

Biochemische und molekularbiologische Studien
zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase
in vitro und *in vivo*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Markus Zumbansen

aus Rheda-Wiedenbrück

2001

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel
Prof. Dr. R. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

17. Mai 2001

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

Herrn Professor Dr. R. Krämer danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Coreferat zu übernehmen.

Ich möchte mich außerdem bedanken bei:

allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Herrn Dipl.Biol. Stefan Meinzinger, Herrn Dipl.Chem. Lennart von Hoch, Herrn Dr. Dieter Newrzella, Herrn Dr. Carsten Poggel, Herrn Dr. Andreas Bosio, Frau Erika Binczek, Frau Britta Jenke, Frau Barbara Blöck, Herrn Berthold Gaßen, Frau Rosi Blau-Wasser, Frau Maria Stumpf und Herrn Rolf Müller für das wunderbare Arbeitsklima und die immer vorhandene Diskussions- und Hilfsbereitschaft,

Herrn Dr. Stefan Tomiuk und Herrn Dr. Kay Hofmann für die gute Zusammenarbeit und die fruchtbaren Diskussionen,

Frau Meyers aus dem Institut für Neuropathologie der Universität zu Köln für die Hilfe bei der Anfertigung der Paraffinschnitte,

Frau Schindler aus dem Institut für Klinische Chemie der Universität zu Köln für die Blutanalysen,

Herrn Dr. Marcus Stoffel von der Rockefeller University, New York für die Chromosomenlokalisation,

allen außerhalb des Instituts, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Nix, Herrn Dr. Jens-Olaf Spörkel, Herrn Dr. Jens Stracke und Herrn Dr. Thomas Uschkureit für die intensiven Diskussionen und die immer freundschaftliche Zusammenarbeit.

Für Petra und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Sphingolipide.....	1
1.2 Stoffwechsel der Sphingolipide.....	2
1.3 Sphingomyelin.....	4
1.4 Sphingomyelinasen	4
1.4.1 Saure Sphingomyelinase (aSMase).....	4
1.4.2 Zn ²⁺ -abhängige saure Sphingomyelinase	6
1.4.3 Alkalische Sphingomyelinase	6
1.4.4 Neutrale Sphingomyelinasen	6
1.5 Die erste klonierte neutrale Sphingomyelinase aus Säugern.....	7
1.6 Weitere klonierte Sphingomyelinasen.....	10
1.6.1 Homologe der nSMase.....	10
1.6.2 Die nSMase2.....	10
1.6.3 Die humane neutrale Sphingomyelinase aus Urin	11
1.7 Transgene Mausmodelle.....	12
2. Aufgabenstellung	14
3. Ergebnisse.....	15
3.1 Die Rolle der nSMase in der Signaltransduktion von TNF-α.....	15
3.1.1 Stimulation nSMase-exprimierender Zellen mit TNF- α	16
3.1.2 Aktivitätsmessungen mitogen- und stress-aktivierter Proteinkinasen	17
3.1.3 TNF- α induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	18
3.1.4 Die nSMase und Apoptose.....	19
3.2 Biochemische Charakterisierung des murinen nSMase Proteins.....	21
3.2.1 Aktivatoren der gereinigten, rekombinanten mnSMase	22
3.2.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der nSMase	24
3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der murinen nSMase.....	28
3.4 Klonierung und Charakterisierung des murinen nSMase Gens.....	34
3.5 Klonierung des humanen nSMase Gens und Bestimmung der Chromosomenlokalisierung	38
3.6 Generierung einer nSMase defizienten Mauslinie	39
3.6.1 Klonierungsstrategie für replacement Vektoren zur Inaktivierung des nSMase Gens	39
3.6.2 Klonierung der targeting Vektoren	40
3.6.3 Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell Klone.....	43
3.6.4 Blastozysteninjektion und Rückkreuzungsexperimente.....	45
3.7 Analyse des nSMase defizienten Phänotyps	47
3.7.1 RNA-Analyse.....	47
3.7.2 Proteinanalyse	51
3.7.3 Histologische Untersuchungen.....	54
3.7.4 Lipidanalyse.....	56
3.7.5 Radioaktive Markierungsexperimente an nsmase ^(-/-) Fibroblasten	57
3.7.6 DNA-Chip Expressionsanalyse.....	62
3.8 Kryokonservierung von Embryonen.....	65

4. Zusammenfassung	66
5. Diskussion und Ausblick	68
5.1 Charakterisierung der murinen nSMase in vitro	68
5.2 Generierung der nSMase-defizienten Mauslinie.....	72
5.3 Der nSMase-defiziente Phänotyp	73
5.4 Mögliche Funktionen der nSMase.....	76
6. Material und Methoden	78
6.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	78
6.2 Affymetrix DNA Chip Analyse	82
6.3 Biochemische Methoden.....	83
6.4 Zellkultur Methoden.....	88
6.5 Immunologische Methoden	91
6.6 Methoden zur in-vivo-Mutagenese	93
7. Anhang.....	95
7.1 Sequenz des murinen nSMase Gens	95
7.2 Sequenz des humanen nSMase-Gens	96
7.3 Verwendete Oligonukleotide.....	98
7.4 DNA Array	99
7.5 Abkürzungen.....	104
8. Literatur	106
Kurzzusammenfassung	116
Abstract	117

1. Einleitung

1.1 Sphingolipide

Sphingolipide gehören neben den Glycerophospholipiden zu Strukturkomponenten biologischer Membranen, die für alle Zelltypen von Bedeutung sind.

Sie sind charakterisiert durch die C₁₈-Aminoalkohole Sphingosin, Dihydrosphingosin und deren C₁₆-, C₁₇-, C₁₉-, und C₂₀-Homologe, die über eine Amidbindung mit gesättigten oder einfach ungesättigten C₁₆- bis C₂₄-Fettsäuren zu Ceramid (N-Acyl-Sphingosin) verknüpft sind.

Ausgehend von dieser Grundstruktur leiten sich durch Kondensation einer hydrophilen Kopfgruppe an die 1-Hydroxyl-Position die Ganglioside (saure, sialinsäurehaltige Ceramid Oligosaccharide), Globoside (neutrale Ceramid Oligosaccharide), Cerebroside und Sulfatide, sowie die häufigsten Sphingolipide, die Sphingomyeline ab [1, 2] (Abb. 1).

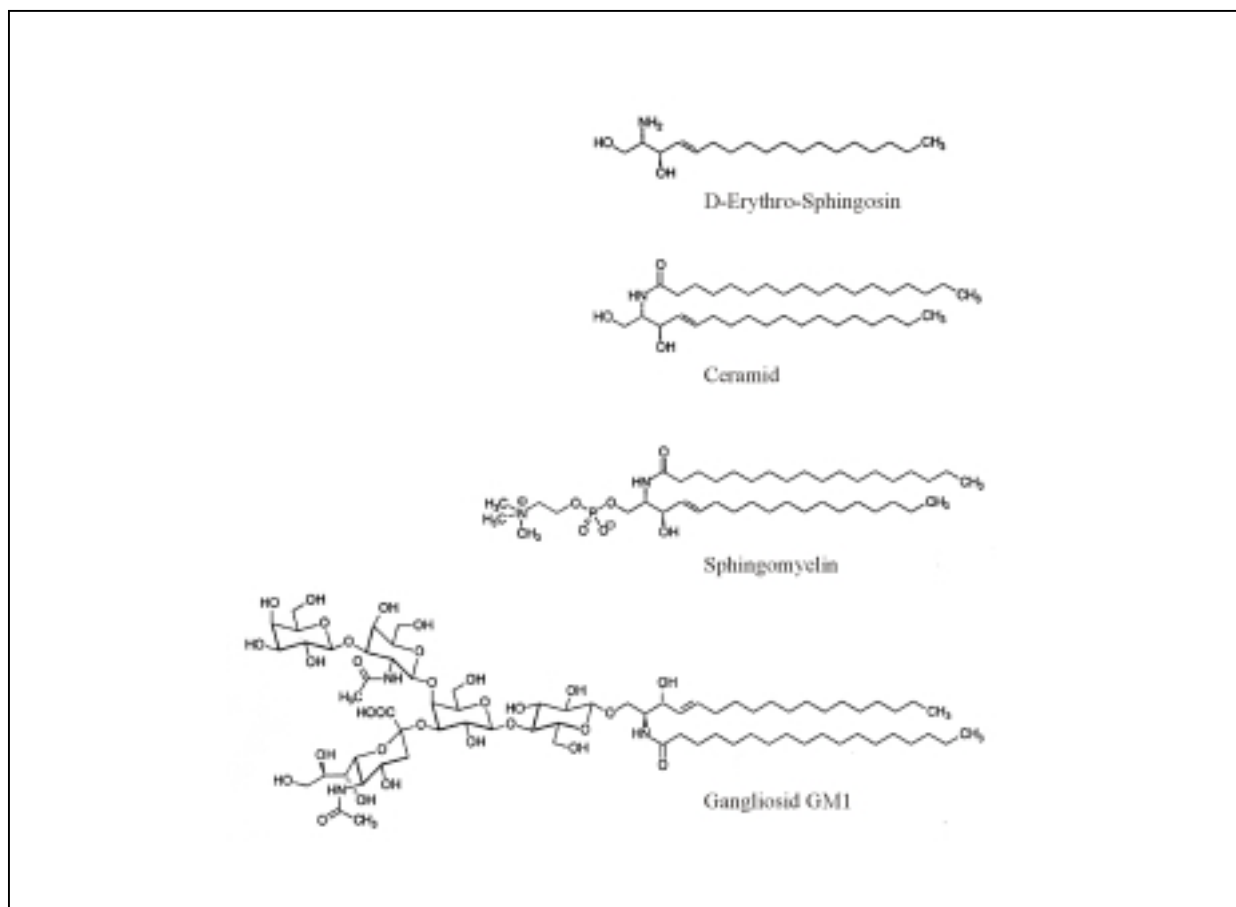


Abb. 1 Chemische Struktur der Sphingolipide Sphingosin, Ceramid, Sphingomyelin und GM1. Verändert nach [2].

In Säugern sind über 300 verschiedene Sphingolipide bekannt [3]. Neben ihrer Funktion beim Aufbau und der Regulation der Fluidität zellulärer Membranen [4, 5] sind sie an zellulären Erkennungsprozessen beteiligt [6, 7], dienen als entwicklungspezifische Marker [8-10] und als Tumor- sowie als Blutgruppenantigene [11-13].

Den Sphingomyelin-Metaboliten wird, neben anderen bioaktiven Lipiden wie Diacylglycerol (DAG), Inositol 1,4,5-Trisphosphat, oder *platelet activating faktor* (PAF, 1-O-Alkyl-2-Acetyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin) in den letzten Jahren vermehrt eine Funktion in intrazellulären Signalprozessen zugeschrieben [14-17]. Dabei werden Signalketten aktiviert, die zu mitogenen Stimuli und Proliferation, aber auch zum programmierten Zelltod führen können. Am häufigsten wird in diesem Zusammenhang Ceramid [18, 19], Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat (SPP) diskutiert [20, 21]. Für letzteres ist mittlerweile eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (EDG-Rezeptoren) kloniert worden [22], über die SPP auch extrazellulär Signale vermitteln kann [23].

1.2 Stoffwechsel der Sphingolipide

Die Biosynthese der Sphingolipide findet im ER und im Golgi-Apparat statt [24]. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Kondensation von L-Serin mit Palmitoyl-CoA zu 3-Ketosphinganin durch die Pyridoxalphosphat-abhängige Serin-Palmitoyl-Transferase [25, 26]. Im nächsten Schritt wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase 3-Ketosphinganin zu D-erythro-Sphinganin (2S,3R-Dihydrosphingosin) reduziert [27]. Nach Acylierung durch die Sphinganin-N-Acyltransferase entsteht Dihydroceramid [28, 29], das in einer FAD abhängigen Reaktion von der Dihydroceramid-Desaturase durch Einführung einer 4,5-trans-Doppelbindung in Ceramid umgewandelt wird [30, 31]. Die Enzyme der Ceramidbiosynthese sind alle auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert [32], während die Biosynthese der auf Ceramid basierenden Cerebroside und Ganglioside im Lumen oder der cytosolischen Seite des Golgi-Komplexes durch Addition von UDP-aktivierten Monosacchariden zu Cerebroside und Gangliosiden stattfindet [33-38].

