell-Klone zur Generierung der nSMase3 Knockout Mäuse zu erhalten, wurde der pKOmp97 Targeting Vektor über Elektroporation in ES Zellen transfiziert. Dazu wurden 40 µg Vektor DNA mit der Endonuklease Sfil linearisiert, mit Isopropanol präzipitiert und nach Waschen mit 70 % Ethanol in 400 µl RPMI

(ohne Phenolrot) resuspendiert. Ein ES Zellpellet mit 10⁷ Zellen wurde in 400 μ l RPMI (ohne Phenolrot) resuspendiert, mit der DNA Lösung vereinigt und in 4 mm Elektroporationsküvetten (Peqlab; Erlangen, Deutschland) elektroporiert. Folgende Einstellungen des Elektroporators (Bio-Rad; München, Deutschland) wurden verwendet: 200 Ω , 500 μ F und 240 mV. 5 min nach Elektroporation (RT) wurden die Zellen ausplattiert.

2.2.3.6 Selektion von ES-Zellklonen

Die homologen Rekombinanten wurden einer positiven Selektion mit dem Neomycin-Analogon G418 unterzogen. Bei der Zelllinie Bruce 4 wurde am zweiten Tag nach der Transfektion mit der Selektion durch 250 µg/ml G418 begonnen.

2.2.3.7 Isolation von ES-Zellklonen

Nach 9-10 Tagen G418-Selektion wurden die nicht ausdifferenzierten ES-Zellkolonien isoliert. Dazu einzelne Kolonien 96-Loch-Platten mit 25 µl 1x Trypsin überführt. Die isolierten Klone in der 96-Loch-Platte wurden für 5 min bei 37°C inkubiert und die Trypsinisierung anschließend mit ES-Medium gestoppt. Eine isoliert Zellkolonie wurde gedrittelt und auch frische 96-Loch-Platten überführt, die mit MMCbehandelten EF-Zellen ausgelegt worden waren.

2.2.3.8 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Verschiedene Zelllinien (HeLa, COS-7) wurden mit ExGene[®] (Firma, Stadt, Land) transfiziert. 1-2 μ g DNA wurden mit 3,3 – 6,6 μ g ExGene[®] in 200 μ l NaCl (150 mM) aufgenommen und nach 10 min Inkubation bei RT auf die Zellen gegeben.

2.2.3.9 Immunofluoreszenz Analysen

Zur mikroskopischen Analyse von Zellen wurden HeLa oder COS-7 Zellen auf sterilen Deckgläschen ÜN kultiviert. Nach 24-36 h wurden die Zellen 20 min mit 3% Paraformaldehyd/ PBS fixiert und 10 min mit Permeabilisierungspuffer und 1:10000 Hoechst (Bis-Benzimid; Nr: 33258 Firma, Stadt, Land) inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit Blockierungspuffer für 30 min. Hiernach wurden die Zellen 1 h mit spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und mit Einbettmedium (Moviol) eingebettet.

2.2.4 Versuchstierarbeiten

2.2.4.1 Tierhaltung

Haltung und Aufzucht der Mäuse wurden im Institut für Genetik der Universität zu Köln und im Institut für med. Mikrobiololgie, Immunologie und Hygiene der Unikliniken Köln durchgeführt. Die Mäuse wurden in belüfteten Räumen ein einer Temperatur zwischen 22°C und 24°C in Typ3 Käfigen (maximale Anzahl adulter Mäuse: 6) gehalten. Den Mäusen stand Trockenfutter (wurde nur für experimentelle Zwecke entnommen) und Leitungswasser *ad libidum* zur Verfügung. Durch eine automatische Beleuchtungsanlage wurde ein konstanter Tag-Nacht Rhythmus von jeweils 12 h vorgegeben. Nachkommen der Zuchtpaare wurden nach 3 Wochen abgesetzt, mit Ohrmarkierungen versehen und genotypisiert. Die Mäuse wurden außer zur Verpaarung, stets getrennt voneinander gehalten.

2.2.4.2 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Mausmodelle mit gleichem genetischen Hintergrund, CB57BL/6, verwendet, mit der Ausnahme der Mx-Cre Mäuse, die auf einem gemischten CB20/CB57BL6/N Hintergrund gehalten wurden. Es wurden immer Geschwister verglichen (*"littermates"*). Cre Deleter Mäuse wurden mit

nSMase3^{WT/FL} Mäusen gekreuzt um nSMase3^{WT/Δ} Mäuse zu erhalten, die wiederum in einer Inzucht Verpaarung homozygote nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse erzeugten. Das Deleter-Cre Allel wurde nach der Deletion aus dem Stamm herausgezüchtet. Des Weiteren wurden nSMase3^{FL/FL} Mäuse mit Mx-Cre Mäusen (Kuhn et al. 1995) verpaart, um eine konditionelle Mutagenese des nSMase3-Gens in der Leber zu erzielen. Nach mehrmaligen Verpaarungen wurden nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse generiert, deren Cre-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Interferon α/β Promotors des Mx-1 Gens stand. So wurde den Mäusen im Alter von 9 Wochen intraperitoneal Poly (I:C) appliziert und die leberspezifische nSMase3-Ablation erzielt. Cre-Deleter, Mx-Cre, und die Flp-Deleter Mäuse wurden vom Institut für Genetik der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.

2.2.4.3 Glukose- und Insulin-Toleranz-Test

Für einen Glukose-Toleranz-Test (GTT) wurde bei Mäusen, die einer Nüchternperiode von 16 h unterzogen wurden, die Blutglukose gemessen. Anschließend wurde den Mäusen eine 20 % Glukoselösung (DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) (10ml/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Hiernach wurden die Blutglukosewerte nach 15, 30, 60 und 120 min gemessen. Für den Insulin-Toleranz-Test (ITT) wurde nach Bestimmung der Blutglukosewerte, nicht gefasteten Mäusen 0,75U/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) (0,75U/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Anschließend wurden die Blutglukosewerte nach 15, 30, 60 min gemessen.

2.2.4.4 Isolierung von Organen für die RNA-Synthese und Histologie

Zur Organentnahme für RNA- oder Histologieanalyse wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet, da durch zervikale Dislokation das Gehirn beschädigt werden kann. Die Organe werden für Paraffinschnittanalysen sofort in Formalin (Firma, Stadt, Land) eingelegt. Für RNA-Analysen werden die entnommenen Organe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.4.5 Datenauswertung

Daten wurden mit Excel ausgewertet. Für statistische Analysen wurde der Zweistichproben-t-Test *(unpaired, two-sided Student-t-Test)* verwendet. Die Bildbearbeitung aller mikroskopischen Aufnahmen wurde mit Hilfe von ImageJ und Microsoft Powerpoint durchgeführt. FACS Messungen wurden am FACS Canto (BD Biosciences) durchgeführt. Die verschiedenen nSMase3 Konstrukte wurden mittels Vektor NTI Advance[®] 10 Software entworfen.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die molekulare Charakterisierung der neutralen Sphingomyelinase3 (nSMase3) *in vitro* sowie die funktionelle Analyse *in vivo* in der Maus. Zu diesem Zweck wurden nSMase3-defiziente Mäuse generiert und analysiert.

3.1 Funktionelle Charakterisierung der nSMase3 in vitro

Um die Bedeutung des N-Terminus der nSMase3 zu ermitteln, wurde in den folgenden Versuchen untersucht, ob Deletionen am N-terminalen Ende des nSMase3 Proteins die Funktionalität verändern. Dazu wurden verschiedene Deletionskonstrukte des nSMase3 Gens generiert. Das erste N-terminale Deletionskonstrukt (pwtNSM-HA- Δ 1) wurde mittels PCR mit dem Primerpaar P1 (EcoRI/322-2598) und Px (Xhol-HA nSMase-3') generiert, um im N-terminalen Ende (5'-Ende) 108 Aminosäuren (322 bp) zu deletieren. Ein zweites Deletionskonstrukt (pwtNSM-HA-Δ2) wurde mit dem Primerpaar P2 (EcoRI/622-2598) und Px (XhoI-HA nSMase-3') generiert, dem die N-terminalen 208 Aminosäuren (622 bp) fehlten (Abb.3.1A). Des Weiteren wurden zwei GFP Fusionsproteine erstellt, um die endogene Aktivität sowie die zelluläre Lokalisation der nSMase3 zu bestimmen (Abb.3.1B). Zur Verifizierung der Deletionskonstrukte (pwtNSM-HA-Δ1 und pwtNSM-HA-Δ2) wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, welche die korrekten Größen für die jeweiligen Deletionskonstrukte bestätigte (Abb.3.1C). Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die Deletionskonstrukte, sowie die GFP Fusionsproteine in MCF7 Zellen transfiziert und der Sphingomyelin (SM) Umsatz nach Stimulation mit Tumor necrosis factor (TNF) analysiert. Hierfür wurden die transfizierten Zellen nach 48 h Wachstum im Standard Medium für verschiedene Zeiträume mit 100ng/ml humanem TNF stimuliert. Anschließend wurde der Umsatz des zuvor zugegebenen radioaktiven SM gemessen. Wie in Abb.3.2 zu sehen ist, steigt außer in den mocktransfizierten Zellen der SM-Umsatz in allen mit nSMase3-Konstrukten transfizierten Zellen an. Der gesamte SM Umsatz der GFP Konstrukte zeigt keinen signifikanten Unterschied zum SM Umsatz des WT Konstruktes, wohingegen der SM Umsatz des Δ2 Konstruktes nach 1 und 2 Minuten signifikant höher ist als der SM Umsatz des WT und des $\Delta 1$ Konstruktes.



Abbildung 3.1: Generierung und Verifizierung von nSMase3 Deletionskonstrukten. A, Schematische Darstellung der Generierung der nSMase3 Deletionskonstrukte $\Delta 1$ und $\Delta 2$ aus dem pwtNSM-HA Vektor mit den Primer P1, P2 und Px, **B**, Schematische Darstellung der C-bzw. Nterminalen GFP Konstrukte der nSMase3. **C**, Western Blot Analyse der generierten nSMase3 Deletionskonstrukte aus (A) von Zelllysaten aus transfizierten FT-Zellen. Die Bande bei 98 kDa entspricht dem WT nSMase3 Konstrukt. Die Banden bei 85 kDa und 70 kDa entsprechen den Deletionskonstrukten $\Delta 1$ und $\Delta 2$. HA = Hämagglutinin, C-Term = C-Terminus, TM= Transmembrandomäne, GFP = enhanced green fluorescent protein.

Als nächstes wurde die subzelluläre Lokalisation der nSMase3 mit Hilfe der GFP Fusionsproteine in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dazu wurden HeLa Zellen mit den Vektoren pwtNSM-HA und Ds-Red-ER co-transfiziert. Der Ds-Red-ER Vektor beinhaltet die ER-Zielsequenz des Calreticulin und die ER-Erkennungssequenz, KDEL, welche nach Expression, zur spezifischen Färbung des ER führt (Fliegel et al., 1989; Murno and Pelham, 1987) (Abb.3.3A). Die HA-gekoppelten Mutanten wurden mittels α-HA-Antikörpern visualisiert. Wie in Abb.3.3A zu sehen ist, überlappen die roten und grünen Signale ("merge"), was auf eine Lokalisierung von nSMase3-HA im ER hindeutet. Im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation der GFP-nSMase3 Fusionsproteine wurde überprüft, ob das fusionierte GFP die subzelluläre Lokalisation der nSMase3 beeinträchtigt.



Abbildung 3.2: Umsatz von radioaktiv markiertem SM in verschiedenen nSMase3 Konstrukten nach Stimulation mit TNF. Mock und nSMase3-transfizierte MCF7-Zellen wurden mit 100 ng/ml humanem TNF für verschiedene Zeitperioden stimuliert und der Umsatz des radioaktiv markierten SM gemessen. A, Darstellung des SM Umsatzes der mit mock, WT oder N-terminalen Deletionskonstrukten transfizierten MCF7 Zellen. B, Darstellung des SM Umsatzes der mit mock, WT oder M-terminalen Oder GFP-nSMase3 Fusionsproteinen transfizierten MCF7 Zellen.

Hierzu wurden HeLa Zellen mit dem GFP-nSMase3-C3 (GFP am N-Terminus) transient transfiziert und nach 36 h fixiert. Für die spezifische Färbung des ER wurde ein α-KDEL-Antikörper verwendet. In Abb. 3.3B wird die ER-Lokalisation des GFP-nSMase3-C3 Fusionsproteins bestätigt. Parallel wurden HeLa Zellen mit dem Expressionsvektor nSMase3-GFP-N3 (GFP am C-Terminus) transient transfiziert. Nach Fixierung wurde das ER mit Hilfe von α-KDEL-Antikörper angefärbt. Im Gegensatz zur GFP-nSMase3-C3 zeigte das nSMase3-GFP-N3 Fusionsprotein ein punktförmiges subzelluläres Verteilungsmuster, welches nicht mit dem ER co-lokalisiert war(Abb3.3C). Dies deutete auf eine veränderte Lokalisation der nSMase3 durch die C-terminale Fusion von GFP hin. Diese Erkenntnisse wurden durch die Transfektion von Cos-7 Zellen bestätigt (Abb.3.3D und E). In beiden Zelllinien zeigten sowohl das nSMase3-GFP-N3 wie auch das GFP-nSMase3-C3 Fusionsprotein die gleiche subzelluläre Verteilung.



Abbildung 3.3: Subzelluläre Lokalisation der nSMase3-HA und nSMase3-GFP Konstrukte. A, Fluoreszens Mikroskopie von HeLa Zellen, die transient mit einem Ds-Red-ER Vektor, sowie dem pwtNSM-HA Vektor co-transfiziert wurden. Die Detektion erfolgte nach 36 h. B-C, Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen die transient (36 h) mit dem (B) nSMase3-GFP-C3 Expressionsvektor oder (C) nSMase3-GFP-N3, transfiziert wurden. Für die ER Färbung wurden der Primärantikörper anti-KDEL und der Sekundärantikörper anti Ratte Cy-3 konjugiert verwendet. D-E, Cos-7 Zellen, die transient, zum einen mit einem Ds-Red-ER und zum anderen mit dem (D) nSMase3-GFP-C3 oder (E) nSMase3-GFP-N3 Vektor co-transfiziert wurden.

3.2 Expression der nSMase 3 in neuronalen und reproduktiven Geweben der Maus

In humanen Geweben wird die nSMase3 ubiquitär, jedoch besonders stark im Herzen und Skelett-Muskeln (der quergestreiften Muskulatur) exprimiert (Krut et al., 2006). Erste Analysen deuteten auf eine weitverbreitete Expression der nSMase3 in der Maus hin (unveröff. Daten, Peter Milanov). Um die Expression der nSMase3 in der Maus genauer zu analysieren, wurden Northern Blot (Zyagen[®]) Analysen von neuronalen und reproduktiven Geweben der Maus durchgeführt (Abb.3A und B).



Abbildung 3.4: Expressionsprofil der nSMase3 in neuronalen und reproduktiven Geweben der Maus. A-B, Northern Blot Analyse der von Exon 6 bis Exon 10 umspannende Bereich des murinen nSMase3 ORF. Nachweis muriner nSMase3 in je 20 µg RNA aus (A) multiplen neuronalen Organen und (B) multiplen reproduktiven Organen .

Dazu wurde eine spezifische nSMase3 cDNA Sonde, welche die Exone 6 bis 10 umspannte, generiert, radioaktiv markiert und auf die Membranen aufgebracht. Außer in der Samenblase, im Samenleiter und der Milchdrüse konnte in allen untersuchten neuronalen (Abb.3.4A), sowie reproduktiven (Abb.3.4B) Geweben der Maus eine nSMase3 Expression anhand der erwarteten 4,6 kb großen Bande nachgewiesen werden. Im Hoden hingegen konnte ein zweites etwa 4 kb großes Fragment detektiert werden. Dieses Signal könnte auf eine noch nicht beschriebene Spleißvariante der nSMase3 hindeuten.

3.3 Generierung eines loxP-flankierten nSMase3 Allels in der Maus

Bei SMasen handelt es sich um Sphingomyelin Phosphodiesterasen (SMPD). Diese Enzyme initiieren den Abbau von SM, welche eine Hauptkomponente der Lipid-Doppelschicht der zellulären Membranen darstellt. Es gibt mehrere SMasen, die sich in ihren enzymatischen Eigenschaften, der Regulation, der Gewebeverteilung und der subzellulären Lokalisation unterscheiden. Die, Ligand-Zelloberflächen-Rezeptor vermittelte Aktivierung von nSMasen dient der Aufspaltung von SM zu Ceramid (Cer). SM und Cer dienen ihrerseits als Signalmoleküle in nachgeschalteten zellulären Signalwegen, die für das Überleben, die Proliferation oder die Seneszenz der Zelle von grundlegender Bedeutung sind. Um die Funktionen der nSMase3 in vivo zu analysieren, sollten über das Cre/loxP System nSMase3 defiziente Mäuse generiert werden. Das murine nSMase3 Gen befindet sich auf Chromosom 16, setzt sich aus 19 Exons zusammen und umfasst 21317 Nukleotide. Quantitative RT-PCR Analysen ergaben, dass keine Spleißvarianten der nSMase3 (außer im Hoden, siehe Abb.3.4B) in der Maus existieren. Aus diesem Grund wurde der Bereich von Exon 4-8 mit zwei gleichgerichteten loxP Sequenzen flankiert, so dass durch Cre vermittelte Deletion dieser Region (floxed region (FL)) die nSMase3 vollständig inaktiviert wurde. Dazu wurde in der Diplomarbeit von Peter Milanov der sog. pKOmp97 Vektor konstruiert. Dieser Vektor besteht aus einem kurzen und einem langen Homologiearm (short (SA) und long homology arm (LA)), einem Neomycinresistenz-Gen (Neo), einem Tymidinkinase Gen (TK) und den loxP flankierten Exons 4-8. Innerhalb der loxP flankierten DNA Sequenz beinhaltet der Targeting Vektor zur positiven Selektion eine Expressionskassette mit dem Neo-Gen. Dieser Bereich ist von Erkennungssequenzen der Flp-Rekombinase (FRT) flankiert (Abb.3.5A), die in vivo nach Kreuzung mit einer Flp-transgenen Mauslinie deletiert werden können. Die negative Selektionskassette Thymidinkinase (HSV-tk) befindet sich außerhalb des homolog zu rekombinierenden Bereiches und wird bei einem homologen Rekombinationsvorgang nicht integriert. Nach Transfektion des seguenzierten und linearisierten Targeting Vektors in Bruce4 ES-Zellen (CB20/BL6) und anschließender Selektion mit G418 und Gancyklovir wurden 900 ES Zellklone isoliert. Drei Klone mit apparenter Integration des loxP-flankierten Alleles konnten durch Southern Blot Analysen identifiziert werden. Jedoch eigneten sich nur die Klone, B1 und H7, nach wiederholten Southern Blot und PCR Analysen für die Blastozysteninjektion (Abb.3.5B und C).



Abbildung 3.5: Targeting Strategie und Verifizierung des loxP flankierten nSMase3 Allels. A, Schematische Darstellung der Targeting Strategie des loxP flankierten nSMase3 Gens. Der Targeting Vektor (TV) beinhaltet drei Bereiche (SA, FL, LA) und ermöglicht nach homologer Rekombination ins murine Genom die Inaktivierung des nSMase3 Gens durch Cre-vermittelte Rekombination. Das nSMase3^{WT} Konstrukt zeigt das WT nSMase3 Gen, welches die Exone 1-11 beinhaltet. Die loxPflankierten Exone 4-8 des nSMase3 Allels sind im nSMase3^{FL(neo)} dargestellt. **B,** Southern Blot Analyse von ES-Zellklonen für die Identifizierung des loxP flankierten nSMase3 Allels mit Hilfe der genomischen Sonde (Sonde 6). **C,** Dargestellt ist der zweite Kontroll-Southern Blot dreier, für das loxP flankierte nSMase3 Allel, positiven ES-Zellklone bei Verwendung der Sonde 6. **D,** Dargestellt sind nSMase3-chimären Mäuse der F1-Generation. Die schwarzen Hautzellen, welche von den gentechnisch-veränderten Bruce4-ES-Zellen derivieren, sind klar zu erkennen.

Die Injektion des ES-Zellklons in die aus CB20–Mäusen gewonnenen Blastozysten erfolgte durch das "Center for Mouse Genetics" des Instituts für Genetik, Köln. Nach der Transplantation der chimären Blastozysten in pseudoschwangere Leihmütter entstanden chimäre F1-Nachkommen (Abb.3.5D). F2-Nachkommen der Chimären wurden durch Rückkreuzung mit WT Mäusen (CB57BL/6) generiert. Die PCR Analyse des Genoms der Nachkommen ergab, dass das loxP flankierte Allel der nSMase3 (nSMase3^{FL(neo)}) keimbahngängig war und somit auf die Nachkommen vererbt wurde (Abb.3.6B). Anschließend wurden nSMase3^{FL(neo)/WT} Mäuse mit einer

für FLP-Rekombinase transgenen Maus gekreuzt, um die Neo-Kassette *in vivo* zu deletieren (Rodriguez et al., 2000). Zur Verifizierung der nSMase3^{FL(neo)} Mäuse wurde eine Drei-Primer Strategie entworfen.



Abbildung 3.6: PCR und Southern Blot Strategie zur Etablierung einer nSMase3^{FL} Mauslinie. A, Schematische Darstellung der möglichen Allele und die Position der Primer. **B**, (Spur 1) Nachweis der F2-Nachkommen der Chimären die durch Rückkreuzung mit WT Mäusen (CB57BL/6) generiert wurden (Spur 2). Deletierte neo^r Kassette in einer nSMase3^{WT/FL} Maus nach Verpaarung mit einer für die FLP-Rekombinase transgenen Maus. **C**, Southern Blot Analyse EcoRV (50u) verdauter DNA (20µg) mit der genomischen Sonde (Sonde 6) die das gefloxte Allel bei 11,7 und das nSMase3^{WT} Allel bei 14,2 detektiert. M=Marker

Hierzu wurden zum einen die zwei Typisierungsprimer 5'loxP-fw1 und 5'loxP-flx-rev1 verwendet, die einen 67 bp großen Bereich vom nSMase3^{WT/WT} Lokus flankierten. Zum anderen amplifizierten im Falle der homologen Rekombination die Primer 5'loxP-fw1 und 5'loxP-rev1 eine 244 bp große Sequenz (Abb.3.7A). Zudem konnte mit der gleichen PCR Analyse die Deletion der neo^r Kassette nachgewiesen werden, da hierbei die Primer 5'loxP-fw1 und 5'loxP-fw1 und 5'loxP-fw1 und 5'loxP-fw1 und 5'loxP-flx-rev1 eine 187 bp große Bande amplifizieren (Abb.3.6B). Zusätzlich zur PCR Analyse wurde zur Bestätigung der

homologen Rekombination eine Southern Blot Analyse mit Sonde 6 durchgeführt. Zur Herstellung der Sonde 6 wurde eine PCR mit den Primern 6-3'und 6-5' durchgeführt, welche eine 600 bp große intronische Sequenz zwischen Exon 10 und 11 flankieren. Diese Sequenz liegt, im Falle einer homologen Rekombination in einem 11,7 kb großen EcoRV flankierten DNA Fragment, während in nSMase3^{WT/WT} Mäusen dieser Lokus 14,2 kb groß ist (Abb.3.7)

3.4 Generierung von nSMase3 defizienten Mäusen (nSMase3^{Δ/Δ})

Für die Etablierung einer nSMase3 defizienten Mauslinie (nSMase3^{Δ/Δ}) wurden zunächst heterozygot gefloxte Mäuse (nSMase3^{WT/FL}) mit einer Cre-Deleter Linie verpaart, um heterozygote nSMase3 defiziente Mäuse (nSMase3^{WT/Δ}) zu erhalten. Aus diesen Würfen wurden für die folgenden Kreuzungen männliche nSMase3^{WT/Δ} Mäuse mit WT (CB57BL/6) Weibchen verpaart. Dieser Zwischenschritt ist wichtig, da das Gen für Deleter-Cre auf dem X-Chromosomen lokalisiert ist und somit in Weibchen inaktiv als Barr Körperchen vorliegt. Dadurch kann es zu Mosaik-artigen Deletionen des nSMase3 Gens kommen. Um nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse zu generieren, wurden im nächsten Schritt nSMase3^{WT/Δ} Mäuse in einer Inzucht verpaart. Um die nSMase3 Mutagenese zu verifizieren, wurde eine neue Drei-Primer Strategie entworfen. Hierbei amplifizierten die Primer 5'loxP-fw2 und 3'loxP-rev1 in einem deletierten Lokus eine 242 bp große Bande, welche beim nSMase3^{WT}-Lokus einen Bereich von 153 bp umspannt (Abb.3.7B). Zusätzlich zu der PCR Analyse wurde die Cre-vermittelte Deletion des nSMase3 Gens durch Southern Blot Analysen bestätigt. Hierzu wurde die genomische DNA, der zu untersuchenden Mäuse mit dem Restriktionsenzym Spel verdaut und mit Sonde 6 hybridisiert. In nSMase3^{WT/WT} Mäusen resultiert dies in einem 13,5 kb großen Lokus, welcher bei nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen 12 kb umspannt (Abb.3.7E).