Sphingomyelin (SPM) findet sich in den Membranen aller Organellen mit steigender Konzentration von der ER- zur Plasmamembran, die 70-90% des zellulären Sphingomyelins enthält [39-42].

Die Synthese des Sphingomyelins durch die Sphingomyelin-Synthase erfolgt durch direkte Übertragung der Phosphocholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf die Hydroxylgruppe

des Ceramids, wobei als Nebenprodukt 1,2-Diacylglycerol entsteht [43, 44]. Ein direkter Transfer durch CDP-Cholin ist ebenfalls möglich [45]. Über die Lokalisation der Sphingomyelin Synthase-Aktivität gibt es unterschiedliche Befunde. Sie wurde hauptsächlich im Lumen der cis und medialen Zisternen des Golgi Apparates gefunden [46]. Andere Untersuchungen geben aber Hinweise darauf, daß ein Teil dieser Aktivität auch in mikrosomalen Fraktionen [47], der Plasmamembran [48, 49], im endozytotischen *recycling pathway* [50], oder im *trans Golgi network* (TGN) lokalisiert ist [51]. Neuere Untersuchungen deuten auf eine zelltypspezifische Lokalisation der Sphingomyelin Synthase hin [52].

Wie Ceramid für die Biosynthese von Sphingomyelin und Glycosphingolipiden vom ER in den Golgi Apparat transportiert wird, ist noch nicht genau geklärt [53, 54]. Neuere Hinweise deuten auf zwei unterschiedliche Transportsysteme hin. Ein ATP-abhängiger Transport soll Ceramid für die Sphingomyelin Synthase in das Lumen des Golgi-Apparates translozieren [55, 56]. Ein ATP-unabhängiger, nicht-vesikulärer Weg soll Ceramid für die Glycosphingolipid Synthase bereitstellen [57].

Der konstitutive Abbau der Sphingolipide erfolgt in den sauren Kompartimenten der Zellen, d.h. den späten Endosomen, bzw. den Lysosomen. Exohydrolasen entfernen sequentiell die Zuckerreste von den Glycosphingolipiden, so daß Ceramid entsteht [38]. Sphingomyelin wird durch die saure Sphingomyelinase zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert [58, 59]. Das gebildete Ceramid wird durch saure Ceramidasen in Sphingosin und freie Fettsäuren gespalten [59-61]. Sphingosin, Zucker und Fettsäuren können das Lysosom verlassen, um wieder in den biosynthetischen Weg einzutreten.

Sphingosin wird im Cytosol von der Sphingosin-Kinase an der 1-Hydroxylgruppe phosphoryliert [62-65] und dann von der Sphingosin-1-Phosphat-Lyase zu einem langkettigen Aldehyd und Ethanolaminphosphat abgebaut [66]. Alternativ kann Sphingosin-1-Phosphat auch von einer Sphingosin-1-Phosphat-Phosphohydrolase wieder in Sphingosin umgewandelt werden [67].

Genetische Defekte der am konstitutiven Sphingolipidkatabolismus beteiligten Enzyme führen zu Sphingolipidosen, lysosomalen Speicherkrankheiten mit meistens schwerwiegenden Symptomen [68, 69].

Sphingomyelin kann auch nicht-lysosomal abgebaut werden [70, 71]. Auch hier wird die Phosphorylcholingruppe durch Sphingomyelinasen abgespalten und das Ceramid durch verschiedene Ceramidasen deacyliert [72-74]. Diese nicht-lysosomalen Abbauwege wurden lange nicht beachtet und die Funktionen der beteiligten Enzyme sind noch weitgehend

ungeklärt. Erst nach den Beobachtungen, daß Sphingomyelin-Metabolite Signalfunktionen haben können, wurden sie in neuerer Zeit Gegenstand intensiver Untersuchungen [75, 76].

1.3 Sphingomyelin

Der Stoffwechsel des Sphingomyelin unterliegt zusammen mit dem Cholesterinstoffwechsel einer koordinierten Regulation. Diese Regulation umfaßt diverse zelluläre Funktionen, wie die Aufrechterhaltung von Membranstrukturen, Protein- und Lipidtransport, sowie die Cholesterinhomöostase [5, 53, 77, 78]. So führt z.B. die Depletion von Sphingomyelin in der Plasmamembran zu einer schnellen Cholesterinveresterung, sowie zur Reduktion der Cholesterinbiosynthese [79-82].

Sphingomyelin und Cholesterin nehmen auch eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung von *rafts* ein. Diese an Lipiden und spezifischen Proteinen angereicherte Membranmikrodomänen, sog. *detergent insoluble glycosphingolipid enriched domains* (DIGS), segregieren und konzentrieren Membranproteine und sortieren und verteilen Lipide an die Plasmamembran, wo sie an Signalprozessen und an der Ausbildung der Zellpolarität von Bedeutung sind [83-85]. Die Dysregulation des Sphingolipidstoffwechsels stört die Ausbildung und Funktion von *rafts* [86, 87].

1.4 Sphingomyelinasen

Sphingomyelinasen (SMasen, Sphingomyelin-Phosphodiesterasen, E.C. 3.1.4.12) spalten die Phosphodiesterbindung des Sphingomyelins, wobei Ceramid und Phosphorylcholin entstehen (Abb. 2). In Säugetieren sind verschiedene Sphingomyelinasen charakterisiert worden, die sich durch ihre Gewebeverteilung, ihre subzelluläre Lokalisation, ihre enzymatischen Eigenschaften und ihre Regulation unterscheiden.

1.4.1 Saure Sphingomyelinase

Die saure Sphingomyelinase (aSMase) (*unigene* Bezeichnung SMPD1, Sphingomyelin-Phosphodiesterase 1) ist eine hitzestabile, ubiquitär exprimierte Hydrolase, die ein pH Optimum im sauren Bereich hat. Ihre Aktivität wurde 1966 erstmals beschrieben und ein Aktivitätsverlust als Ursache der Niemann-Pick Erkrankung erkannt [58, 59, 88, 89].

Nach Reinigung des humanen Enzyms aus Urin [90] konnten die humanen und murinen cDNA's kloniert [91, 92] und das Enzym molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert werden [93-95].

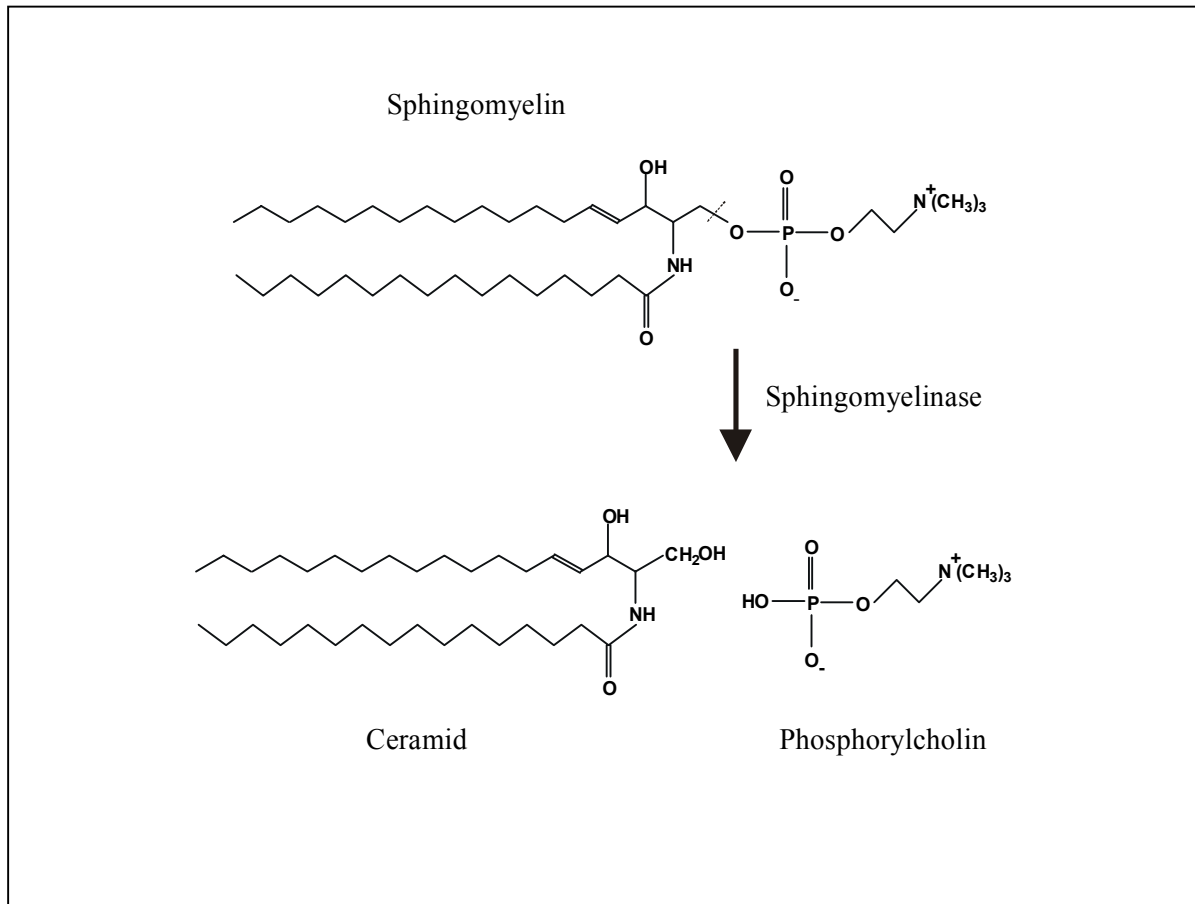


Abb. 2 Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin.

Die aSMase hat eine Molmasse von 72 kDa, die sich nach Deglykosylierung auf ungefähr 60 kDa reduziert. Das Enzym ist hitzestabil, es wird durch DTT, AMP, Inositol 4', 5'-Bisphosphat und 9- β -D-Arabinofuranosyladenin-5'-phosphat inhibiert und von freien Fettsäuren, Mono-, Di- und Triacylglyceriden aktiviert. Divalente Kationen oder Chelatbildner wie EDTA oder EGTA üben keinen Einfluß auf die Enzymaktivität aus.

Als Modell für die humane Niemann-Pick Erkrankung des Typs A wurden nullallelische Mauslinien generiert [96, 97]. Diese Mäuse zeigen alle Symptome der menschlichen Erkrankung, die sich durch Speicherung des Lipids in den Lysosomen vor allem des retikuloendothelialen Systems von Leber, Milz, Knochenmark und Lunge, sowie im Gehirn auszeichnet [96]. ASMase defiziente Mäuse haben einen veränderten Sphingolipidgehalt in allen subzellulären Membranen und bilden keine *rafts* aus [86].

1.4.2 Zn²⁺-abhängige saure Sphingomyelinase

Eine Zn²⁺-stimulierbare saure Sphingomyelinase Aktivität wurde zuerst in fötalem Kälberserum beschrieben [98]. Sie stellt ein von verschiedenen Zelltypen sezerniertes, posttranslational modifiziertes Produkt des aSMase Gens dar [99, 100].

Die sezernierte Sphingomyelinase wurde in artherosklerotischen Läsionen gefunden. Ihre Funktion könnte in der Generierung von LDL Aggregaten durch Hydrolyse von extrazellulärem, LDL-assoziiertem Sphingomyelin bestehen [101].

1.4.3 Alkalische Sphingomyelinase

Eine Sphingomyelinase Aktivität mit alkalischem pH-Optimum wurde aus Galle isoliert [102]. Das Enzym ist durch Gallensalze stimulierbar und wurde nach verschiedenen Reinigungsschritten als 92 kDa bzw. 85 kDa Protein beschrieben [103, 104]. Änderungen der alkalischen Sphingomyelinase Aktivität scheinen mit Tumorgenese in Verbindung zu stehen [105, 106].

1.4.4 Neutrale Sphingomyelinasen

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde gezeigt, daß es mindestens zwei verschiedene Formen von neutraler Sphingomyelinase (nSMase) geben muß. Eine Mg²⁺-abhängige, membranassoziierte und eine Mg²⁺-unabhängige, cytosolische nSMase.

Eine Mg²⁺-unabhängige Sphingomyelinase Aktivität mit einem pH-Optimum von 7 wurde in Ratten Myelin gefunden [107]. Über diese Aktivität, wie auch über eine durch 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ stimulierbare, cytosolisch lokalisierte Mg²⁺-unabhängige nSMase aus HL60-Zellen [108], sind noch keine Primärstrukturdaten vorhanden.