Abbildung 3.7: Generierung einer nSMase3 defizienten Mauslinie A-B, Schematische Darstellung der (A) nSMase3^A, nSMase3^{FL(neo)} und des nSMase3^{FL} Konstruktes, so wie der (B) möglichen Allele und die Position der Primer. **C-D**, Southern Blot Analyse von (C) EcoRV und (D) Spel verdauter genomischer DNA mit der genomischen Neo Sonde. Das gefloxte Allel resultiert in einem 2,7 kb großen Lokus nach (C) EcoRV, sowie in einem 10,2 kb großem Lokus nach (D) Spel Verdau **E**, Southern Blot Analyse von genomischer DNA aus nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} nach Spel Verdau. Als Sonde wurde Sonde 6 verwendet, welche ein 13,5kb (nSMase3^{WT}-Allel) und 12kb (nSMase3^Δ-Allel) großen Abschnitt detektiert. **F**, Nachweis der Deletion des nSMase3 Gens in der Maus mittels PCR Analyse. **G**, Relative mRNA Expression der nSMase3 in den angegebenen Geweben von nSMase3^{WT/WT} (n=7-8) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=5) Mäusen. *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

Um illegitime Rekombinationsereignisse in den Mäusen ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine Southern Blot Hybridisierung mit einer Targeting Vektor spezifischen Sonde (Neo-Sonde) durchgeführt. Die Abb.3.7C und D zeigt, dass die Neo-Sonde in den rekombinanten Klonen eine 2,7 kb (EcoRV Verdau) und eine 10,2 kb (Spel Verdau) Bande detektiert und für eine singuläre Integration des Targeting Vektors in das ES Zellgenom spricht. Um die Defizienz der nSMase3 auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurden quantitative Real-Time Analysen der nSMase3-Expression in verschiedenen Organen wie Hypothalamus, Hypophyse, Leber, Herz und Hoden durchgeführt. Dazu wurde eine nSMase3 Sonde selbst erstellt, welche im Bereich von Exon 8 bis Exon 10 bindet und damit Intron-überspannend ist. Wie zu erwarten, konnte in keinem der untersuchten Organe von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen nSMase3 Expression nachgewiesen werden (Abb.3.7G).



Abbildung 3.8 Quantifizierung von Sphingomyelinen mit unterschiedlichen Fettsäureacylketten (C16 bis C26) in nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mausgeweben mittels LC-MS/MS. Zu sehen sind die Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus Hirn, Leber, Fett und Hoden von nSMase3^{WT/WT} (n=6-8) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=4-5). In allen Figuren ist der Mittelwert +/- SEM (*standard error of the mean*) abgebildet. *, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$; ***, $p \le 0.001$.

Da die nSMase3 die Spaltung von SM zu Cer und Phosphorylcholin katalysiert, wurde die Sphingolipid Zusammensetzung ausgewählter Organe von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) bestimmt. Es wurde der Gehalt an Fettsäureacyl-Subspezies von SM, Cer und Glucosylceramiden im Hirn, Leber, weißem Fettgewebe und Hoden gemessen und zwischen den Genotypen verglichen (Abb.3.8-3.10). Während im Hirn und Hoden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen detektiert werden konnten (Abb.3.8A und D), waren in der Leber und im weißen Fettgewebe die Mengen an lang- und kurz-kettigen SM Spezies (C16:0, C18:0 und C24:0) in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen signifikant erhöht. Zudem wurde in der Leber von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen eine erhöhte Menge an C24:1 SM festgestellt. Interessanterweise war die Menge an C22:0 SM die einzige SM Spezies, deren Gehalt im hepatischen Gewebe der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse signifikant niedriger war (Abb.3.8B und C).

Bei der Analyse der Cer-Spezies konnten im Hirn keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Abb.3.9A). Jedoch waren in der Leber die Spezies mit den Acylketten C16:0, C18:0 und C24:1 in ihrem Gehalt erhöht, die C22 Spezies war dagegen reduziert (Abb.3.9B). Im weißen Fettgewebe war der Gehalt der Cer C16:0 und C24:1 in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen signifikant niedriger. Nur das lang-kettige Cer C24:0 kam in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen in signifikant höheren Mengen vor (Abb.3.9C). Bei der Analyse der Hoden wurden signifikant niedrigere Mengen aller Acyl-Subspezies mit Ausnahme von Cer C18:0 und C20:0 detektiert (Abb.3.9D)



Abbildung 3.9: Quantifizierung von Ceramiden mit unterschiedlichen Fettsäureacylketten (C16 bis C26) mittels LC-MS/MS in nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mausgeweben. Zu sehen sind die Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus Hirn Leber, Fett und Hoden von nSMase3^{WT/WT} (n=6-8) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=4-5). *, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$; ***, $p \le 0.001$.

Bei der Quantifizierung der Glucosylceramide konnten wie bei den SM keine Unterschiede zwischen nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen im Hirn und den Hoden festgestellt werden (Abb.3.10A und D). Bei der Analyse der Glucosylceramide in der Leber konnten erhöhte Mengen aller Acyl-Subspezies mit Ausnahme von Glucosylceramid C22:0 detektiert werden (Abb.3.10B). Im weißen Fettgewebe waren alle Vertreter der lang-kettigen Glucosylceramide (C22:0 bis C24:1) in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen in ihrem Gehalt signifikant erhöht (Abb.3.10C).

48



Abbildung 3.10: Quantifizierung von Glucosylceramiden mit unterschiedlichen Fettsäureacylketten (C16 bis C26) mittels LC-MS/MS in nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mausgeweben.</sup> Zu sehen sind Mittelwerte +/- Standardabweichungen aus Hirn Leber, Fett, und Hoden von nSMase3^{WT/WT} (n=6-8) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=4-5). *, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$; ***, $p \le 0.001$.

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass eine nSMase3 Defizienz nicht zu einer uniformen Akkumulation von SM bzw. Verminderung von Cer in verschiedenen Organen führt, sondern weiter-reichende Veränderungen im Sphingolipidstoffwechsel zur Folge hat.

3.5 nSMase3 Defizienz führt zu hoher postnataler Sterblichkeit in Mäusen

Um die generelle Embryogenese zu untersuchen, wurden Schwangerschaften von Inzuchtverpaarungen (nSMase $3^{WT/\Delta}$ x nSMase $3^{WT/\Delta}$) am Tag 16,5 d.p.c (day post coitum) (E 16,5) abgebrochen, die gewonnenen Embryonen gewogen und auf

phänotypische Veränderungen untersucht. Jedoch zeigten die Embryonen bis zum Tag der Geburt keine Auffälligkeiten zwischen den Genotypen (Abb.3.11A).



Abbildung 3.11: Keine phänotypischen Auffälligkeiten während der Embryogenese von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. **A-C,** Graphische Darstellung des Gewichtes und der Körpergröße von nSMase3^{WT/WT}, nSMase3^{WT/Δ} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen an Tag E16 (A) und P1 (B und C). **D,** Fotographische Darstellung der gleichen Mäuse an Tag P1. E; embryonal, P; postnalal

Da die nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse beim Absatz von der Mutter (Tag 21 (P21)) schon starke Unterschiede im Wachstum, starke Gewichtsreduktion und Verhaltensauffälligkeiten zeigten, war es von großem Interesse die Entwicklung der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse, schon während der Embryogenese, sowie in der Zeit zwischen Geburt und dem Absatz zu untersuchen. Die Analyse von 59 pränatalen Mäusen ergab die Identifizierung von 23 nSMase3^{WT/WT}, 26 nSMase3^{WT/Δ} und 10 nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Das Verhältnis der nSMase3^{WT/WT} zu nSMase3^{Δ/Δ} Genotypen beträgt hierbei etwa 2:1 (Abb.3.12B). Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch die Genotypisierung von 34 Mäusen direkt nach der Geburt (Tag1 (P1)); in dieser Studie wurden 16 nSMase3^{WT/WT}, 19 nSMase3^{WT/Δ} und 9 nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen gezählt. Das Verhältnis von nSMase3^{WT/WT} zu nSMase3^{Δ/Δ} beträgt auch hier etwa 2:1 (Abb. 3.12C).



Abbildung 3.12: nSMase3 Defizienz ist teilweise embryonal letal und führt zu hoher postnataler Sterblichkeit. A, Graphische Darstellung der Anzahl aller Genotypen von 493 Nachkommen aus Inzucht Verpaarungen von nSMase3^{WT/Δ} Mäusen an Tag E16,5, P1 und P21. B-D, Graphische Darstellung der Genotypen an (B) Tag E16,5 (n=59), (C) P1 (n=34), sowie (D) P21 (n=493). E Graphische Darstellung der Überlebensrate von nSMase3^{WT/Δ}, nSMase3^{WT/Δ} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Die Überlebensrate wurde pränatal, an Tag 1 und an Tag 21 bestimmt und in Prozent dargestellt. E; embryonal, P; postnatal

Des Weiteren wurden wie in Abb.3.12D zu sehen ist, die Genotypen von 493 Nachkommen (P21) zusammengefasst. Die Genotypisierung von 204 nSMase3^{WT/WT}, 255 nSMase3^{WT/Δ} und 34 nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen ergab ein Verhältnis von 6:1 von nSMase3^{WT/WT} zu nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Diese Ergebnisse weichen von der 1:2:1 Mendelschen Vererbungsregel ab und deuten auf einen partiell pränatal letalen Phänotyp und eine hohe postnatale Sterberate bis Tag 21 der nSMase3 defizienten Mäuse. Interessanterweise betrug die durchschnittliche pränatale Wurfgröße (alle Genotypen) 8 Mäuse, jedoch schon nach drei Tagen lebten im Durchschnitt nur noch 5- und nach 21 Tagen (beim Absetzen vom Muttertier) sogar nur noch 4 Mäuse (Abb.3.12A). Die Daten basieren auf der Auszählung von insgesamt 115 Würfen. Aufgrund der hohen Sterblichkeit wurden die Nachkommen postnatal ab Tag 1 gewogen. Die Daten zeigen ab dem zweiten Tag einen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen nSMase3^{WT/WT}- und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. An Tag 21 war das Gewicht der nSMase3^{Δ/Δ} - um fast 50% gegenüber nSMase3^{WT/WT} Mäusen reduziert (Abb.3.13A, C und D). Dieser Unterschied im Körpergewicht der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse ging einher mit einer Wachstumsverzögerung im Vergleich zu nSMase3^{WT/WT} Mäusen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sterberate der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse besonders in den ersten zwei Tagen nach der Geburt und an Tag 11,12 und 13 erhöht war (Abb.3.13B). Die erhöhte Sterblichkeit resultierte in einer Überlebensquote von ca. 14% der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse in den ersten 3 Wochen. Interessanterweise überlebten annähernd alle Mäuse, die nicht bis Tag 14 gestorben waren, bis zum Ende der Studien. Die Wachstumsverzögerung der überlebenden Mäuse blieb über die gesamte Lebensspanne der nSMase $3^{\Delta/\Delta}$ Mäuse bestehen, so betrug der Gewichtsunterschied bei 12 Wochen alten Mäusen 40% im Vergleich zu nSMase3^{WT/WT} Tieren (Abb.3.13E). Interessanterweise waren die Organe, relativ zum Körpergewicht, nicht signifikant kleiner. Die einzige Ausnahme bildete hier das epigonadale Fettgewebe, das in 6 Wochen alten nSMase3 defizienten Mäusen um über 50% und in drei Monate alten Mäusen um ca. 40% reduziert war (Abb.3.13G-I).



Abbildung 3.13: nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse zeigen reduziertes postnatalen Wachstum und erhöhte Sterblichkeit A, Durchschnittliches Körpergewicht von nSMase3^{WT/WT} (n=22) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=19) Mäusen gemessen von Tag 1 bis Tag 21. B, Postnatale Sterberate der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse von Tag 1 bis Tag 21 (n=19). C-D, Fotografische Aufnahmen von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen an Tag (C) 12 und (D) 24. E, Durchschnittliches Körpergewicht von nSMase3^{WT/WT} (n=7), nSMase3^{WT/Δ} (n=7) und nSMase3^{Δ/Δ} (n=7) Mäusen über einen Zeitraum von Woche 3 bis Woche 12. F, Hypoplasie der Organe innerhalb der Körpers G-I, Graphische Darstellung der Organgewichte. *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

3.6 Knochenstruktur von nSMase3^{∆/∆} Mäusen ähnelt dem Aufbau der Wildtyp-Mäuse, unterscheidet sich jedoch in der Länge der Knochen

Da die nSMase3 Defizienz in einer starken Wachstumsverzögerung resultierte, wurde untersucht werden, ob sich diese Verzögerung auch auf die Knochenstruktur auswirkt. Zur Untersuchung skelettaler Elemente von 3 Monaten alten Mäusen (n=2) wurden die kalzifizierten und knorpeligen Gewebe des Skeletts mittels Alizari Rot/Alcian Blau Färbung in nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen untersucht. Die repräsentativen Übersichtsaufnahmen der gefärbten Extremitäten (Vorderbeine) der nSMase3 defizienten Mäuse zeigen keine Deformationen und gleichen im Gesamterscheinungsbild den Extremitäten der Wildtyp Mäuse (Abb. 3.14). Im Zuge der verminderten Größe der Mäuse unterscheiden sich die Röhrenknochen der nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} Mäuse signifikant in der Länge. Die Länge der kalzifizierten Bereiche von Humerus und Ulna lagen in nSMase3^{WT/WT} Mäusen im Bereich von ~1,08 cm und ~1,28 cm, wohingegen diese in nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen bei ~0,87 cm und ~1,05 cm lagen. Aus diesen Werten resultiert eine Verkürzung des Humerus um 20% und der Ulna um 18% bei nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Bei der Untersuchung der Wachstumsfugen ließen sich keine Unterschiede in der Organisation feststellen, außer, dass die Ausdehnung proportional zur Körpergröße verkleinert war.



Abbildung 3.14: Verkürzte Röhrenknochen in nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Alizari Rot/Alcian Blau gefärbte Vorderbeine von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Die mineralisierten (rot) und knorpeligen Elemente (blau) sind histochemisch hervorgehoben. Balken: 2545,3 µm. Vgm=Vordere Gliedmaße; li=links; r=rechts

3.7 nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse zeigen partielle Veränderungen in der mRNA Expression von Wachstumshormonen in endokrinen Organen der Wachstumsachse

Als nächstes sollte untersucht werden, ob das verminderte Wachstum durch eine Beeinträchtigung der Hypothalamus-Hypophysen-Zielorgan-Achse verursacht wird. So regelt das hypothalamische Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH) die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) aus den Somatotropen-Zellen des Hypophysenvorderlappens. GH ist die Hauptdeterminante für Körpergröße und Gewicht. Zudem stimuliert GH die hepatische Synthese und Sekretion von Insulinähnlichem Wachstumsfaktor 1 (IGF1) (Daughaday and Rotwein, 1989; Rubin and Baserga, 1995). IGF1 spielt eine essentielle Rolle u.a. beim Wachstum und bei der Spermatogenese. Da diese Drüsen miteinander in ständiger Wechselwirkung stehen, bildet dieses System eine Einheit aus endokrinen Drüsen und wird auch als Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse die bezeichnet. Aufgrund des verminderten Wachstums und Infertilität der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse wurde eine Störung dieser Achse angenommen. Aus diesem Grund wurden die Expressionslevel der Hormone überprüft, die eine wesentliche Rolle beim Wachstum und der Fortpflanzung spielen.

Hierzu wurde über quantitative Real-Time PCR die mRNA-Expression wichtiger Hormone wie GHRH, Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH), Wachstumshormon-Releasing-Hormon-Rezeptor (GHRHR), follikelstimulierendes Hormon Releasing-Hormon (FSH), luteinisierendes Hormon (LH), sowie Prolaktin (PRL) in Hypothalamus und der Hypophyse überprüft. FSH und LH wirken synergetisch und werden von Gonadotrophen Zellen der Hypophyse produziert und sezerniert. Zudem sind sie involviert in die Regulation von Wachstum, Pubertät und in die reproduktiven Prozesse im Körper (O'Shaughnessy et al., 2009; Webb et al., 2004). Bei der Untersuchung der Expressionslevel von GHRH und GnRH wurden in beiden untersuchten Altersgruppen (zu Beginn der Geschlechtsreife, Woche 6; sowie in adulten Tieren, Woche 12) der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu den Kontroll-Tieren festgestellt (Abb.3.15A und B). Nur die Expression von PRL war in den 6 Wochen alten nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen signifikant niedriger im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen. Da jedoch Prolaktin-Rezeptor defiziente Tiere zu 80% fertil sind, ist nicht davon auszugehen, dass der Wachstumsphänotyp sowie die männliche Infertilität daher kommt (Bole-Feysot et al., 1998).



Abbildung 3.15: Partielle Unterschiede zwischen der Expression von Wachstumshormonen in nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} Mäusen. A, C und E, Relative mRNA Expressions-Analysen von 6 Wochen alten nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} Mäusen im (A) Hypothalamus, (C) Hypophyse und (E) Leber B, D und F Analyse der relativen mRNA Expression in (B) Hypothalamus, (D) Hypophyse und (F) Leber von 3 Monate alten nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} Mäusen.*, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$; ***, $p \le 0.001$.

Über quantitative Real-Time PCR wurde die hepatische mRNA-Expression von Wachstumshormon-Rezeptor (GHR), IGF1, IGFbp1, IGFbp5 und IGFbp6 (IGF-Bindeproteine1, -5, -6) untersucht, welche keine Unterschiede zwischen den Genotypen aufzeigten (Abb.3.15E und F).

3.8 Ablation der nSMase3 in Mäusen führt zu reduzierter IGF1 Konzentration im Serum

Die Serumkonzentration von IGF1 ist ein stabiler Indikator der GH Sekretion während der postnatalen Wachstumsphase. Da die nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse keine Veränderungen in den mRNA Expressionsleveln (Abb.3.15E und F), aber dennoch Wachstumsdefizite aufwiesen, wurden die IGF1 Serumkonzentrationen gemessen. Zur Bestimmung der Serum IGF1-Konzentration in 6 Wochen alten nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} Mäusen (n=5) wurde ein *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durchgeführt. Die Analyse ergab eine um 44% reduzierte Menge an IGF1 im Serum von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen verglichen mit nSMase3^{WT/WT} Mäusen (Abb.3.16).



Abbildung 3.16: Reduzierte Serum IGF1 Level in nSMase3^{Δ/Δ} **Mäusen**.IGF1 Serum Level von nSMase3^{Δ/Δ} und nSMase3^{WT/WT} wurden durch den ELISA Test bestimmt(n=5). *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

Dies könnte ein Grund für das verringerte Wachstum in den mutagenen Mäusen sein.

3.9 nSMase3 Defizienz führt zu einer gestörten Spermatogenese

Im Hinblick auf die Tatsache, dass die nSMase3 stark in den Fortpflanzungsorganen exprimiert ist (Abb.3.4B) und Inzuchtverpaarungen von 4 Monaten alten nSMase $3^{\Delta/\Delta}$ keine Nachkommen zeugten, wurden die Fortpflanzungsorgane Mäusen weitergehend untersucht. Der adulte Hoden dient als paariges Organ der Bildung der (Spermatogenese) und männlichen Geschlechtshormone Spermien der (Androgensynthese). Die Regulation der Spermatogenese über Hormone ist als ein endokriner Regelkreis mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus unter Einbeziehung des Hypothalamus, des Hypophysenvorderlappens (Adenohypophyse) und der Hoden organisiert (Abb.1.6). Neuroendokrine Zellen des Hypothalamus produzieren das Peptidhormon GnRH, welches im Hypophysenvorderlappen dann die Sekretion von FSH und LH stimuliert. Im Hoden bindet LH an entsprechende Rezeptoren der Leydig-Zellen und stimuliert so die Produktion von Testosteron, welches wiederum durch negative Rückkopplung auf den Hypothalamus und die Hypophyse wirken kann. Zudem wurde postuliert, dass IGF1 eine wichtige Rolle in der Reifung von Leydig-Zellen spielt, welche nur im ausgereiften Zustand Testosteron produzieren. Somit hat Testosteron eine essentielle Rolle in der Spermatogenese.



Abbildung 3.17: Gestörte Spermatogenese in nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. A und B, Histomorphologische Hodenstruktur von 3 Monaten alten nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen. Die Hodenschnitte wurden mit (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt. C-H Immunochistochemische Färbung der Leydig-Zellen (Pfeil) mit Testosteron AK in 3 Monaten alten nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen in verschiedenen Vergrößerungen: (Messbalken Größe ; A-B 50 µm; C-D 500 µm, E-F 50 µm; G-H 20 µm) Spermatogenese fasst sämtliche Vermehrungs- und Reifungsvorgänge zusammen, die sich während der Entwicklung der männlichen Keimzelle in den Samenkanälchen abspielen und die Bildung von reifen Spermien zum Ziel haben. Zu den im Keimepithel von adulten Hoden befindlichen Keimzellen zählen die peripher an der Basalmembran liegenden Spermatogonien vom Typ A und B, die lumenwärts folgenden primären und sekundären Spermatozyten sowie die lumennahen runden und schließlich ausdifferenzierten elongierten Spermatiden. Ausgehend von diesen Befunden wurden histologische Analysen der Hoden von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen durchgeführt (Abb. 3.17). Hierbei zeigte sich in den nSMase3^{WT/WT} Mäusen eine gualitativ normale Spermatogenese, während die nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse histologisch einen Arrest der Spermatogenese auf der Stufe der Spermatozyten zeigten (Abb.3.17A und B). Von diesen Ergebnissen angeregt, wurde die Testosteron-Produktion durch eine immunohistologische Färbung in den Hoden von nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen durchgeführt. In den nSMase3^{WT/WT} Mäusen konnte im Bereich der Leydig-Zellen Testosteron nachgewiesen werden (Abb.3.17C, E und G), während in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen nur marginale Spuren Steoidhormons detektiert werden konnten (Abb.3.17D, F und H). des Zusammengenommen deutet dies auf eine gestörte Testosteronproduktion sowie Spermatogenese in männlichen nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen hin.

3.10 Generierung einer konditional induzierbaren nSMase3 Defizienz in der Maus

Aufgrund der hohen Sterblichkeit der nSMase3^{∆/∆} Mäuse und der gestörten Sekretion von IGF1 in der Leber sollten Mäuse generiert werden in denen das nSMase3 Gen induzierbar inaktiviert werden kann. Dazu wurden nSMase3^{FL/FL} Mäuse mit Mx-Cre Mäusen verpaart. Mx-Cre Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem Interferon-induzierbaren Mx-Promoter, welcher entweder durch IFN oder Polynosin:Polycytidylsäure (Poly (I:C)) Applikation angestellt werden kann (Jaisser, 2000). Die Mx-1 induzierte Cre Expression beläuft sich auf alle IFN-induzierbaren Gewebe, wie z.B. Leber, Milz, Knochenmark und Thymus aber auch teilweise im Hirn, im Herzen und in der Niere (Betz et al., 1998).


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der Konditionalen Mutagenese von nSMase3 in der Leber. Injektion von Poly I:C führt zur Bildung von IFN, welches wiederrum einen Mx1 Promotor aktiviert der die Expression von Cre aktiviert. Die Cre-Rekombinase trennt daraufhin den DNA-Strang an ihren Erkennungssequenzen, den loxP-Schnittstellen und deletiert das nSMase3 Gen.

Die heterozygoten nSMase3^{FL/WT} Mx-Cre^{+/-} Mäuse der F1 Generation wurden mit nSMase3^{FL/FL} Mäusen verpaart. Aus der F2 Generation wurden ausschließlich nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und als Kontrolle nSMase3^{FL/FL} Mäuse verwendet (Abb.3.19A und B). Weiterhin werden nachfolgend in den Abbildungen nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} als WT, und die nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} als KO terminologiert werden.