Eine neutrale, Mg²⁺-abhängige, membranassoziierte SMase-Aktivität wurde zuerst im Gehirn beschrieben, wo auch die höchste spezifische Aktivität zu messen ist [70, 71]. Mittlerweile wurde diese enzymatische Aktivität auch in anderen Geweben und Zelltypen beschrieben [109]. In subzellulären Fraktionierungen wurde die nSMase Aktivität hauptsächlich an der Plasmamembran und in geringem Anteil in den Mikrosomen gefunden [110-112]. Eine nSMase ist auch in den Zellkernen von Hepatomzellen nachgewiesen worden [113].

Die erste Anreicherung des Proteins bis zur scheinbaren Bandenreinheit gelang 1989 aus Urin. Monoklonale Antikörper gegen das 92 kDa große Protein waren in der Lage, ca. 70 % der Aktivität zu präzipitieren [114].

1998 gelang eine Anreicherung von zwei Isoformen, einer Mg²⁺-unabhängigen nSMase mit einer Molmasse von 53 kDa und einer 92 kDa großen Mg²⁺-abhängigen Isoform, aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens [115].

Ebenfalls 1998 wurde die über 3000-fache Anreicherung einer membrangebundenen, Mg^{2+} -abhängigen nSMase aus Rattenhirn beschrieben. Das 60 kDa Protein ist DTT abhängig, seine Aktivität wird von Phosphatidylserin und im geringeren Maße von Arachidonsäure stimuliert, während Glutathion das Enzym inhibiert [116].

Im vergangenen Jahr wurde eine nSMase aus Rinderhirn über 23000-fach gereinigt. Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ergab zwei Proteine von 46 kDa und 97 kDa Masse. Massenspektrometrische Analysen zeigten zumindest partielle Übereinstimmungen beider Proteinspezies. Sequenzierung tryptischer Fragmente ergab keinerlei Homologie zu Proteinen in den Datenbanken [117]. Das Enzym ist Mg^{2+} -abhängig, andere zweiwertige Kationen haben keinen Einfluß auf die Aktivität. Es wird von Glutathion und Scyphostatin inhibiert und eine Aktivierung durch Phospholipide erfolgt nur in geringem Maße. Arachidonsäure aktiviert das Enzym nicht.

1.5 Die erste klonierte neutrale Sphingomyelinase aus Säugern

Da proteinchemische Reinigungsversuche bisher nicht zur Klonierung des Enzyms führten, wurde alternativ mit bioinformatischen Methoden versucht, potentielle neutrale Sphingomyelinasen in den Datenbanken zu finden [118]. Dafür wurden Suchprogramme verwendet, die mögliche Kandidaten aufgrund entfernter struktureller Verwandtschaft zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen finden. Auf der Basis eines multiplen Sequenzvergleiches wird dabei ein für eine Proteinfamilie spezifisches Profil erstellt, in dem jeder Aminosäure nach Konservierungsgrad eine bestimmte Gewichtung zugeordnet wird [119].

Durch eine solche Motiv-dirigierte Profilsuche wurde in den *expressed sequenced tag* (EST) Datenbanken aufgrund ihrer Homologie zu bakteriellen Hämolysinen mit Mg^{2+} -abhängiger und neutraler Sphingomyelinaseaktivität eine Hefesequenz (ORF Yer019w) gefunden. Nach Einbindung dieser Proteinsequenz in die Profilsuche konnten mehrere Säugersequenzen mit hoher Homologie zur Hefesequenz identifiziert werden. Die murine und humane cDNA wurden dann aus verschiedenen EST-Klonen zusammengesetzt und sequenziert. Die 1633 bp des offenen Leserasters der Maus cDNA kodieren für ein Protein aus 419 Aminosäuren (errechnete Masse 47.5 kDa), die humane cDNA (1654 bp) für ein 423 Aminosäuren langes Protein. Die Säugersequenzen sind auf Proteinebene zu 78 % homolog. Hydrophobizitätsplots deuten auf zwei, durch acht Aminosäuren getrennte, Transmembrandomänen am C-Terminus

hin. Ein *targeting signal* für die Translokation des Proteins in ein Organell ist nicht vorhanden.

Durch Integration dieser Sequenzen in die Profilsuche konnten dieser neuen Familie von Mg^{2+} -abhängigen Phosphodiesterasen mit der DNaseI aus Rinderpankreas und der ExonukleaseIII aus *E.coli* weitere Mitglieder zugeordnet werden. Röntgenstrukturdaten dieser Proteine lagen bereits vor und die entfernte Verwandtschaft zwischen bakteriellen Sphingomyelinasen und der Säuger DNaseI war bekannt [120-124]. Durch Sequenzvergleich mit den oben erwähnten Proteinen konnten die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren identifiziert und der Katalysemechanismus vorausgesagt werden (Abb. 3).

Funktionelle Expression der Säugerkandidaten in HEK293 Zellen führte zu einer Steigerung der spezifischen neutralen Sphingomyelinase Aktivität. In weiterführenden Charakterisierungen des Enzyms konnten die kinetischen Parameter, Effektoren und Inhibitoren der Aktivität, sowie die Gewebeverteilung aufgeklärt werden [118].

Die nSMase (*unigene* Bezeichnung SMPD2, Sphingomyelin-Phosphodiesterase 2) wird in der Maus ubiquitär exprimiert, wobei die größten mRNA und Proteinmengen in der Niere zu finden sind. Die enzymatische Aktivität aus HEK 293 Zellen liegt membrangebunden vor. Im *in vitro Assay* hat das Enzym ein pH Optimum zwischen 6.5 und 7.5 und zeigt eine strikte Abhängigkeit von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen. Andere divalente Kationen haben keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität, EDTA wirkt reversibel inhibitorisch. Das Enzym ist hitzelabil und inaktiv bei Triton X-100 Konzentrationen unterhalb der kritischen Mizellenkonzentration (0.03 %). TritonX-100 Konzentrationen über 0.2 % im Assay inhibieren das Enzym. Reduzierende Agenzien wie DTT oder 2-Mercaptoethanol sind für die Erhaltung der Aktivität des Enzyms während der Extraktion notwendig. Arachidonsäure aktiviert das Enzym.

Im Gegensatz zu der aus Rattenhirn gereinigten neutralen Sphingomyelinase [116] wird die nSMase von Phosphatidylserin nur geringfügig (<1.5-fach) aktiviert. Auch Glutathion, als effektiver Inhibitor von Mg^{2+} -abhängigen Sphingomyelinasen beschrieben [125], hat keinen Einfluß auf die Aktivität.

Gerichtete Punktmutationen der in der Phosphodiesterase-Familie konservierten, für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste (Abb. 3) führte zu inaktiven Formen des Enzyms. Deletion einer oder beider Transmembrandomänen führte zu stark verminderter Synthese eines inaktiven Proteins [118].

1.6 Weitere klonierte Sphingomyelinasen

1.6.1 Homologe der nSMase

Nach der Maus- und der humanen nSMase wurden auch das Ratten- und das Hefehomolog (Yer019w) kloniert.

Die enzymatischen Eigenschaften des Rattenenzym stimmen weitgehend mit denen des murinen Enzyms überein [126]. Das Hefehomolog katalysiert dagegen die Spaltung von Inositolphosphorylceramid, das in Hefe anstatt Sphingomyelin synthetisierte Inositolphosphosphingolipid (Die Bezeichnung daher: ISC1 für Inositolphospho-Sphingolipid-Phospholipase-C). Die neutrale Sphingomyelinase Aktivität, sowie die Phospholipase-C Aktivitäten gegen alle Inositolphosphosphingolipide ist in Deletionsmutanten der ISC1 nicht mehr nachweisbar, so daß ISC1 das einzige am Abbau der Inositolphosphosphingolipide beteiligte Enzym in *s.cerevisiae* ist. Die enzymatischen Eigenschaften der Homologen wie pH Optimum, Detergenz- und Mg^{2+} -Abhängigkeit stimmen überein, zusätzlich wird aber ISC1 im Gegensatz zur Säuger-nSMase durch Phosphatidylserin und andere saure Phospholipide stimuliert [127].

1.6.2 Die nSMase2

Durch Verfeinerung der profilunterstützten Datenbanksuche konnte eine große Phosphohydrolase-Enzymsuperfamilie identifiziert werden, in der die nSMase das einzige Säugerenzym in Subfamilie A darstellt. Weitere Suche in den Datenbanken führte zur Identifizierung mehrerer neuer Säuger-EST's, die jeweils eines der in der Familie konservierten Sequenzmotive enthielten. Die Klonierung und Sequenzierung dieser überlappenden EST's zeigte, daß alle Sequenzmotive in einem Leseraster vorhanden waren. Die cDNA's der nSMase2 (*unigene* Bezeichnung SMPD3, Sphingomyelin Phosphodiesterase 3) von Maus und Mensch kodieren jeweils für ein Protein von 655 Aminosäuren, mit einer berechneten Masse von 71 kDa [128]. Im Gegensatz zur nSMase enthält die nSMase2 zwei hydrophobe Transmembrandomänen am N-Terminus, gefolgt von ca. 200 Aminosäuren *linker* Region, die potentiell Tripelhelices ausbilden kann (kollagenartige Domäne). Der C-Terminus enthält die in der Superfamilie konservierte katalytische Domäne (Abb. 4).

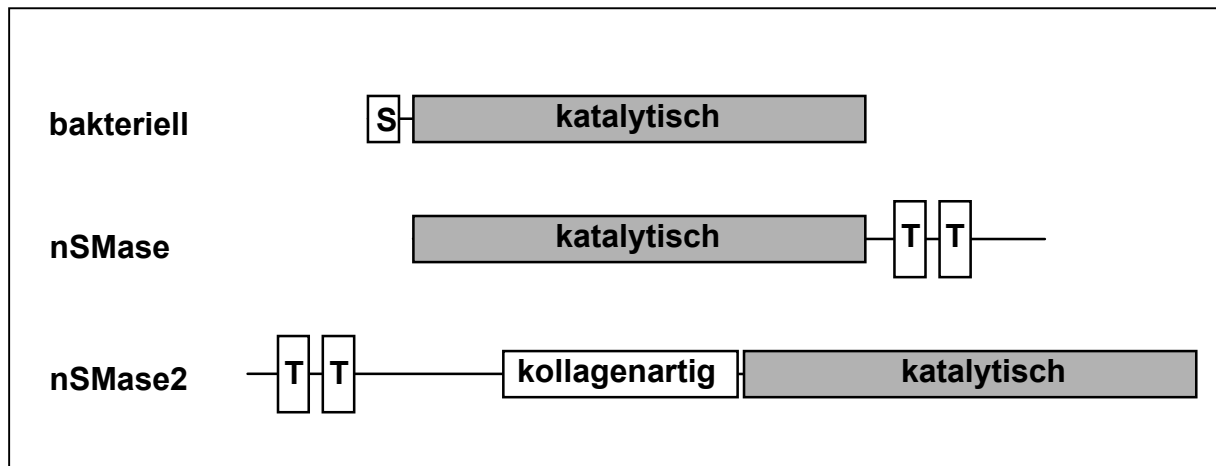


Abb. 4 Schematische Darstellung der Domänenstruktur von bakteriellen und Säuger-Sphingomyelinasen.

Während in der nSMase die Transmembrandomänen (T) C-terminal lokalisiert sind, befinden sich diese in der nSMase2 am N-Terminus, gefolgt von einer kollagenartigen Domäne. Bakterielle Sphingomyelinasen sind nicht membrangebunden, stattdessen haben sie eine Signalsequenz (S) für die Sekretion. Verändert nach [128].

Heterologe Expression der nSMase2-cDNA in HEK 293 Zellen führte zu einer Steigerung der spezifischen nSMase-Aktivität. Die enzymatische Charakterisierung der nSMase2 zeigte eine spezifische Sphingomyelinspaltung im neutralen pH-Bereich, Abhängigkeit von Mg^{2+} -Ionen und DTT, sowie eine Stimulierung durch PS, Phosphatidylethanolamin und ungesättigte Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure. Die RNA der nSMase2 wird hauptsächlich im Hirn und schwach in der Leber exprimiert. Färbung von Gehirnschnitten mit gegen die nSMase2 gerichteten, spezifischen Antikörpern zeigten eine neuronale Lokalisation des Proteins. Immunfluoreszenzstudien an verschiedenen Zelllinien wiesen eine Lokalisation des rekombinanten Proteins im Golgi-Apparat nach [128].