Abbildung 3.19: Verifizierung der konditionalen nSMase3 Deletion in nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäusen nach Gabe von Poly (I:C). A und B, In Spur 1 und 3 sind die 187 bp sowie die 350 bp große Banden zu sehen die für nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse charakteristisch sind. A und B, Die Spuren 2 und 4 zeigen für nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäuse charakteristischen Banden C, Relative mRNA Expression der nSMase3 in Hypothalamus (HT), Hypophyse (HP), Muskel, Herz und Leber von nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} (n=7-8) und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} (n=5) Mäusen. *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

Die Deletion des loxP flankierten nSMase3 Allels wurde durch intraperitoneale Injektion von Poly (I:C) erreicht. Hierzu wurde den Mäusen im Alter von 10 Wochen innerhalb von 7 Tagen, eine dreimalige Poly (I:C) Injektion mit einer Einzeldosis von 20 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Poly (I:C) ist ein synthetisches Analogon zu Doppelstrang-RNA wie sie in manchen Viren vorkommt, wodurch die Synthese von Interferon stimuliert wird. Dadurch wird die Cre-Rekombinase, welche unter der Kontrolle eines induzierbaren Interferon α/β Promotors des Mx-1 Gens steht, aktiviert und bewirkt die Deletion der nSMase3. Für die Genotypisierung der Mx-Cre Mäuse wurde die in Abschnitt 3.3 beschriebene PCR verwendet. Die Mäuse, die homozygot für das loxP flankierte nSMase3 Gen waren, zeigten eine 187 kb große Bande. Um die Cre Rekombinase in den Mäusen nachzuweisen wurde zusätzlich eine PCR mit den Primern Uni-Cre1 und Uni-Cre 2 gemacht, die in Cre positiven Mäusen eine 350 kb Bande amplifizierten (Abb.3.19B). Um die Deletionseffizienz der nSMase3 nach Poly (I:C) Behandlung zu überprüfen, wurden die Mäuse vier Wochen nach Poly (I:C) Behandlung getötet und verschiedene Organe wie Hypothalamus, Hypophyse, Muskel, Herz und Leber entnommen und guantitative Real-Time PCR Analysen durchgeführt (Abb.3.19C). Im Hypothalamus, Muskel und Herz waren keine signifikanten Unterschiede in der nSMase3 mRNA Expression zu verzeichnen. Erwartungsgemäß konnte in der Leber der nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse keine Expression der nSMase3 detektiert werden. Im Vergleich zu den nicht induzierten Mäusen war in den induzierbaren konditional nSMase3 defizienten Mäusen die Expression der nSMase3 in der Hypohyse signifikant um 70 % reduziert (Abb.3.19C).

3.11 Mäuse mit induzierbarer Deletion der nSMase3 weisen keinen Wachstumsphänotyp auf

Da nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse einen starken Gewichts-, sowie Wachstumsphänotyp nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} aufwiesen, wurde das Körpergewicht von und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen bis Woche 14 gemessen, wobei Poly (I:C) nach der zehnten Woche appliziert wurde. Die Analyse des Körpergewichts zeigte jedoch weder vor, noch nach Poly (I:C) Applikation Unterschiede zwischen nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen (Abb.3.20A).



Abbildung 3.20: Mäuse mit induzierbarer Inaktivierung der nSMase3 weisen keinen Wachstumsphänotyp auf. A, Durchschnittliches Körpergewicht von nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen gemessen ab Woche 3 bis Woche 14 (n=42) **B**, Graphische Darstellung der Körpergröße von nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen an Woche 14.

Weiterhin wiesen nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse nach Poly (I:C) Applikation keinen Wachstumseffekt auf, wie durch die Messung der nasoanalen Länge der Mäuse festgestellt werden konnte (Abb.3.20B). Allerdings sind Mäuse im Alter von 10 Wochen komplett ausgewachsen und nehmen nur noch in Bezug auf das Körpergewicht und nicht in der Körperlänge zu.



Abbildung 3.21: Keine Unterschiede, außer bei IGF1 zwischen der Expression von Wachstumshormonen in nSMase3^{MxPolyI:C} Mäusen. A-C, Relative mRNA Expressions Analysen von 14 Wochen alten nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und die nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen im (A) Hypothalamus, (B) Hypophyse und (C) Leber. **D**, IGF1 Serum Level von nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und die nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen (n=7) wurden durch den ELISA Test bestimmt. *, $p \le 0.05$; **, $p \le 0.01$; ***, $p \le 0.001$.

Des Weiteren wurden die Expressionslevel von Hormonen der Wachstumsachse in 14 Wochen alten Poly (I:C) applizierten Mäusen überprüft; GnRH im Hypothalamus, GH, GHRHR, LH und PRL in der Hypophyse und IGF1 in der Leber (Abb.3.21A, B und C). Hierbei wurde nur bei IGF1 in der Leber ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel detektiert (ca. 20%) was jedoch keine Auswirkungen auf die IGF1 Serumkonzentrationen hatte (Abb.3.21D). Die Leber ist das wichtigste Organ zur Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Blutzuckerspiegels. Während die Leber bei ausreichender Glukose Versorgung überschüssige Glukose als Glykogen speichert, gibt sie zur Aufrechterhaltung während einer Fastenperiode das gespeicherte Glykogen in Form von Glukose wieder in den Blutkreislauf ab. Dieser Mechanismus stellt die Glukoseversorgung von Organen wie z.B. dem Hirn sicher, welche nicht selbst Glukose mobilisieren können.



Abbildung 3.22: Charakterisierung der Mx Cre Mäuse. **A-B,** Glukose-Toleranz-Test von nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} und nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/-} Mäusen, vor (A) und nach (B) Poly (I:C) Applikation. **C-D**, Insulin-Toleranz-Test vor (C) und nach (D) Poly (I:C) Applikation

Zur Klärung der Frage, ob die leberspezifische Deletion die Glukosehomöostase beeinträchtigt, wurden die Mäuse einem Glukose-Toleranz-Test (GTT) und einem Insulin-Toleranz-Test (ITT) unterzogen. Jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen weder vor noch nach Poly (I:C) Gabe in der Glukose-Toleranz, bzw. Insulin Sensitivität.

Zusammengenommen weisen induzierbare nSMase3 defiziente Mäuse im Alter von 14 Wochen weder einen Wachstumsphänotyp noch eine signifikante Veränderung des Glukosestoffwechsels auf. Allerdings ist die IGF1 Expression in der Leber dieser Mäuse reduziert, was sich aber nicht auf die IGF1 Serumkonzentration auswirkt.

4. Diskussion

Die *de novo* Biosynthese sowie Hydrolyse von Sphingolipiden sind stark-regulierte Prozesse, da Sphingolipide viele intrazellulären Signalkaskaden und Prozesse beeinflussen. Sphingomyelinasen (SMasen) bilden eine Familie von Enzymen, die die Spaltung der Phosphodiesterbindung in Sphingomyelin (SM) katalysieren und so Ceramid (Cer) und Phosphorylcholin generieren. Es sind mindestens 7 verschiedene SMasen identifiziert, die sich in ihrem pH Optimum (saure oder neutrale SMase) und in ihrer Kationen-Abhängigkeit unterscheiden. Jedoch ist die zelluläre und physiologische Bedeutung vieler Mitglieder dieser Proteinfamilie noch weitestgehend unbekannt.

4.1 Die Rolle des C-Terminus der nSMase3 für die zelluläre Lokalisation

Die nSMase3 wurde ursprünglich als eine Mg²⁺ abhängige SMase identifiziert, die eine hohe Konservierung zwischen allen untersuchten Spezies aufweist. Dabei weist sie aber nur sehr wenige Sequenzhomologien zu den bis dato bekannten nSMasen (nSMase1 und nSMase2) auf. Durch Überexpression in einem SMase-defizienten Hefestamm (JK9-3d∆lsc1p) wurde die nSMase3 als echte (bona fide) SMase verifiziert (Krut et al., 2006). Ähnlich wie die nSMase2 wurde die nSMase3 auch am ER/Golgi Apparatus lokalisiert. Vorherige Arbeiten suggerierten, dass der C-Terminus der nSMase3 für die spezifische Lokalisation am ER verantwortlich ist (Krut et al., 2006). Die hier durchgeführten Analysen bestätigen eine Assoziation der nSMase3 mit dem ER (Abb.3.3). Das nSMase3-GFP-N3 (GFP lokalisiert am C-Terminus) Konstrukt zeigte im Unterschied zum GFP-nSMase3-C3 (GFP am N-Terminus) ein punktförmiges subzelluläres Verteilungsmuster, das nicht mit dem ER co-lokalisierte (Abb.3.3C und E). Dies verstärkt die Hypothesen von früheren Studien unserer Arbeitsgruppe, aus denen hervor geht, dass am C-Terminus trans-Membran Domänen lokalisiert sind, wodurch das Protein in die ER-Membran inseriert. Im Fall der C-terminalen GFP-Fusion ist der C-Terminus für die Lipidmembran nicht weiter zugängig und kann sich daher nicht an das ER anlagern. Weitere Untersuchungen sollten die subzelluläre Lokalisation von der endogenen nSMase mittels spezifischen

die artifiziellen Antikörpern erforschen, um Effekte von Fusionsproteinen auszuschließen. Weiterhin sollte die Assoziation mit weiteren Membranumschlossenen zellulären Kompartimenten u.a. Golgi, trans-Golgi. Peroxisomen, Endosomen ermittelt werden, die zum besseren Verständnis der physiologischen Bedeutung von nSMase3 beitragen können. Im Einklang mit diesen und vorherigen durch Fusionsproteine ermittelten Daten (Abb.3.3) (Krut et al., 2006; Romiti et al., 2000) ergab eine in silico-Analyse (PSORT II; anhand der Aminosäurensequenz wurde die theoretische Proteinlokalisation ermittelt) eine voraussichtliche subzelluläre Verteilung dieses Enzyms zum größten Teil im ER (55,6%), gefolgt von Mitochondrien (22,2%), der Plasmamembran (11,1%) und in den Vesikeln des Sekretorischen Systems (11,1%) (Nakai and Horton, 1999, 2007). Diese Daten deuten auf eine Überlappung mit dem Substrat der nSMase3, dem SM hin. So befindet sich SM zum größten Teil an der Außenseite der Plasmamembran (outer leaflet) und die Synthese findet vorwiegend im ER/Golgi an der luminalen Seite statt (Barenholz and Thompson, 1980; Futerman et al., 1990; Huitema et al., 2004). Zudem wurde ein SM Pool auch an der inneren Seite der PM nachgewiesen (Linardic and Hannun, 1994). Außerdem wurde gezeigt, dass durch TNF die Translokation der nSMase2 zu der PM induziert werden kann. Dieser Mechanismus hängt von der Aktivierung der p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ab (Clarke et al., 2007). In konfluenten Zellen und in Hepatozyten ist die nSMase2 zudem auch an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert (Tani and Hannun, 2007a). TNF Stimulation erhöht parallel die Aktivität und somit den SM Umsatz der nSMase3 in MCF-7 Zellen (Abb.3.2). Interessanterweise wird dieser Effekt durch die Expression von dominant-negativen FAN unterbunden, was daraufhin deutet, dass ein Regulationsmechanismus der nSMase3 stromabwärts von FAN zu liegen scheint (Adam-Klages et al., 1996; Krut et al., 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Hydrolaseaktivität von nSMase3 nach TNF Stimulation durch die Deletion von bis zu 208 N-terminalen Aminosäuren nicht beeinträchtigt ist (Abb.3.2A). Daher kann davon ausgegangen werden, dass in dem N-terminalen Bereich von 208 AS kein Bereich enthalten ist, der für die Enzymatische Aktivität des Enzyms notwendig ist. Ebenso hatte die Fusionierung von GFP am N- bzw C-Terminus der nSMase3 keine Auswirkungen auf die Aktivität. Diese Daten weisen daraufhin, dass nSMase2 und nSMase3 überlappende Funktionen haben, was durch

die ähnlichen Phänotypen der nSMase2 und nSMase3 defizienten Mäuse zumindest teilweise bestätigt wird (siehe unten Abschnitt 4.2).

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass der N-Terminus bei der Hydrolaseaktivität nicht essentiell ist, während ein freier und für die Lipidmembran zugängiger C-Terminus für die Lokalisierung im sekretorischen Kompartment der Zelle wichtig sein scheint. Dort moduliert die nSMase3 zu die Sphingolipidkomposition und somit die Verteilung weiterer Lipide (u.a. Cholesterol) in der Membran. Fehlende oder erhöhte SMase Aktivität kann somit die biochemische Zusammensetzung und die Funktionalität von zellulären Membranen beeinträchtigen. Da das ER in vielen verschieden zellulären Prozessen beteiligt ist, kann die Veränderung der biochemischen Eigenschaften des ER viele zelluläre Prozesse, u.a. Vesikeltransport, die sekretorischen Signalwege und Kalziumhomöostase beeinflussen. Dies würde insbesondere in vivo dramatische Folgen haben, wie z.B. eine fehlende Sekretion von Hormonen oder Zytokinen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine nSMase3 defiziente Maus generiert und analysiert.

4.2 nSMase3-defiziente Mäuse leiden an verzögertem Wachstum und weisen eine erhöhte Sterblichkeit auf

Eine wichtige Rolle der SMasen in der Wachstumsphase konnte in diversen Untersuchungen nachgewiesen werden. So weisen z.B. nSMase2 defiziente Mäuse einen pleiotropen Phänotyp mit einer starken Verzögerung im späten embryonalen und postnatalen Wachstum und einer verkleinerten Hypophyse auf. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die nSMase2 in der Golgimembran von neurosekretorischen hypothalamischen Neuronen lokalisiert ist, wo ihre transiente Aktivierung zur Modifizierung der Lipiddoppelschicht führt. Dies stellt einen entscheidenden Schritt im sekretorischen Weg des Golgi-Apparates dar. In diesen Bereichen der Zelle findet sich auch das Substrat der nSMasen - das SM. Dieser Sachverhalt erklärt möglicherweise auch die verminderte GHRH-Produktion und Sekretion, die zu der beobachteten beeinträchtigten Entwicklung der Hypophyse und der niedrigeren Sekretion von GH führt (Stoffel et al., 2005). Interessanterweise zeigten die nSMase3 defizienten Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie die nSMase2^{Δ/Δ} Tiere. Beide Mausmodelle zeigten einen wesentlich niedrigeren IGF1 Spiegel, welcher einer der Gründe für den beobachteten Zwergwuchs sein könnte (Abb.3.16). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass das hypothalamische Wachstumshormon-Releasing-Hormon (GHRH) die episodische Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) den somatotropen Zellen des aus Hypophysenvorderlappens regelt (Gahete et al., 2009). GH, als Hauptdeterminante für Körpergröße wirkt auf die Leber ein, wo es zur hepatischen Sekretion des IGF1 führt (Daughaday and Rotwein, 1989; Rubin and Baserga, 1995). Da diese Veränderungen durch CPHD (combined pituiary hormone deficency) verursacht wurden, untermauerten diese Daten eine Schlüsselrolle der nSMase2 in der Kontrolle der Hypothalamus-Hypophyse-Zielorgan Achse (Stoffel et al., 2005). Die Analyse der nSMase3 defizienten Mäuse deutete ebenso auf eine wichtige Rolle der nSMase3 in der Hypothalamus-Hypophyse-Zielorgan Achse hin. Von Wichtigkeit ist, dass in den nSMase3 defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion des IGF1 Serumspiegels (über 55%) in 6 Wochen alten Mäusen gemessen wurde (Abb.3.16). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Serum GH Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt niedrig ist und erst danach ansteigt. Die höchsten GH Konzentrationen werden während den stärksten Wachstumsphasen und in der Pubertät detektiert (Christoforidis et al., 2005). Korrelierend werden zu diesen Zeitpunkten die höchsten IGF1 Konzentrationen verzeichnet, da GH/IGF1 aneinander gekoppelt sind. IGF1 Serumkonzentration können also als ein stabiler Indikator der GH Sekretion bezeichnet werden (Thissen et al., 1994). So wird durch die Bindung des Hormons GH an die hochaffine Bindungsstelle der extrazellulären Domäne, des bereits als Dimer vorliegendes Growth Hormon Receptors (GHR), eine assoziierte Januskinase 2 (JAK 2) aktiviert. Diese JAK 2 phosphoryliert dann sich selbst an zusätzlichen Tyrosinen. Zudem werden neben zytoplasmatischen Tyrosinresten des GHR weitere zytoplasmatische Tyrosinreste des GHR und viele andere Signalmoleküle wie z.B.: der Transkriptionsfaktor STAT 5b phosphoryliert (Urbanek et al., 1993). Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Dimerisierung des STAT 5 Proteins (Heinrich et al., 1998; Hibi et al., 1996; Hirano, 1998). Der dimerisierte STAT 5b-Faktor transloziert in den Zellkern und bindet dort an spezifische Enhancer-Elemente. Daraufhin wird die IGF1 Expression induziert. Die Ursache für die erniedrigten IGF1-Spiegel scheint in der Tat stromaufwärts der Leber, und möglicherweise sogar stromaufwärts der Hypophyse zu liegen. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse, die nach Poly(I:C) Applikation einen vollständigen Verlust der nSMase3 Expression in der Leber und eine um 70% reduzierte Expression in der Hypophyse zeigten (ohne Reduktion im Hypothalamus) (Abb.3.19C), wiesen keinen Unterschied der IGF1-Konzentrationen im Serum auf (Abb.3.21D). Zudem war die Expression von IGF1 auf mRNA Ebene in der Leber um ca. 20% reduziert (Abb.3.21C). Dies könnte darauf hindeuten, dass die nSMase3 eine zentrale Rolle bei der Sekretion von GH in der Hypophyse oder möglicherweise sogar bei der Sekretion von GHRH im Hypothalamus besitzt, während eine direkte Rolle in der hepatischen IGF1 Synthese eher unwahrscheinlich erscheint. Unterstützt wird diese Hypothese durch Northern Blot Analysen, die eine starke nSMase3 Expression im Hypothalamus von WT Mäusen belegen (Abb.3.4A). Dies könnte die unterschiedlichen Phänotypen zwischen den konstitutiven nSMase3^{Δ/Δ}- und den nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Poly(I:C)-induzierten Mäusen erklären: In Poly(I:C)induzierten Mäusen bleibt die hypothalamische nSMase3 Expression erhalten, wodurch GHRH normal sezerniert wird. In den konstitutiven nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen ist die nSMase3 auch im Hypothalamus defizient, wodurch potentiell die GHRH Sekretion gestört ist. Es ist zu beachten, dass die nSMase3^{FL/FL}/Mx-Cre^{-/+} Mäuse zum Zeitpunkt der Poly (I:C) Applikation ausgewachsen waren, möglicherweise spielt die nSMase3 eine, je nach Entwicklungsstadium spezifische Rolle.

Zusammengenommen führt die systemische Ablation der nSMase3 zu einem Minderwuchs, der potentiell durch eine verringerte Aktivität der Hypothalamus-Hypophyse-Leber-Achse ausgelöst wird. Da eine Messung der GHRH-Sekretion technisch nicht möglich war, sollten -falls möglich- Mäuse mit einer Neuronenspezifischen Ablation der nSMase3 generiert werden, um diesen Sachverhalt eindeutig in zukünftigen Studien aufzuklären. Weiterhin könnten osmotische Minipumpen in nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse implantiert werden, welche über mehrere Wochen physiologische Konzentrationen von GH abgeben (Laz et al., 2007). Falls solche nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse normales Wachstum aufweisen, wäre die Rolle der nSMase3 in der GH-IGF1 Achse bestätigt.

4.3 Eine nSMase3 Defizienz führt zu gestörter Spermatogenese

Eine weitere Auswirkung der nSMase3 Defizienz war die Sterilität der männlichen nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse. Die Gründe dafür waren eine gestörte Spermatogenese, die mit

einem extremen Mangel an Testosteron korreliert (Abb.3.17). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die hypophysären Gonadotropine wie das luteinisierende Hormon (LH) und das Folikel Stimulierende Hormon (FSH) in den Geschlechtszellen der Männchen und Weibchen physiologische Prozesse wie z.B. die Steroidgenese steuern (O'Shaughnessy et al., 2009; Webb et al., 2004). Die Effekte von GH und IGF1 auf die Gonaden sind oft an die Wirkung von LH und FSH gekoppelt und wirken sogar synergetisch mit diesen Gonadotropinen (Webb et al., 2004). Des Weiteren ist GH neben dem Wachstum eindeutig auch an der Laktation beteiligt, da in Tierversuchen gezeigt wurde, dass Behandlung GH-defizienter Tiere mit GH das Wachstum und die Milchproduktion stimuliert (Etherton, 2004).



Abbildung 4.1: Model für die Rolle der nSMase3 in der Hypothalamus-Hypophyse-Zielorgan-Achse. In Wildtyp-Mäusen wird im Hypothalamus GHRH sezerniert und stimuliert in der Hypophyse GH. GH wiederum stimuliert in der Leber IGF1. Beide Hormone sind für eine normale Testosteron-Produktion in Hoden notwendig. In nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen ist IGF1 reduziert, möglicherweise durch verringerte GHRH und/oder GH Sekretion, da beide Hormone auf mRNA Ebene unverändert produziert werden. Die verringerte Konzentration dieser Wachstumshormone führt zu Minderwuchs. Weiterhin stirbt ein hoher Prozentsatz von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen als Embryo und in den ersten 2 Wochen nach der Geburt, wobei die molekulare Ursache unbekannt ist. Das oben beschriebene GH-*Rescue*-Experiment könnte ebenso darüber Aufschluss geben, ob verringerte GH-Serumkonzentrationen für die mangelhafte Spermatogenese und den Testosteronmangel verantwortlich sind.

4.4 Inaktivierung der nSMase3 verändert die Lipidzusammensetzung von spezifischen Organen

Familie SMasen bilden eine von Enzymen, die die Spaltung der Phosphodiesterbindung in SM katalysieren und so Cer und Phosphocholin generieren. Störungen in diesem Signalweg, wie z.B die Mutagenese der aSMase führen unter anderem zur Niemann-Pick-Krankheit, einer unheilbaren Erkrankung des zentralen Nervensystems, ausgelöst durch die Speicherung von SM in den Lysosomen. Daher sollte aufgrund der starken physiologischen Veränderungen von nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen und der Tatsache, dass die nSMase3 den Abbau von SM initiiert, die Lipidhomöostase der nSMase3^{WT/WT} und der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse untersucht werden. Im Hirn der nSMase3^{WT/WT} und nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse konnten keine Unterschiede im Gehalt der Fettsäureacyl-Subspezies von SM, Cer und Glucosylceramid gemessen werden (Abb.3.8-3.10A). Hierbei wurde die Lipidzusammensetzung des gesamten Gehirns gemessen, es wurden jedoch keine Lipidmessungen im Hypothalamus und Hypophyse vorgenommen, um festzustellen inwieweit sich die Mutagenese der nSMase3 in diesen Bereichen auf die Lipidhomöostase auswirkt. In der Leber hingegen wurden starke Veränderungen in SM, Cer und Gluosylceramid gemessen, wobei unerwartete Veränderungen in der Lipidhomöostase der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse identifiziert wurden. So waren die meisten der Fettsäureacyl-Subspezies von SM (C16, C18, C24 und C24:1), aber auch kurzund lang-kettige Cer- (C16, C18 C24:1) und Glucosylceramid-Subspezies (C16, C18, C20, C24 und C24:1) in der Leber der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse erhöht (Abb.3.8-3.10B). Im weißen Fettgewebe wurde ebenfalls bei dem Großteil der veränderten SM (C16, C18, C20, C22 und C24) und Glucosylceramid-Subspezies (C22, C24 und C24:1) eine höhere Menge in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen gemessen. Allerdings waren Cer-Level C:16 und C24:1 in nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen reduziert (Abb.3.8-3.10C). Da Cer insgesamt und insbesondere die C:16 Cer eine wichtige Rolle in der hepatischen Insulinsensitivität spielen, wurde in Poly (I:C)-induzierten Mx-Cre Mäusen mit hepatischer nSMase3-Defizienz Insulin- und Glukose-Toleranz-Tests durchgeführt. Diese ergaben jedoch keinen Anhaltspunkt für eine veränderte Insulinwirkung zumindest in diesen, auf einer normalen Diät gefütterten Mäuse. Ein wichtiger zukünftiger Ansatz wäre, diese Mäuse auf einer Hoch-Fett-Diät zu testen. Im Hoden wurden keine Unterschiede bei SM und Glucosylceramid zwischen den beiden Tiergruppen gemessen, jedoch waren nahezu alle Fettsäureacyl-Subspezies der Cer (C16, C22, C24, C24:1 und C26) in den nSMase3^{Δ/Δ} Mäusen in ihrem Gehalt niedriger (Abb.3.8-3.10D). Die im Gegensatz zu Cer nicht signifikanten Unterschiede des SM könnten damit erklärt werden, dass SM in den meisten Zelltypen in weitaus höheren Konzentrationen vorzufinden ist als Cer. Daher können kleine Veränderungen im SM Gehalt in größeren Veränderungen der Cer-Level resultieren (Abb.3.8-3.10). Dies konnte auch schon in vorherigen Experimenten gezeigt werden (Hannun and Obeid, 2008). Ebenso könnte die spezifische und nur auf Cer begrenzte Veränderung auf die im Hoden detektierte Spleißvariante der nSMase3 zurückzuführen sein. In weitergehenden Experimenten könnte zukünftig zumindest in vitro untersucht werden, ob die beiden Spleißvarianten in der Tat spezifische Rollen in der Ceramidproduktion im Hoden spielen. Die unerwarteten Veränderungen des Glucosylceramid Gehaltes könnten darauf zurückuführen sein, dass der durch das Fehlen der nSMase3 gestörte SM Umsatz auch die darauf folgende Funktion der Glukosylceramid Synthase stört. Die gestörte Glukosylceramid Synthese könnte einer der Gründe für den pleiotropen Phänotyp der nSMase3 defizienten Mäusen sein, da die Glukosylceramide eine wichtige Rolle in post Golgi trafficking haben (Gouaze-Andersson and Cabot, 2006; Radin et al., 1993). Allerdings war die Erwartung in Hinblick auf die nSMase3 Inaktivierung, dass SM signifikant steigen und niedrigere Cer-Level gemessen werden. Jedoch könnte die für eine Deletion der nSMase3 unerwartete Deregulierung der Lipidhomöostase in Leber, weißem Fettgewebe und Hoden der nSMase3^{Δ/Δ} Mäuse, durch die Redundanz anderer SMasen erklärt werden, da Cer ebenso von der sauren und der neutralen SMase2 aus SM generiert werden kann (Marchesini et al., 2003; Otterbach and Stoffel, 1995). Diese zwei Enzyme werden divers reguliert, sind zudem in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert und könnten für die Generierung von unterschiedlichen Fettsäureacyl-Subspezies von Cer zuständig sein.