1.6.3 Die humane neutrale Sphingomyelinase aus Urin

Eine weitere neutrale Sphingomyelinase ist bis jetzt kloniert. Durch Antikörper *screening* mit gegen das 92 kDa große nSMase Protein aus Urin gerichteten monoklonalen Antikörpern [114] wurde Ende 1999 eine 3.7 kb große humane cDNA kloniert. Diese kodiert für ein Protein mit 397 Aminosäuren (molekulare Masse 46 kDa). Größenunterschiede zu der gereinigten 92 kDa Form wurden mit posttranslationalen Modifikationen erklärt [129]. Überexpression der cDNA in COS-Zellen führte aber nur zu einer geringen Steigerung der neutralen Sphingomyelinase-Aktivität. Da das Protein keine Homologien zu Sphingomyelinasen, dafür aber starke Homologien zu bakteriellen Isochorismat Synthasen zeigt (eigene Datenbanksuche), ist es fraglich, ob dieses Enzym wirklich eine neutrale Sphingomyelinase repräsentiert [130].

1.7 Transgene Mausmodelle

Durch die Entwicklung von Methoden zur Erstellung transgener Tiere ist es möglich geworden, wesentliche Mechanismen der eukaryotischen Genregulation zu verstehen und durch Mausmodelle humaner Erkrankungen deren Pathogenesemechanismen aufzuklären [131]. Mit Hilfe dieser Technologie kann ein Gen in beliebiger Weise *in vitro* manipuliert und die Auswirkung dieser Mutation auf das Genprodukt *in vivo* analysiert werden.

Man unterscheidet generell drei verschiedenen Verfahren zur Generierung transgener Tiere. Die Mikroinjektion von DNA in den männlichen Vorkern befruchteter Eizellen, den retroviralen Gentransfer in Embryonen und die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) [132-134]. Die Mikroinjektion und der retrovirale Gentransfer bewirken den heterologen Einbau des Transgens in das Genom. Nachteile dieser Genadditionen sind, daß das Transgen, meistens in mehreren Kopien, an einem beliebigen Ort integriert und es dadurch die Expression oder die Regulation anderer Gene beeinflussen kann. Daher ist es bei solchen Experimenten notwendig, mehrere voneinander unabhängige generierte Tiere zu vergleichen.

Die homologe Rekombination in ES-Zellen (*gene targeting*) ermöglicht dagegen die gezielte und gerichtete Manipulation eines Gens [135]. ES-Zellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen werden [136]. Damit ihre Pluripotenz *in vitro* erhalten bleibt, müssen sie eine möglichst niedrige Passagenzahl haben und unter bestimmten Bedingungen kultiviert werden. Diese Kulturbedingungen, wie auch die Transfektionsbedingungen müssen für jede ES-Zelllinie ausgetestet werden [137-139].

Durch *gene targeting* ist es möglich, Gene zu inaktivieren (*knock out*) oder durch Einführung von Deletionen oder Punktmutationen spezifisch zu mutieren. Dabei werden endogene Sequenzen gegen mutierte, aber homologe DNA-Fragmente ausgetauscht. Die dafür verwendeten *replacement* Vektoren enthalten neben den mutierten Sequenzen noch positive und negative Selektionsmarker. Der positive Selektionsmarker, meist ein bakterielles Antibiotikum Resistenzgen, wird mit dem Transgen in das Genom integriert. Häufig dient dieses zur Unterbrechung einer Gensequenz, was zur Ablation der Genfunktion führt (*knock out*). Der negative Selektionsmarker, der die toxische Wirkung vermittelt, befindet sich außerhalb der homologen Sequenz, so daß dieser bei heterologer Integration, nicht aber bei homologer Rekombination in das Genom integriert wird. ES-Zellen, die mit solchen *targeting* Konstrukten transfiziert wurden, werden dann einer positiv/negativ Selektion unterzogen, so daß es zu einer Anreicherung homolog rekombinierter Klone kommt [140]. Nach Isolierung,

Analyse und Expandierung werden diese Klone durch Mikroinjektion in das Blastocoel isolierter Blastozysten injiziert und diese in die Uteri scheinchwangerer Weibchen transferiert [141]. Eine Alternative zu der technisch aufwendigen Injektionsmethode bietet die Aggregationsmethode. Dabei werden Embryonen im 8-Zell- oder Morulastadium nach Entfernung der *zona pellucida* mit ES-Zellen inkubiert, die so in den Keim aufgenommen werden können [142, 143]. Da man ES-Zellen und Blastozysten aus Mausstämmen mit verschiedenen Fellfarben verwendet, kann man anhand der Fellfärbung den Anteil der mutierten Zellen am Gesamtorganismus abschätzen. Wenn auch Zellen der Keimbahn von den ES Zellen abstammen, kann die eingeführte Mutation weitervererbt und durch Kreuzung Tiere generiert werden, die im Bezug auf die Mutation homozygot sind.

Eine Modifikation dieser Methode mit der Möglichkeit ein Gen entwicklungs- oder zelltypspezifisch auszuschalten, ist das Cre/loxP-System des Bakteriophagen P1[144]. Dieses System macht sich zu Nutzen, daß von den sog. *loxP*-Sequenzen flankierte Genfragmente von der Cre-Rekombinase deletiert werden können [145]. Die verwendeten *targeting*-Vektoren enthalten die zu deletierenden Genfragmente von *loxP-sites* flankiert. Der positive Selektionsmarker wird außerhalb der kodierenden Sequenz plaziert und ebenfalls von *loxP-sites* flankiert, so kann dieser, vor der Injektion der ES-Zellen, durch Expression der Cre-Rekombinase *in vitro* entfernt werden. Damit kann eine mögliche Beeinflussung anderer Gene durch den Selektionsmarker verhindert werden [146, 147].

Die aus solchen ES Zellen hervorgehende Mauslinie hat eine normale Expression des modifizierten Gens. Eine Exzision des interessierenden Genfragmentes kann dann durch Einkreuzung von Cre-Rekombinase exprimierenden, transgenen Mäusen in diese Linie induziert werden. Da das Cre-Transgen zelltyp-, entwicklungspezifisch oder induzierbar exprimiert werden kann, ist es möglich die Auswirkung einer Genablation zu einem beliebigen Zeitpunkt zu studieren [148-151].

2. Aufgabenstellung

Neutrale Sphingomyelinaseaktivitäten sind seit den 60er Jahren beschrieben worden. Die *in vivo*- Funktion dieser Sphingomyelin-hydrolysierenden Phospholipasen C ist aber weitgehend unbekannt geblieben, obwohl sie aufgrund ihrer möglichen Beteiligung an Ceramid-induzierten Signalvorgängen Gegenstand intensiver Untersuchungen waren.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die cDNA`s der humanen und murinen nSMase kloniert sowie funktionell in eukaryotischen Zellsystemen exprimiert. Es lagen erste Daten der enzymatischen Charakterisierung vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das murine Enzym *in vitro* biochemisch und zellbiologisch charakterisiert und seine Funktion *in vivo* durch die Erstellung eines nullallelischen Mausmodelles aufgeklärt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Die Rolle der nSMase in der Signaltransduktion von TNF- α

Die Bedeutung von Ceramid als *second messenger* bei der Induktion intrazellulärer Signalkaskaden wird kontrovers diskutiert [19, 76, 152].

Eine plasmamembranständige nSMase soll nach Stimulation durch Cytokine wie TNF- α oder Fas von den entsprechenden Rezeptoren aktiviert werden und das gebildete Ceramid als *second messenger* in Abhängigkeit und Zustand der Zelle zur Aktivierung proliferativer, anti-apoptotischer Signalwege oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen [75, 153, 154].

Im Falle einer Beteiligung der klonierten nSMase an von TNF- α induzierten, intrazellulären Signalketten, sollten nSMase-überexprimierende Zellen nach entsprechender Stimulation eine vermehrte Bildung von Ceramid, sowie eine schnellere und/oder stärkere Aktivierung der proliferativen Signalketten (wie der MAPK-Kaskade oder der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B) zeigen [155]. Auch sollten die stress-induzierten Protein Kinase-Kaskaden (SAPK/JNK) aktiviert werden [156]. Bei gleichzeitiger Verwendung des

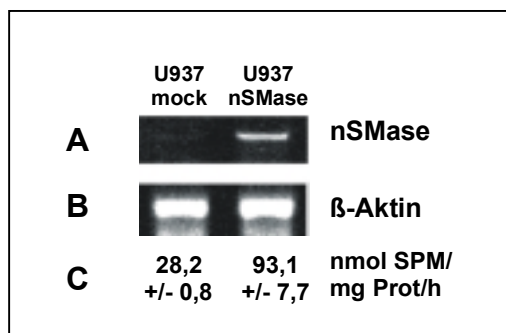


Abb. 5 Nachweis der Expression der nSMase in U937 Zellen.

A, RT-PCR mit nSMase-spezifischen Primern. In nSMase transfizierten Zellen ist ein deutliches 396 bp großes Fragment zu erkennen. B, Amplifikation eines 298 bp Fragmentes der β -Aktin mRNA als interner Standard. C, Spezifische nSMase Aktivitäten (nmol SPM/mg Protein/h) in den beiden Zelllinien.

Proteinsynthese-Blockers Cycloheximid sollten überexprimierende Zellen aufgrund der Inhibition NF- κ B-induzierter Transkription eine stärkere Aktivierung apoptotischer Prozesse zeigen [157-159].

Die zur enzymatischen Charakterisierung des Enzyms generierten HEK293 Zelllinien erwiesen sich als ungeeignetes System für Signaltransduktionsexperimente. Daher wurde eine stabile, die murine nSMase unter dem CMV Promoter exprimierende U937 Zelllinie generiert [118]. U937 Zellen sind histiozytische Lymphomzellen humanen Ursprungs. Diese Zellen wurden schon früher zur Analyse des *second messengers* Ceramid im Rahmen apoptotischer und mitogener Vorgänge innerhalb der Zelle verwendet [160].

Die Analyse dieser Linie (U4) ergab eine Steigerung der spezifischen nSMase Aktivität um den Faktor 4.2 im Vergleich zu einer mit dem Ausgangsvektor ("mock") transfizierten Zelllinie. Durch RT-PCR wurde die Expression auch auf RNA-Ebene nachgewiesen. Abbildung 5 zeigt ein spezifisches, 396 bp großes PCR-Produkt, das mit dem Primerpaar HindIII-sense/NotI-asense aus U4 amplifiziert wurde. Die nSMase überexprimierenden Zellen zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten und proliferierten wie mock-transfizierte Zellen.

3.1.1 Stimulation nSMase-exprimierender Zellen mit TNF- α

Eine Aktivitätssteigerung der plasmamembranständigen neutralen Sphingomyelinase nach Stimulation mit TNF- α wurde beschrieben [160]. Nach Stimulation von mock oder U4 Zellen über verschiedene Zeiten mit 100 ng hTNF- α (spezifische Aktivität 6.6×10 U/mg) je ml Medium wurde die enzymatische Aktivität *in vitro* gemessen. Weder mock noch nSMase transfizierte Zellen zeigten eine signifikante Aktivitätssteigerung (Daten nicht gezeigt).

Da der Aktivitätstest keine Aussage über die Aktivierbarkeit des Enzyms in der Zelle erlaubte, wurde der intrazelluläre Ceramidspiegel gemessen. Dabei wurde auf die Verwendung des häufig benutzten Diacylglycerol-Kinase-Assays aufgrund seiner technischen Unzulänglichkeit verzichtet [161].

U937-Zellen wurden 48 h mit 1- ^{14}C -Acetat markiert und die Zellen anschließend für verschiedene Zeiten mit 100 ng/ml TNF- α stimuliert. Nach Extraktion wurden die radioaktiv markierten Lipide dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit einem Phosphorimager quantifiziert. Die Banden wurden anhand von Standards zugeordnet.

Im Gegensatz zu mock-transfizierten Zellen zeigten nSMase exprimierende U937-Zellen 10 Minuten nach TNF- α Stimulation eine um ca. 25 % erhöhte Ceramidbildung. Im weiteren Verlauf der Stimulation blieb der Ceramidspiegel 15-20 % über den Nullwert (Abb. 6).