Zusammengenommen scheint die nSMase3 eine essentielle Rolle im Lipidhaushalt der Maus zu spielen. Ebenfalls unterstreichen diese Daten die vielfältigen Funktionen

der nSMase3 und der SMasen im Allgemeinen. Jedoch stellt die Komplexität der biophysikalischen und metabolischen Funktionen in den Signalwegen der bioaktiven Lipide die Wissenschaft vor große Herausforderungen. So gibt es mindestens 26 verschiedene Enzyme, die Cer auf- oder abbauen und daher das Potential haben, Cer-Level zu regulieren. Zudem zeigen diese Enzyme spezifische und unterschiedliche subzelluläre Lokalisation. Darüber hinaus zählen zu der Ceramidfamilie 50 verschiedene eng verwandte Fettsäureacyl-Subspezies, die durch ihre Acylketten, Hydroxylierung und Desaturierung unterschieden werden können. Daher kann die Produktion von Cer in verschiedenen Bereichen, von verschiedenen Mechanismen und zu unterschiedlichen Zeiten reguliert werden. Ferner liefern Publikationen diverse und teilweise nicht übereinstimmende Daten über die SMasen, die in diesem komplexen Regelkreis mitwirken, indem sie Cer generieren. Wenn die Funktion der nSMase3 in der Hypophyse bestätigt wird, könnte dies wichtige klinische Implikationen für das Verständnis der Genetik von menschlichen Krankheiten wie z.B. combined pituitary hormone deficiency (CPHD) liefern. Aufgrund dieser Komplexität sollte die Analyse der Funktion der nSMase3 durch Gewebe-spezifische Deletionen vorangetrieben werden, wobei hier insbesondere eine Testis-(Smith, 2011) und Neuronen-spezifische (Mastronardi et al., 2006; Xu et al., 2008) Ablation von großem Interesse sein wird. Dies ist nun durch die in dieser Arbeit generierte konditionale nSMase3 Maus möglich.

5. Literaturverzeichnis

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., and Kronke, M. (1996). FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. Cell *86*, 937-947.

Adam-Klages, S., Schwandner, R., Adam, D., Kreder, D., Bernardo, K., and Kronke, M. (1998). Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. Journal of leukocyte biology *63*, 678-682.

Adam, D., Adam-Klages, S., and Kronke, M. (1995). Identification of p55 tumor necrosis factor receptor-associated proteins that couple to signaling pathways not initiated by the death domain. Journal of inflammation *47*, 61-66.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nature reviews. Immunology *3*, 745-756.

Aggarwal, B.B., Aiyer, R.A., Pennica, D., Gray, P.W., and Goeddel, D.V. (1987). Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. Ciba Foundation symposium *131*, 39-51.

Aggarwal, B.B., Traquina, P.R., and Eessalu, T.E. (1986). Modulation of receptors and cytotoxic response of tumor necrosis factor-alpha by various lectins. The Journal of biological chemistry *261*, 13652-13656.

Barenholz, Y., and Thompson, T.E. (1980). Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. Biochimica et biophysica acta *604*, 129-158.

Barnholz, Y., Roitman, A., and Gatt, S. (1966). Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. The Journal of biological chemistry *241*, 3731-3737.

Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. Journal of lipid research *50 Suppl*, S91-96.

Bernardo, K., Krut, O., Wiegmann, K., Kreder, D., Micheli, M., Schafer, R., Sickman, A., Schmidt, W.E., Schroder, J.M., Meyer, H.E., *et al.* (2000). Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. The Journal of biological chemistry *275*, 7641-7647.

Betz, U.A., Bloch, W., van den Broek, M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K., and Muller, W. (1998). Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. The Journal of experimental medicine *188*, 1955-1965.

Bikman, B.T., and Summers, S.A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. The Journal of clinical investigation *121*, 4222-4230.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. Endocrine reviews *19*, 225-268.

Brady, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B., and Fredrickson, D.S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick diseae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *55*, 366-369.

Chalfant, C.E., and Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. Journal of cell science *118*, 4605-4612.

Chandrashekar, V., and Bartke, A. (1993). Induction of endogenous insulin-like growth factor-I secretion alters the hypothalamic-pituitary-testicular function in growth hormone-deficient adult dwarf mice. Biology of reproduction *48*, 544-551.

Chandrashekar, V., and Bartke, A. (2003). The role of insulin-like growth factor-I in neuroendocrine function and the consequent effects on sexual maturation: inferences from animal models. Reproductive biology *3*, 7-28.

Chandrashekar, V., Bartke, A., Awoniyi, C.A., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L., Russell, L.D., and Kopchick, J.J. (2001). Testicular endocrine function in GH receptor gene disrupted mice. Endocrinology *142*, 3443-3450.

Chandrashekar, V., Bartke, A., Coschigano, K.T., and Kopchick, J.J. (1999). Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. Endocrinology *140*, 1082-1088.

Chandrashekar, V., Bartke, A., and Wagner, T.E. (1991). Interactions of human growth hormone and prolactin on pituitary and Leydig cell function in adult transgenic mice expressing the human growth hormone gene. Biology of reproduction *44*, 135-140.

Chandrashekar, V., Zaczek, D., and Bartke, A. (2004). The consequences of altered somatotropic system on reproduction. Biology of reproduction *71*, 17-27.

Chatelain, P.G., Sanchez, P., and Saez, J.M. (1991). Growth hormone and insulinlike growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. Endocrinology *128*, 1857-1862.

Childs, G.V. (2000). Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. Trends in endocrinology and metabolism: TEM *11*, 168-175.

Chipuk, J.E., McStay, G.P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, C.J., Siskind, L.J., Obeid, L.M., and Green, D.R. (2012). Sphingolipid Metabolism Cooperates with BAK and BAX to Promote the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. Cell *148*, 988-1000.

Christoforidis, A., Maniadaki, I., and Stanhope, R. (2005). Growth hormone / insulinlike growth factor-1 axis during puberty. Pediatric endocrinology reviews : PER *3*, 5-10. Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. The Journal of experimental medicine *180*, 1547-1552.

Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. Biochemistry *45*, 11247-11256.

Clarke, C.J., Truong, T.G., and Hannun, Y.A. (2007). Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. The Journal of biological chemistry *282*, 1384-1396.

Clarke, C.J., Wu, B.X., and Hannun, Y.A. (2011). The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. Advances in enzyme regulation *51*, 51-58.

Coleman, D.C., Arbuthnott, J.P., Pomeroy, H.M., and Birkbeck, T.H. (1986). Cloning and expression in Escherichia coli and Staphylococcus aureus of the beta-lysin determinant from Staphylococcus aureus: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. Microbial pathogenesis *1*, 549-564.

Corcoran, C.A., He, Q., Ponnusamy, S., Ogretmen, B., Huang, Y., and Sheikh, M.S. (2008). Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies. Molecular cancer research : MCR *6*, 795-807.

Cremesti, A.E., Goni, F.M., and Kolesnick, R. (2002). Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? FEBS letters *531*, 47-53.

Daughaday, W.H., and Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocrine reviews *10*, 68-91.

El Alwani, M., Wu, B.X., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2006). Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. Pharmacology & therapeutics *112*, 171-183.

Etherton, T.D. (2004). Somatotropic function: the somatomedin hypothesis revisited. Journal of animal science *82 E-Suppl*, E239-244.

Feoktistova, A., Magnelli, P., Abeijon, C., Perez, P., Lester, R.L., Dickson, R.C., and Gould, K.L. (2001). Coordination between fission yeast glucan formation and growth requires a sphingolipase activity. Genetics *158*, 1397-1411.

Ferlinz, K., Hurwitz, R., and Sandhoff, K. (1991). Molecular basis of acid sphingomyelinase deficiency in a patient with Niemann-Pick disease type A. Biochemical and biophysical research communications *179*, 1187-1191.

Futerman, A.H., Stieger, B., Hubbard, A.L., and Pagano, R.E. (1990). Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. The Journal of biological chemistry *265*, 8650-8657.

Gahete, M.D., Duran-Prado, M., Luque, R.M., Martinez-Fuentes, A.J., Quintero, A., Gutierrez-Pascual, E., Cordoba-Chacon, J., Malagon, M.M., Gracia-Navarro, F., and Castano, J.P. (2009). Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology. Annals of the New York Academy of Sciences *1163*, 137-153.

Gatt, S. (1966). Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. The Journal of biological chemistry *241*, 3724-3730.

Goeddel, D.V., Aggarwal, B.B., Gray, P.W., Leung, D.W., Nedwin, G.E., Palladino, M.A., Patton, J.S., Pennica, D., Shepard, H.M., Sugarman, B.J., *et al.* (1986). Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology *51 Pt 1*, 597-609.

Goni, F.M., and Alonso, A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. FEBS letters *531*, 38-46.

Gouaze-Andersson, V., and Cabot, M.C. (2006). Glycosphingolipids and drug resistance. Biochimica et biophysica acta *1758*, 2096-2103.

Guicciardi, M.E., and Gores, G.J. (2003). AIP1: a new player in TNF signaling. The Journal of clinical investigation *111*, 1813-1815.

Gulbins, E., Bissonnette, R., Mahboubi, A., Martin, S., Nishioka, W., Brunner, T., Baier, G., Baier-Bitterlich, G., Byrd, C., Lang, F., *et al.* (1995). FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. Immunity *2*, 341-351.

Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2003). Raft ceramide in molecular medicine. Oncogene 22, 7070-7077.

Hannun, Y.A., Loomis, C.R., Merrill, A.H., Jr., and Bell, R.M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. The Journal of biological chemistry *261*, 12604-12609.

Hannun, Y.A., and Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. Trends in cell biology *10*, 73-80.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipidmediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. The Journal of biological chemistry *277*, 25847-25850.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nature reviews. Molecular cell biology *9*, 139-150.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. The Biochemical journal *334* (*Pt 2*), 297-314. Hibi, M., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. Journal of molecular medicine *74*, 1-12.

Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: ten years later. International reviews of immunology *16*, 249-284.

Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg2+-dependent neutral sphingomyelinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 5895-5900.

Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D.P., Ferlinz, K., Bisgaier, C.L., Sandhoff, K., Desnick, R.J., Stewart, C.L., and Schuchman, E.H. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. Nature genetics *10*, 288-293.

Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F., and Holthuis, J.C. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. The EMBO journal *23*, 33-44.

Hull, K.L., and Harvey, S. (2000). Growth hormone: roles in male reproduction. Endocrine *13*, 243-250.

Jaisser, F. (2000). Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice. Journal of the American Society of Nephrology : JASN *11 Suppl 16*, S95-S100.

Jenkins, R.W., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. Cellular signalling *21*, 836-846.

Kanfer, J.N., Young, O.M., Shapiro, D., and Brady, R.O. (1966). The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. The Journal of biological chemistry *241*, 1081-1084.

Karakashian, A.A., Giltiay, N.V., Smith, G.M., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2004). Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL-beta-induced JNK activation. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *18*, 968-970.

Keene, D.E., Suescun, M.O., Bostwick, M.G., Chandrashekar, V., Bartke, A., and Kopchick, J.J. (2002). Puberty is delayed in male growth hormone receptor genedisrupted mice. Journal of andrology *23*, 661-668.

Kim, R.H., Takabe, K., Milstien, S., and Spiegel, S. (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. Biochimica et biophysica acta *1791*, 692-696.

Kolesnick, R.N., Goni, F.M., and Alonso, A. (2000). Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. Journal of cellular physiology *184*, 285-300.

Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell *53*, 45-53.

Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B., and Kronke, M. (2006). Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. The Journal of biological chemistry *281*, 13784-13793.

Laz, E.V., Holloway, M.G., Chen, C.S., and Waxman, D.J. (2007). Characterization of three growth hormone-responsive transcription factors preferentially expressed in adult female liver. Endocrinology *148*, 3327-3337.

Levy, M., Castillo, S.S., and Goldkorn, T. (2006). nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. Biochemical and biophysical research communications *344*, 900-905.