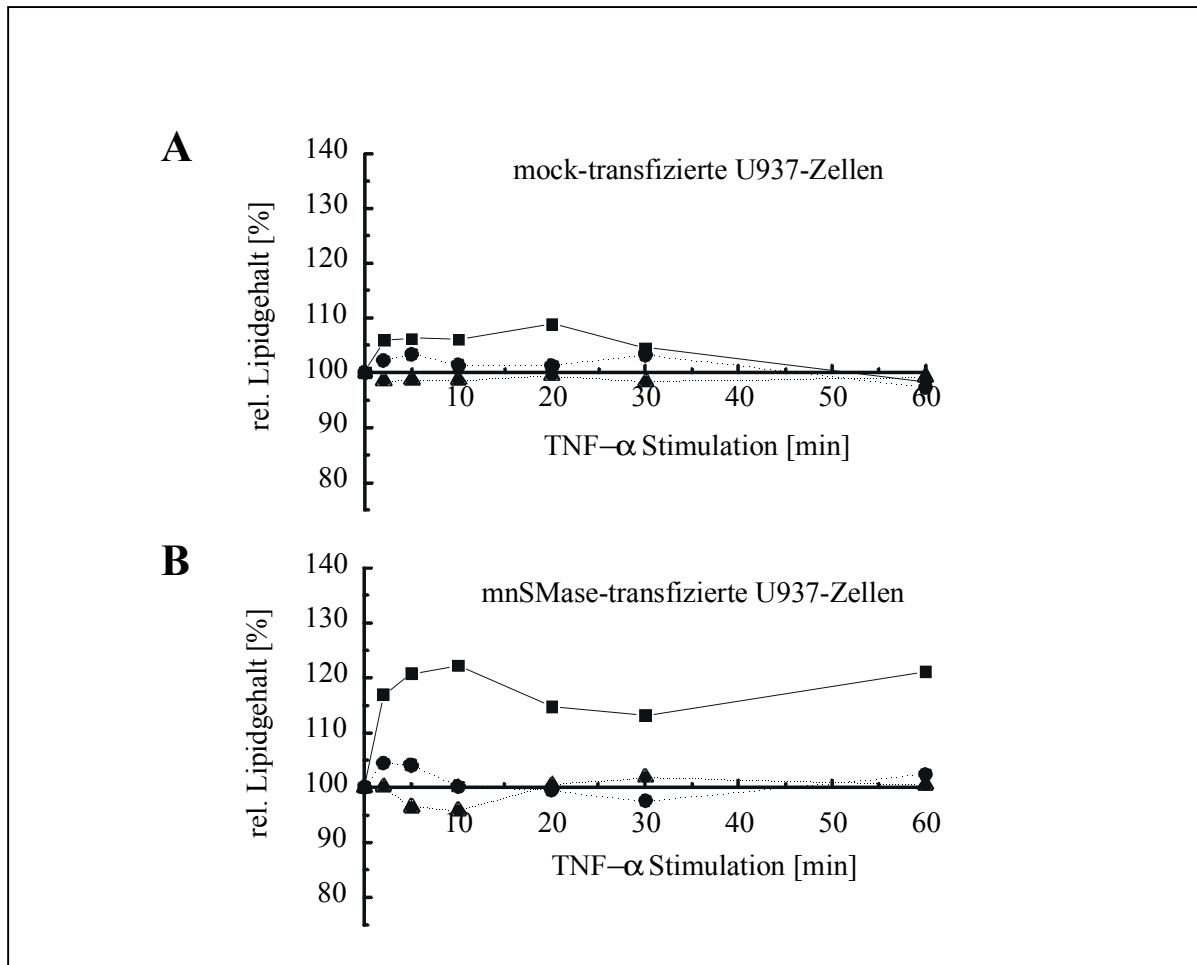


Abb. 6 Kinetik der Ceramidbildung in U937-Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml hTNF α . **A)** Mock-transfizierte U937-Zellen. **B)** mnSMase-transfizierte U937-Zellen. Die relativen Konzentrationen von Ceramid (■), Sphingomyelin (●) und Phosphatidylethanolamin (▲) wurden auf Phosphatidylcholin normiert.

3.1.2 Aktivitätsmessungen mitogen- und stress-aktivierter Proteinkinasen

Um die Frage zu klären, ob durch die nSMase-Überexpression die TNF- α induzierte Aktivierung der MAPK/Erk- bzw. der JNK-Kaskaden beeinflusst werden, wurde die Aktivität der Proteinkinasen ERK1 und JNK2 gemessen. Zellen wurden über verschiedene Zeiten mit 100 ng/ml TNF- α stimuliert, lysiert und die Kinasen immunpräzipitiert. Der Aktivierungszustand der Kinasen wurde *in vitro* anhand der Phosphorylierung ihrer Substrate mit radioaktivem Phosphat bestimmt.

Weder in mock- noch in nSMase transfizierten Zellen wurde eine signifikante Aktivierung der ERK1 gemessen. Die JNK2 wurde dagegen in den ersten 20 Minuten nach TNF- α -Stimulation deutlich aktiviert. Ein Unterschied zwischen mock und nSMase-exprimierenden Zellen war aber nicht erkennbar (Abb. 7).

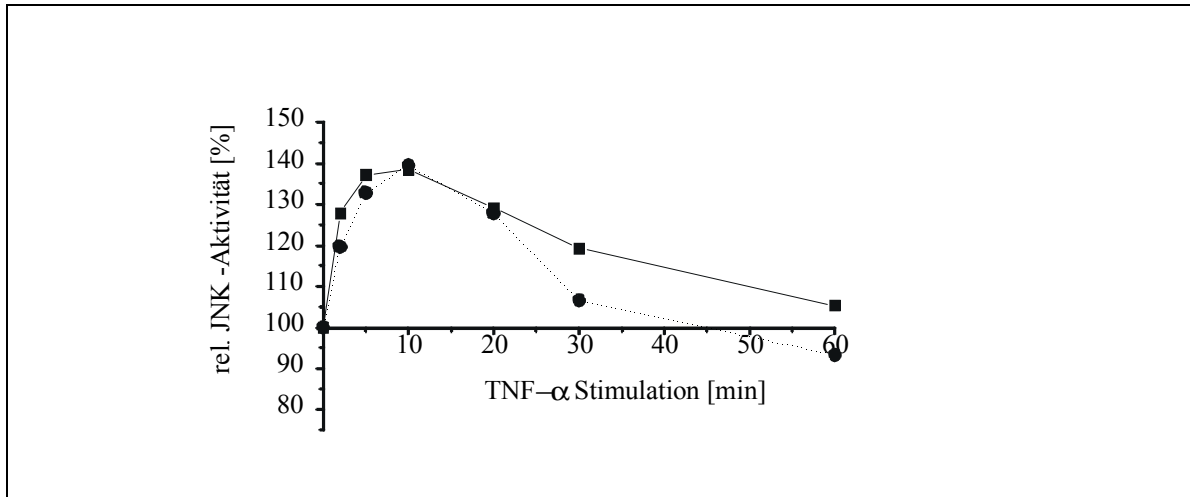


Abb. 7 Kinetik der JNK2-Aktivierung

Mock- (■) und nSMase-transfizierte (●) U937-Zellen wurden mit 100 ng/ml humanem TNF- α für verschiedene Zeiten stimuliert und die Aktivierung der JNK2 gemessen. Es sind keine Unterschiede in der Aktivität der JNK2 zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen.

3.1.3 TNF- α induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Die am besten untersuchte TNF- α -induzierte Kaskade ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Nach Bindung von TNF- α trimerisiert dessen 55 kDa Rezeptor. Intrazellulär bindet TRADD (*TNF receptor associated death domain*) und an diesen das Rezeptor-interagierende Protein (RIP). RIP wird von TRAF2 (*TNF receptor associated factor*) gebunden, über den es zur Aktivierung von Proteinkinasen der Mitogen-aktivierten / *extracellular signal related kinase* (MAPK/ERK) Familie kommt. Über diese Kaskade wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und in den Zellkern transloziert, wo er die Expression proliferativer und anti-apoptischer Gene induziert [157, 162].

Mock und nSMase-exprimierende U937 Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit TNF α stimuliert, Kernextrakte präpariert und *band shift* Analysen durchgeführt (Abb. 8).

Die Kinetik der NF- κ B Translokation und die Menge des in den Zellkern translozierten Proteins war in beiden Zelllinien nicht unterscheidbar. Eine Beteiligung des Enzyms an dieser Signalkaskade konnte daher ausgeschlossen werden.

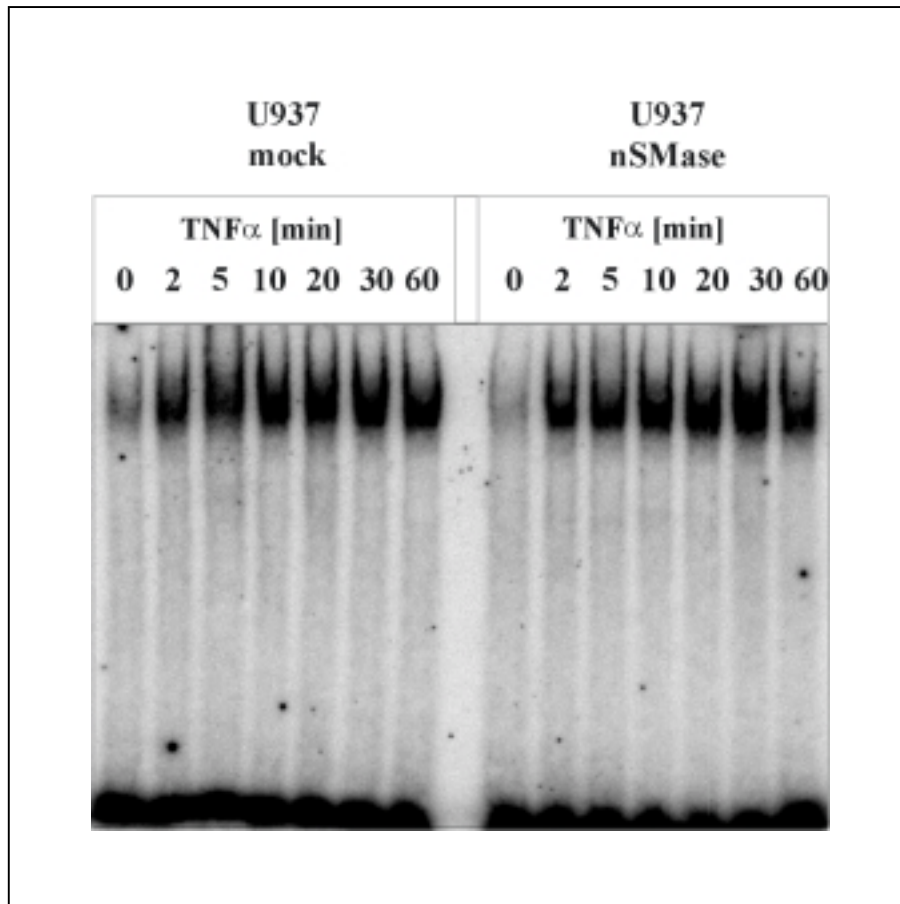


Abb. 8 Band shift Analyse von mock und nSMase-transfizierten Zellen.

Mock und nSMase exprimierende Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml TNF- α stimuliert. Je 10 μ g Kernextrakt wurden für 30 Minuten mit 0.4 pmol radioaktiv markiertem, doppelsträngigem Oligonukleotid inkubiert und die DNA/Protein Komplexe auf einem 4 %igen nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

3.1.4 Die nSMase und Apoptose

Der TNF- α -induzierte programmierte Zelltod (Apoptose) steht mit den oben erwähnten proliferativen Reaktionen in Wechselwirkung und wird über das Protein FADD (*Fas associated death domain*) ausgelöst. FADD bindet über seine *death domain* (DD) an TRADD und aktiviert über seine *death effector domain* (DED) die Caspase Kaskade [163, 164]. Caspasen sind Cystein Proteasen, die als inaktive Vorstufen synthetisiert werden. Erst durch proteolytische Spaltung entsteht das aktive Enzym, das wiederum weitere Substrate spalten kann. Einmal aktiviert führt die Caspase-Kaskade immer zum Zelltod [165]. Ein Substrat der Caspase Kaskade ist die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), ein Reparaturenzym das spezifisch DNA-Strangbrüche erkennt.