Li, X., Becker, K.A., and Zhang, Y. (2010). Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology *26*, 41-48.

Linardic, C.M., and Hannun, Y.A. (1994). Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. The Journal of biological chemistry *269*, 23530-23537.

Lupu, F., Terwilliger, J.D., Lee, K., Segre, G.V., and Efstratiadis, A. (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. Developmental biology *229*, 141-162.

Marchesini, N., Luberto, C., and Hannun, Y.A. (2003). Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. The Journal of biological chemistry *278*, 13775-13783.

Marchesini, N., Osta, W., Bielawski, J., Luberto, C., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2004). Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. The Journal of biological chemistry *279*, 25101-25111.

Mastronardi, C., Smiley, G.G., Raber, J., Kusakabe, T., Kawaguchi, A., Matagne, V., Dietzel, A., Heger, S., Mungenast, A.E., Cabrera, R., *et al.* (2006). Deletion of the Ttf1 gene in differentiated neurons disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *26*, 13167-13179.

Modrak, D.E., Gold, D.V., and Goldenberg, D.M. (2006). Sphingolipid targets in cancer therapy. Molecular cancer therapeutics *5*, 200-208.

Morales, A., Lee, H., Goni, F.M., Kolesnick, R., and Fernandez-Checa, J.C. (2007). Sphingolipids and cell death. Apoptosis : an international journal on programmed cell death *12*, 923-939.

Mullen, T.D., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2012). Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. The Biochemical journal *441*, 789-802.

Nakai, K., and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. Trends in biochemical sciences *24*, 34-36.

Nakai, K., and Horton, P. (2007). Computational prediction of subcellular localization. Methods in molecular biology *390*, 429-466.

Nilsson, A., and Duan, R.D. (1999). Alkaline sphingomyelinases and ceramidases of the gastrointestinal tract. Chemistry and physics of lipids *102*, 97-105.

O'Shaughnessy, P.J., Morris, I.D., Huhtaniemi, I., Baker, P.J., and Abel, M.H. (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. Molecular and cellular endocrinology *306*, 2-8.

Ogretmen, B., and Hannun, Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. Nature reviews. Cancer *4*, 604-616.

Ohlsson, C., Bengtsson, B.A., Isaksson, O.G., Andreassen, T.T., and Slootweg, M.C. (1998). Growth hormone and bone. Endocrine reviews *19*, 55-79.

Otterbach, B., and Stoffel, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). Cell *81*, 1053-1061.

Park, T.S., Panek, R.L., Mueller, S.B., Hanselman, J.C., Rosebury, W.S., Robertson, A.W., Kindt, E.K., Homan, R., Karathanasis, S.K., and Rekhter, M.D. (2004). Inhibition of sphingomyelin synthesis reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation *110*, 3465-3471.

Radin, N.S., Shayman, J.A., and Inokuchi, J. (1993). Metabolic effects of inhibiting glucosylceramide synthesis with PDMP and other substances. Advances in lipid research *26*, 183-213.

Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. Cell *100*, 221-228.

Rodriguez, C.I., Buchholz, F., Galloway, J., Sequerra, R., Kasper, J., Ayala, R., Stewart, A.F., and Dymecki, S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nature genetics *25*, 139-140.

Romiti, E., Vasta, V., Meacci, E., Farnararo, M., Linke, T., Ferlinz, K., Sandhoff, K., and Bruni, P. (2000). Characterization of sphingomyelinase activity released by thrombin-stimulated platelets. Molecular and cellular biochemistry *205*, 75-81.

Rozenova, K.A., Deevska, G.M., Karakashian, A.A., and Nikolova-Karakashian, M.N. (2010). Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-converting enzyme activity and TNFalpha secretion in macrophages. The Journal of biological chemistry *285*, 21103-21113.

Rubin, R., and Baserga, R. (1995). Insulin-like growth factor-I receptor. Its role in cell proliferation, apoptosis, and tumorigenicity. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology *73*, 311-331.

Ruvolo, P.P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society *47*, 383-392.

Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., and Hannun, Y.A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. The Journal of biological chemistry *274*, 38131-38139.

Sawai, H., and Hannun, Y.A. (1999). Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. Chemistry and physics of lipids *102*, 141-147.

Schneider, P.B., and Kennedy, E.P. (1967). Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. Journal of lipid research *8*, 202-209.

Schuchman, E.H. (2007). The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinasedeficient Niemann-Pick disease. Journal of inherited metabolic disease *30*, 654-663.

Schutze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., and Kronke, M. (1992). TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. Cell *71*, 765-776.

Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *22*, 3419-3431.

Smith, L. (2011). Good planning and serendipity: exploiting the Cre/Lox system in the testis. Reproduction *141*, 151-161.

Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends in biochemical sciences *24*, 181-185.

Stoffel, W., Jenke, B., Block, B., Zumbansen, M., and Koebke, J. (2005). Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 4554-4559.

Stoffel, W., Jenke, B., Holz, B., Binczek, E., Gunter, R.H., Knifka, J., Koebke, J., and Niehoff, A. (2007). Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by Col2A1-driven smpd3 transgene expression. The American journal of pathology *171*, 153-161.

Tang, P., Hung, M.C., and Klostergaard, J. (1996). Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. Biochemistry *35*, 8216-8225.

Tani, M., and Hannun, Y.A. (2007a). Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2. FEBS letters *581*, 1323-1328.

Tani, M., and Hannun, Y.A. (2007b). Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization. The Journal of biological chemistry *282*, 10047-10056.

Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., and Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. Endocrine reviews *15*, 80-101.

Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., and Stoffel, W. (1998). Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 3638-3643.

Tomiuk, S., Zumbansen, M., and Stoffel, W. (2000). Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. The Journal of biological chemistry *275*, 5710-5717.

Urbanek, M., Russell, J.E., Cooke, N.E., and Liebhaber, S.A. (1993). Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. The Journal of biological chemistry *268*, 19025-19032.

Wang, G.M., O'Shaughnessy, P.J., Chubb, C., Robaire, B., and Hardy, M.P. (2003). Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse leydig cells. Endocrinology *144*, 5058-5064.

Wang, J., Megha, and London, E. (2004). Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): implications for lipid raft structure and function. Biochemistry *43*, 1010-1018.

Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., and Armstrong, D.G. (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. Journal of animal science *82 E-Suppl*, E63-74.

Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., and Kronke, M. (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. Cell *78*, 1005-1015.

Wilson, M.E. (2001). The impact of the GH-IGF-I axis on gonadotropin secretion: inferences from animal models. Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM *14*, 115-140.

Wu, B.X., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010a). Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. Neuromolecular medicine *12*, 320-330.

Wu, B.X., Rajagopalan, V., Roddy, P.L., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010b). Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. The Journal of biological chemistry *285*, 17993-18002.

Xu, Q., Tam, M., and Anderson, S.A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. The Journal of comparative neurology *506*, 16-29.

Yabu, T., Shimuzu, A., and Yamashita, M. (2009). A novel mitochondrial sphingomyelinase in zebrafish cells. The Journal of biological chemistry *284*, 20349-20363.

Zumbansen, M., and Stoffel, W. (2002). Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. Molecular and cellular biology *22*, 3633-3638.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Martin Krönke für die Möglichkeit, an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können und die Betreuung meiner Arbeit herzlich bedanken. Ich möchte mich auch bei Prof. Dr. Jens C. Brüning für die Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät herzlich bedanken.

Prof. Dr. Peter Kloppenburg danke ich sehr für die Leitung meiner Disputation als Vorsitzender.

Allen Mitgliedern unseres Hauses danke ich für die jederzeit gewährte Hilfe und die überaus interessante, lehrreiche und lustige Zeit.

Besonders danke ich Ben Y. für die Hilfe und Anleitung zu Beginn meiner Dr. Arbeit. Dr. Hamid K. danke ich für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft während meiner gesamten Promotionszeit. Oli C. danke ich vielmals für die hardcore guten Diskussionen zu allen Themengebieten. Katja K. danke ich vielmals für die interessanten Gespräche, Unterstützung bei experimentellen Arbeiten, und so "Kleinigkeiten" wie die Parkkarte! Anne B. danke für die gaaanze Arbeit die Du mir abgenommen und 1A über die Bühne gebracht hast und natürlich für die Lacher zwischendurch. Maria A., Stefan S. Pia B. und Kerstin B. danke fürs Korrekturlesen, die Hilfe bei Experimenten und die wizischen Sachen zwischendurch. Jens S. danke sehr für die Computerklamotten! Dr. Sussanne B. und Lina R. Eure Analysen waren voll "fett, fett, fett....". Danke! Auch Dr. Oleg K., Dr. Olaf U., Ulrike K., Susanne B. und Irina K. möchte ich mich für die Hilfe bei den Sachen die während einer Promotion "so anfallen" herzlich bedanken.

Prof. Anja Sterner Kock und den Mitarbeitern der Experimentellen Medizin möchte ich herzlich Danken für die große Hilfe bei der Analyse meiner SMase Maus.

Ganz großer Dank gilt Dr. Frank W. für die Hilfe bei der Generierug der smase Maus und vielen weiteren Hilfestellungen die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Dr. Bengt B. was soll ich sagen, Danke, Danke, Danke mein Freund bist einfach der Beste!

Dr. Peter S. auch bekannt als "Dr Alban" vielen Dank für die überaus kompetenten Diskussionen und Ratschläge während meiner Schreibphase und die sehr anregenden Gespräche seit unserer Diplomzeit. "Don't smoke in the lab"

Dr. Jan M. Dir verdanke ich meine Selbsterkenntnis, Danke!

Sven M., Dr Dennis Gratz, Dr. Denis, Lars, Dr. Bruno, Dr. Mo, Dr. Oli, Dr. Casi, Dr Ivan, Dr. Roman, Martin, Timbo man Leute DANKE für unsere roadtrips, MEGA Spaß, Fußball und alles was war und noch kommen wird!!! Durch Euch brennt immer ein Lichtlein am Horizont !!!!

A wam przyjaciele tzn. Cipa, Sroki, Marek P., Radek, Piotrek, Turu, Adi i Igor dziekuje za to ze zawsze mi przypominacie z kad jestem i ze my polacy i "chopcy" z Olesna zawsze wszystko, wszedzie "zalatwimy" co jest powodem tego, ze sie niczego nie boje!

Moniko Tobie dziekuje ze jestes taka jaka jestes, przez to wiem ze my sobie poradzimy idac uparcie nasza droga.

Liljana i Roman vielen Dank für Eure Unterstützung und alles andere.

Meinen Eltern danke ich aus ganzem Herzen für Ihren Mut und Ihre extrem harte Arbeit, womit sie mir die Möglichkeit gegeben haben in einem neuen Land das Beste aus meinem Leben zu machen. Ihr habt mich gelehrt NIE aufzugeben!

Kamilciu wiesz ze bez Ciebie to wszystko by nie bylo mozliwe bo tylko Tobie udalo sie wygonic ze mnie moje demony i mnie "oswoic". Jestem najszczesliwszym facetem pod sloncem ze powiedzialas TAK i ze moge spedzic zycie z najcudowniejsza kobieta tego wszechswiata. Uwielbiam nasze wycieczki, rozmowy, imprezki no i teraz nasz domek tzn. wszystko to co juz bylo i co jeszcze na nas czeka. Ciesze sie na nasze wspolne sloneczne i szczesliwe ale tez ponure i ciezkie dni, bo wiem ze obojetnie co sie stanie, to wszystko juz nie jest takie straszne jak Ty sie przytulisz. Jestes kobieta mego zycia!

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 – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahren nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Krönke und Prof. Dr. Jens C. Brüning betreut worden.

Köln, 02. April 2012

Thomas Franz Kwasny

Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am	24. November 1978 in Olesno (Polen)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Arbeitsverhältnisse

November 2007- April 2012	Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene
	Direktor: Prof. Dr. Martin Krönke
	Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Martin Krönke
Oktober 2006-	Diplomarbeit am Institut für Genetik, Universität zu Köln
Juli 2007	Prof. Dr. Jens C. Brüning
	Titel: Konditionale Mutagenese des Hairy enhancer of split-1 Gens in Adipozyten der Maus

Ausbildung

Oktober 2001-	Studium der Biologie an der Universität zu Köln,
Juli 2007	Abschluss: Diplom

Zivildienst

September 1999- Caritas-Jugendhilfe in Köln

September 2000

Schulische Ausbildung

1995-1999	Königin-Luise-Gymnasium in Köln
1993-1995	Bertha von Suttner Realschule in Köln
1992-1993	Realschule in Sögel
1990-1992	Willy-Brandt-Gesamtschule in Köln
1985-1989	Wladyslaw-Broniewski-Grundschule (Polen)