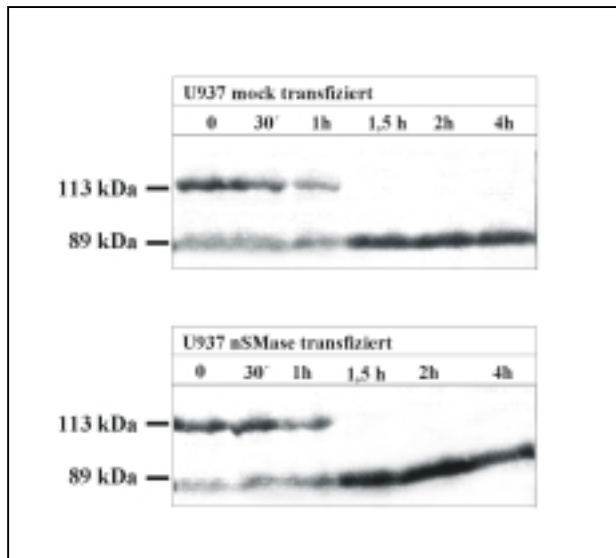


Abb. 9 Kinetik der PARP Spaltung.

In mock und nSMase-transfizierten U937 Zellen wurde nach Stimulation mit 200 ng hTNF- α und 10 μ g/ml Cycloheximid die Kinetik der PARP Spaltung untersucht. Zwischen beiden Zelllinien ist kein Unterschied zu erkennen.

Die PARP ist ein 113 kDa großes Protein, das von Caspasen in zwei 89 kDa und 24 kDa große Fragmente gespalten wird [166]. Diese Spaltung kann im *Western Blot* spezifisch nachgewiesen werden und dient somit als Marker für den programmierten Zelltod.

Mock- und nSMase-exprimierende U937 Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden mit 200 ng/ml hTNF- α und 10 μ g/ml Cycloheximid stimuliert und Zellextrakte einer *Western Blot* Analyse mit einem PARP-spezifischen Antikörper unterzogen. Beide Zelllinien zeigten keine Unterschiede in der Kinetik der PARP Spaltung (Abb. 9).

Ein frühes Kennzeichen von Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) [167]. Mock und nSMase exprimierende Zellen wurden über einen Zeitraum bis zu 18 Stunden mit 200 ng/ml hTNF- α und 10 μ g/ml Cycloheximid stimuliert und mit dem PS-bindenden AnnexinV-FITC sowie dem DNA-interkalierenden 7-Aminoactinomycin für die FACS-Analyse gefärbt. Weder für die frühapoptotischen, AnnexinV-positiven Zellen noch für die spätapoptotischen, doppelt positiven Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Stimulation ein Unterschied zwischen den Zelllinien beobachtet (Daten nicht gezeigt).

TNF- α oder Cycloheximid alleine lösten nur in geringem Maße Apoptose aus.

3.2 Biochemische Charakterisierung des murinen nSMase Proteins

Für die biochemischen Analysen des murinen nSMase Proteins wurde eine HEK-Zelllinie verwendet, die die nSMase unter der Kontrolle des CMV-Promoters stabil exprimiert. Diese Linie (Rep9) zeigt im Vergleich zur mock-transfizierten Zelllinie (pRC2) eine stark erhöhte spezifische nSMase Aktivität (2518 +/- 255 nmol SPM/mg Protein/h Rep9, 19 +/- 2 nmol SPM/mg Protein/h pRC2) [118]. Für enzymatische Tests wurden Proteinextrakte aus angereicherten Membranfraktionen dieser Zelllinien gewonnen. Diese beiden Zelllinien wurden auch für die Lipidanalysen verwendet.

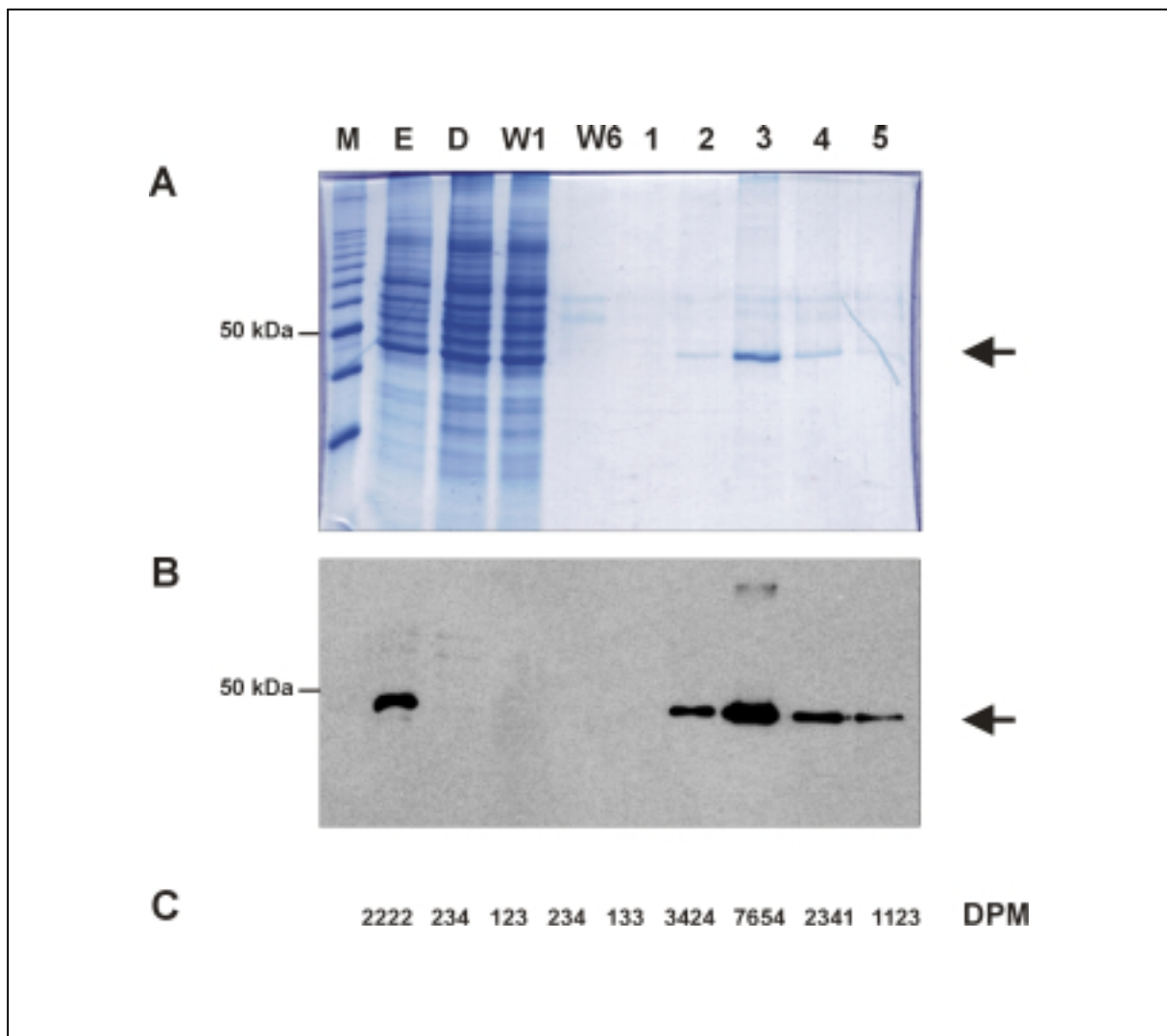


Abb. 10 Reinigung der mnSMase durch Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie.

A, Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel (15%) der verschiedenen Fraktionen. B, *Western Blot* von A mit anti mnSMase Antikörpern (mKT, 1mg/ml, 1:500) und Peroxidase gekoppeltem anti Kaninchen IgG Antikörperkonjugat (Sigma, 1:15000). C, gemessene DPM im nSMase Aktivitätstest der einzelnen Fraktionen.

M, Marker; E, Membranextrakt; W1, erster Waschschrift; W6 sechster Waschschrift; 1-5, Eluate 1-5.

Da für die weiterführende enzymatische Charakterisierung eine reine Proteinfraction verwendet werden sollte, wurde das rekombinante Protein aus HEK Zellen (Linie KT6) gereinigt. Diese Zelllinie wurde mit dem Vektor mnSMase/pcDNA3.1Myc-His zur stabilen Expression transfiziert [118]. Der Vektor kodiert für die murine nSMase mit einem C-terminalen 6x His/c-myc-Oligopeptid. Diese modifizierte nSMase wird in ähnlichem Umfang wie die natürliche nSMase exprimiert. Die enzymatische Aktivität wird durch die C-terminale Verlängerung des Proteins nicht beeinträchtigt. Aus Membranextrakten dieser Zelllinie wurde das Fusionsprotein über Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie enzymatisch aktiv bis zur Bandenreinheit gereinigt. Durch *Western Blotting* und enzymatische Tests der einzelnen Fraktionen wurde die Anreicherung der enzymatischen Aktivität dokumentiert (Abb. 10).

3.2.1 Aktivatoren der gereinigten, rekombinanten mnSMase

Erste Analysen von Membranextrakten überexprimierender HEK Zellen konnten einen Teil der enzymatischen Eigenschaften des Enzyms, wie die Abhängigkeit von divalenten Kationen, dem pH Bereich, Detergenz und von reduzierenden Agenzien aufklären. Ebenfalls wurde eine Aktivierung durch Arachidonsäure nachgewiesen [118].

Die gereinigte, rekombinante murine nSMase ist inaktiv ohne Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen. Beide Kationen führten zu einer Aktivierung des Enzyms mit unterschiedlicher Kinetik. Gereinigtes Enzym wurde in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen inkubiert und die enzymatische Aktivität bestimmt. Mg^{2+} -Ionen ($K_a = 80 \mu M$) aktivieren das Enzym in Konzentrationen bis zu 10 mM, während Mn^{2+} -Ionen ($K_a = 15 \mu M$) in Konzentrationen ab 0.5 mM inhibierend wirkten (Abb. 11A). Dieses wurde auch für die nSMase-Aktivität aus Rattenleber beschrieben [110]. Arachidonsäure wurde als Aktivator der plasmamembranständigen nSMase identifiziert [116, 168, 169]. Nach Zugabe verschiedener Mengen von Arachidonsäure in den Aktivitätstest wurde ebenfalls eine Aktivierung des rekombinanten Enzyms beobachtet ($K_a = 20 \mu M$) (Abb. 11B). Fettsäuren mit niedrigerem Sättigungsgrad aktivierten das Enzym in geringerem Maße (Abb. 11C). Phospholipide wie Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidsäure hatten im Unterschied zu dem aus Rattenhirn gereinigten Enzym nur eine geringe aktivierende Wirkung auf die nSMase [118].

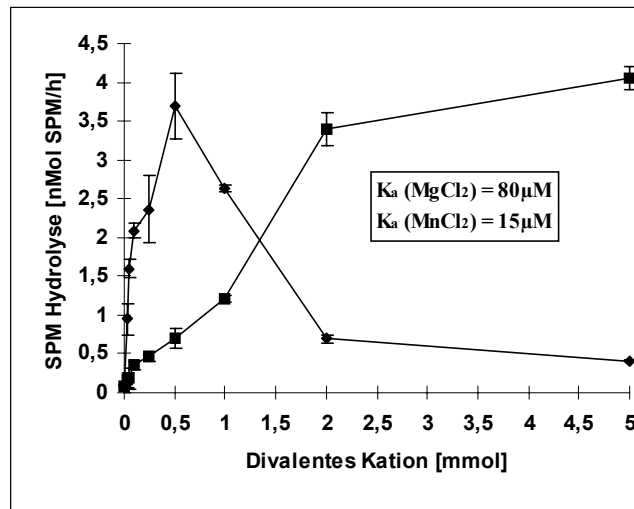
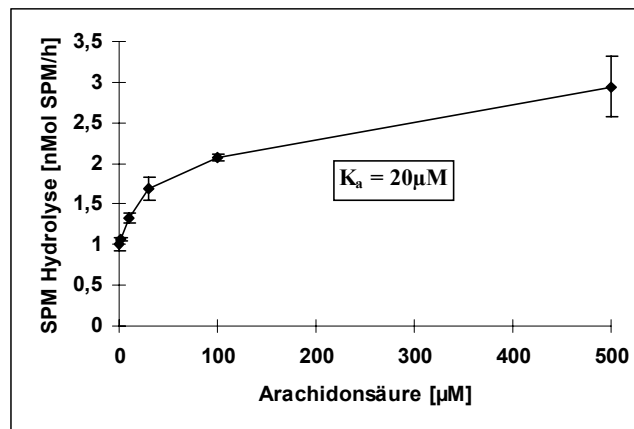
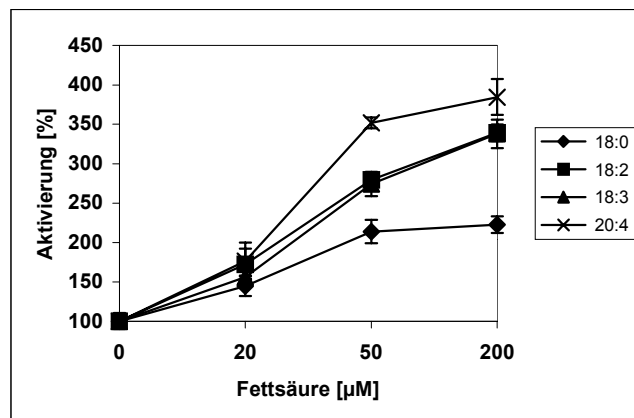
A**B****C**

Abb. 11 Einfluß von divalenten Kationen, Arachidonsäure und Fettsäuren auf die Aktivität der gereinigten mnSMase.

A, Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen. ■ $MgCl_2$, ● $MnCl_2$. B, Aktivierung durch Arachidonsäure. C, Aktivierung durch Fettsäuren verschiedenen Sättigungsgrades. Die Fettsäuren wurden in EtOH gelöst und direkt in den Assayansatz gegeben. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die K_a -Werte wurden aus Lineweaver-Burk-Diagrammen dieser Daten errechnet.

3.2.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der nSMase

In mnSMase überexprimierenden HEK Zellen wurde nach 48 stündiger Inkubation mit [¹⁴C]-markiertem Acetat bzw. Palmitat und dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Lipidextrakte im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4, v/v/v), bzw. Chloroform/Methanol (15:1, v/v) keine Abnahme der Radioaktivität im Sphingomyelin oder die Zunahme der des Ceramids beobachtet (Daten nicht gezeigt, [118]).

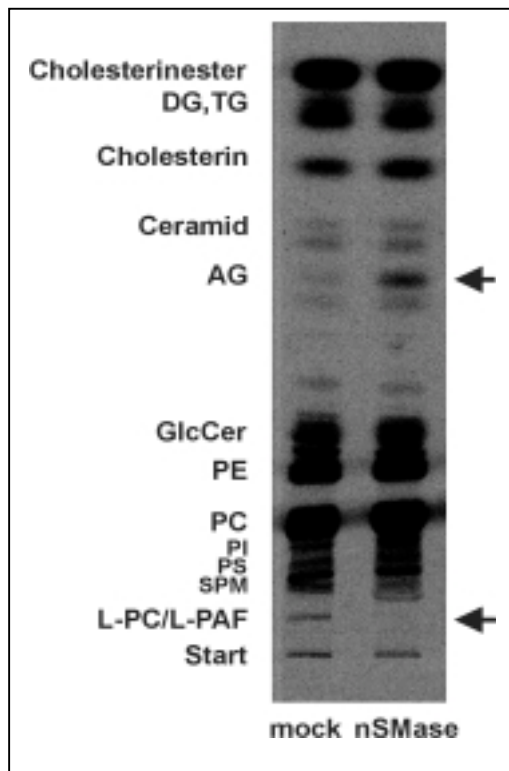


Abb. 12 Metabolische Markierung von HEK Zellen.

Mock und nSMase exprimierende HEK Zellen wurden für 48 h mit 1-[¹⁴C]-Palmitat markiert und die extrahierten Lipide wurden im Laufmittel Chloroform/Methanol/ 2 N NH₄OH (65:35:5) (v/v/v), gefolgt von Chloroform/Methanol (15:1) (v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Lipide erfolgte mit einem Phosphorimager. Die Pfeile markieren die veränderten Lipidklassen. L-PC, lyso-Phosphatidylcholin; L-PAF, lyso-platelet activating factor; SPM, Sphingomyelin; PS, Phosphatidylserin; PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; GlcCer, Glucosylceramid (Cerebrosid); AG, Alkyl-, bzw. Acyl-Glycerol; DG, Diglycerid; TG, Triglycerid.

Bei zweistufiger Entwicklung der Chromatogramme im System Chloroform/Methanol/ 2N NH₄OH (65:35:5, v/v/v), gefolgt vom Laufmittel Chloroform/Methanol (15:1, v/v) wurde aber die Zunahme der Radioaktivität in einer Bande beobachtet, die einen dem Standard für Monoglyceride (Alkyl- bzw. Acyl-Glycerole) gleichen R_F-Wert aufwies. Parallel dazu wurde die Abnahme der als Lyso-Phosphatidylcholin (L-PC, 1-acyl- 2-lyso- glycero- 3-phosphocholin) und dessen Plasmalogenanalogon Lyso-PAF (*platelet-activating-factor*, 1-O-alkyl- 2-lyso- glycero-3-phosphocholin) identifizierten Banden beobachtet. (Abb. 12). Die Abbildung verdeutlicht auch, daß es in den nSMase überexprimierenden HEK Zellen nicht zu einer Zunahme der Ceramidmenge kommt.

Nach diesen Befunden stellte sich die Frage, ob nSMase überexprimierende HEK Zellen lyso-PC oder lyso-PAF als Substrate schneller metabolisieren können als Kontrollzellen und ob die Hydrolyseprodukte Acylglycerol bzw. Alkylglycerol in den Zellen akkumulieren.

Es wurde beschrieben, daß FRTL5-Zellen nach einstündiger Inkubation mit L-PAF dieses hauptsächlich zu PC, Phosphatidylethanolamin (PE) und Neutrallipiden metabolisieren [170].

In Analogie zu dieser Studie wurden die nSMase

exprimierenden HEK Zellen mit [³H]-markiertem Lyso-PAF für eine Stunde inkubiert und die metabolisch markierten Lipide nach Extraktion dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die einzelnen Lipidfraktionen wurden anhand von Standardlipiden identifiziert (Abb. 13).

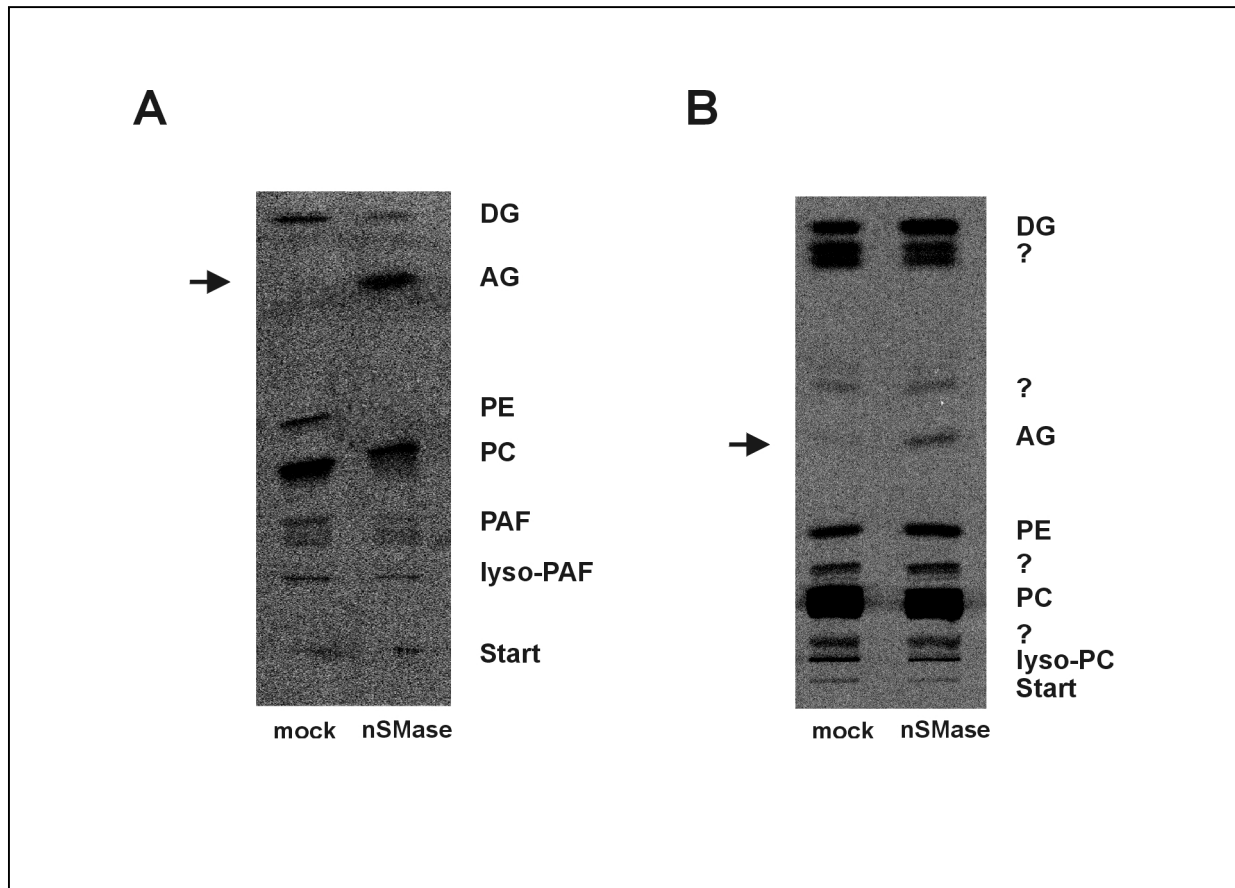


Abb. 13 Metabolische Markierung von HEK Zellen mit [1-O-Octadecyl]-³H-lyso PAF und [1-Palmitoyl]¹⁴C-lyso PC.

HEK Zellen wurden für 1 h mit 2 µCi/ml L-PAF und 0.1 µCi/ml L-PC metabolisch markiert und die Lipide dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt.

A, L-PAF Markierung. Es wurden je 60.000 DPM Lipidextrakt aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittel Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4, v/v/v) entwickelt. B, L-PC Markierung. Es wurden je 10.000 DPM Lipid aufgetragen und das Chromatogramm zur Hälfte im Laufmittel Chloroform/Methanol/2N NH₄OH (65:35:5, v/v/v), und danach in Chloroform/Methanol (15:1, v/v) entwickelt. Fragezeichen bedeuten nicht eindeutig identifizierte Lipide. Dieses Laufmittelsystem trennt die Acyl-Glycerol Bande von den darüber laufenden, nicht identifizierten Banden, die dieses im Laufmittel Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4, v/v/v) überlagern. Pfeile markieren Alkyl-, bzw. Acyl-Glycerol. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte mit einem Phosphorimager.

PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; PAF, *platelet activating factor*; AG Alkyl-, bzw. Acyl-Glycerol; DG, Diglycerid.

In Abbildung 13 A ist das Autoradiogramm der aufgetrennten L-PAF Metaboliten gezeigt. In nSMase exprimierenden Zellen war deutlich eine Akkumulation des Hydrolyseproduktes Alkyl-Glycerol (AG) zu erkennen. Die Menge an markiertem PC, PAF und L-PAF nahm im Vergleich zu den mock-transfizierten Zellen deutlich ab, PE war nicht mehr detektierbar.

Nach einstündiger Markierung mit L-PC war in den nSMase exprimierenden Zellen ebenfalls eine Akkumulation von Acyl-Glycerol (AG) zu beobachten. Auch hier zeigten die mock-transfizierten Zellen keine Anreicherung des Monoglycerides. Die Mengen der anderen Lipide waren nicht deutlich verändert (Abb. 13 B).

Für enzymatische Aktivitätstests mit lyso-PC und lyso-PAF als Substrate wurden sowohl Membranextrakte überexprimierender HEK Zellen als auch das gereinigte Enzym eingesetzt. Die Lipide wurden in 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 0.05 % Triton X-100 gelöst und je 10 nmol in den Assay eingesetzt. Nach Extraktion des Gemisches mit Chloroform/Methanol (2:1) wurden die in der organischen Phase gelösten Hydrolyseprodukte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit einem Phosphorimager detektiert. Beide Substrate wurden von der mnSMase umgesetzt (Abb. 14). Während DTT wie im SMase Assay die Aktivität stabilisierte, wirkte eine Triton X-100 Konzentration von 0.05 % eher inhibierend.

Wegen der Unterschiedlichkeit der Assaysysteme für Sphingomyelin und lyso-PC/lyso-PAF wurde auf eine Bestimmung von K_M-Werten für diese Substrate verzichtet. Es mußte allerdings eine wesentlich größere Proteinmenge eingesetzt werden, um die lyso-PC/lyso-PAF-Hydrolyse detektieren zu können.

Die dem Sphingomyelin strukturell ähnlichen lyso-PC und lyso-PAF sind nicht generell gute Substrate von Sphingomyelinasen. Membranextrakte aus nSMase2 überexprimierenden HEK Zellen [128] bzw. unter sauren Bedingungen durchgeführten aSMase Assays mit Zellextrakten aus maSMase überexprimierenden HEK-Zellen [171] zeigten keinerlei Substratumsatz durch diese Enzyme (Daten nicht gezeigt).

Frühere Untersuchungen zur Substratspezifität der aus HEK Zellen gereinigten nSMase zeigten, daß das strukturell verwandte Phosphatidylcholin (PC) nur im geringen Maße als Substrat dient [118]. Dieses konnte auch für das gereinigte Enzym bestätigt werden (nicht gezeigt). Das Plasmalogenanalogon von PC, *platelet activating factor* (PAF, 1-alkyl, 2-acetyl, *sn* glycerol-3-phosphocholin) wurde von der nSMase ebenfalls nicht umgesetzt (Daten nicht gezeigt).

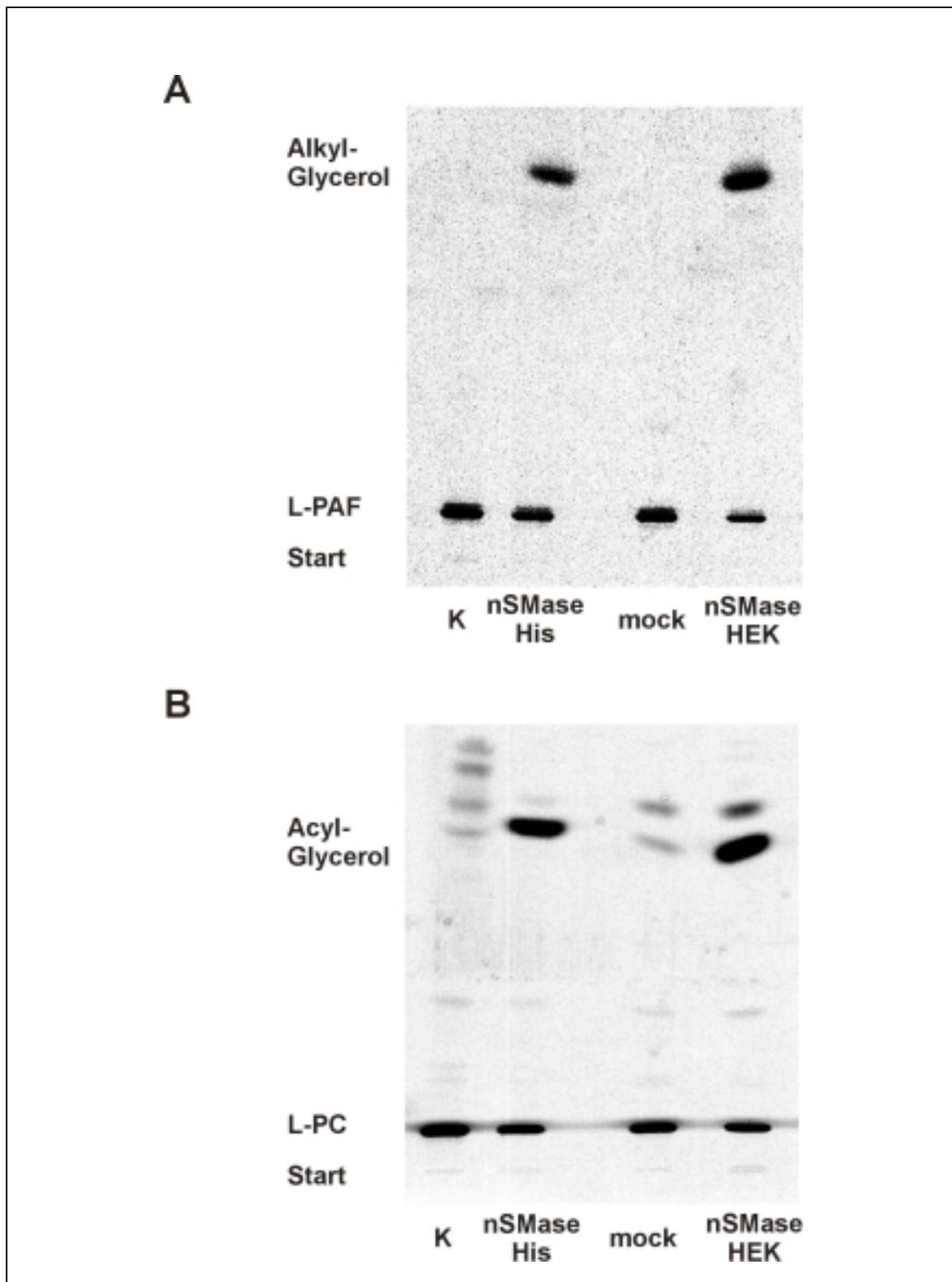


Abb. 14 *In vitro* Assay mit lyso-PAF bzw lyso-PC als Substrat.

Je 10 nmol [1-O-Octadecyl]-³H-lyso PAF (A) bzw. [1-Palmitoyl]¹⁴C-lyso PC (B) wurden für 1 h mit 10 µg Membranextrakt (mock, NSM HEK) oder gleichen Mengen an rekombinantem Protein für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach Extraktion des Assay-Gemisches mit Chloroform/Methanol wurde die organische Phase unter N₂ eingedampft und in Chloroform/Methanol (2:1) resuspendiert. Der gesamte Extrakt wurde dünn-schicht-chromatographisch im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4, v/v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Lipide erfolgte mit einem Phosphorimager.

3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der murinen nSMase

Die *in vitro* durchgeführten enzymatischen Aktivitätsmessungen wurden mit 2700 x g Sedimenten von Zell-Lysaten durchgeführt, also mit Gesamtmembranextrakten [118]. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, daß das Enzym in einem anderen Organell als der Plasmamembran lokalisiert ist. Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation des Enzyms

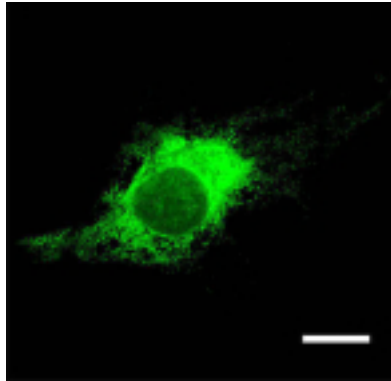


Abb. 15 Immuncytochemischer Nachweis des nSMase-cMyc Fusionsproteins in EMFIs.

Die Aufnahme zeigt eine ER Färbung. Erster Antikörper anti c-myc (Invitrogen, 1:500), zweiter Anti-körper anti Maus IgG-Cy2 konjugiert (Jackson, 1:500). Balken: 5µm.

wurden immuncytochemische Studien an transfizierten Zellen durchgeführt.

Embryonale Fibroblasten (EMFIs) wurden transient mit dem Vektor mnSMase/pcDNA3.1Myc/His transfiziert, der für ein Fusionsprotein aus der mnSMase und den N-terminalen Peptiden c-myc und 6x His kodiert [118]. Die Expression dieses Fusionsproteins in den Zellen führte im *in vitro* Assay zu einer Steigerung der spezifischen neutralen Sphingomyelinase Aktivität (nicht gezeigt). Der Myc-His-tag beeinflusst damit nicht die enzymatische Aktivität. Das überexprimierte Protein konnte immuncytochemisch mit einem anti c-myc Antikörper und einem entsprechenden Cy2-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein exprimierende

Zellen zeigten eine starke, kernnahe Fluoreszenz, die das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi Apparat repräsentierten. Eine Plasmamembranfärbung war nicht zu erkennen (Abb. 15).

Nachdem polyklonale Antikörper gegen das murine Protein verfügbar waren [118], war die Möglichkeit gegeben, rekombinantes und endogenes Protein immuncytochemisch nachzuweisen und Lokalisationsstudien durchzuführen.

In ersten Versuchen wurden Zellen der stabilen HEK-Zelllinien pRC2 (mock transfiziert) und Rep9 (mnSMase exprimierend) gefärbt. Nur in nSMase exprimierenden Zellen wurde eine Färbung nachgewiesen. Die Kontrollzellen zeigten eine schwache Hintergrundfärbung, ebenso mit Präimmunsereum gefärbte Zellen (Daten nicht gezeigt). Somit erkennt der Antikörper spezifisch das rekombinante Protein in den Zelllinien. Da die HEK Zellen relativ klein sind und durch die starke Überexpression eine sehr helle Fluoreszenz zeigten, konnte mit diesen Zelllinien keine Aussage über die Lokalisation des Proteins gemacht werden.

Aus diesem Grunde wurden murine embryonale Fibroblasten (EMFIs) verwendet, an denen man aufgrund ihrer Größe subzelluläre Strukturen besser auflösen kann.

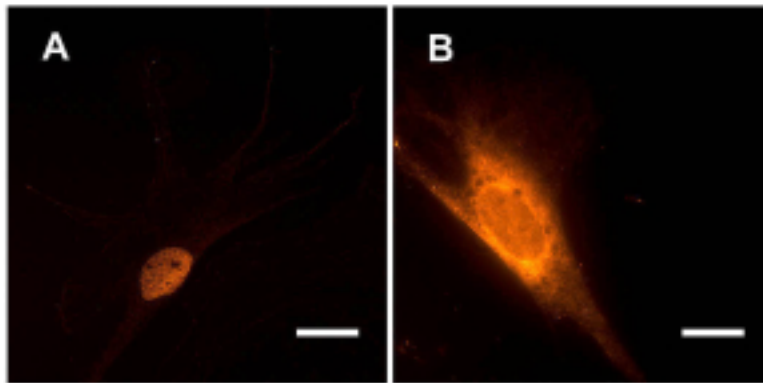


Abb. 16 Immunfluoreszenz nSMase transfizierter Zellen. Nicht transfizierte Zellen (A) zeigen eine schwache Hintergrund Färbung. Transfizierte Zellen (B) zeigen eine kernnahe Lokalisation der nSMase.
1. Antikörper anti mnSMase KT (1mg/ml, 1:500), 2. Antikörper anti Kaninchen Cy-3 konjugiert (Jackson, 1:800).
Balken: 5 µm

Zellen wurden durch Elektroporation transient mit dem Vektor mnSMase/pRC-CMV [118] transfiziert und 24 bis 48 Stunden später mit dem gegen die mnSMase gerichteten Antikörper (mKT) und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper analysiert. Kontrollen mit nicht transfizierten Zellen zeigten nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz. Transfizierte

Zellen zeigten auch hier eine kernnahe Fluoreszenz. Eine Plasmamembranfärbung konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 16).

Doppelfärbungen mit gegen den ER-Marker BiP bzw. gegen das Golgi-ständige 58K-Protein gerichteten monoklonalen Antikörpern und Analyse mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie zeigten eine Kolokalisation der rekombinanten nSMase mit dem ER-Marker. Eine Kolokalisation war aber auch teilweise mit dem 58K Protein zu erkennen (Abb. 17, a-f). Als Kontrolle wurde eine Färbung mit Antikörpern gegen den Cytoskelettmarker α -Tubulin durchgeführt (Abb. 17, g-i), dieser zeigte keine Kolokalisation mit dem nSMase Protein.

Die ubiquitäre Expression der nSMase wurde sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene nachgewiesen [118]. Auffallend ist, daß die im Gehirn gemessene hohe enzymatische Aktivität nicht mit der niedrigen nSMase spezifischen mRNA Expression in allen Geweben korreliert. Weiterhin enthält das aus der cDNA abgeleitete Protein weder eine Signalsequenz noch ein typisches ER-Retentionssignal.

Um auszuschließen, daß es sich bei den Färbungen an EMFIs um eine zelltypspezifische Retention des Proteins im ER handelt, wurde ein Vektor konstruiert, in dem die nSMase als Fusionsprotein mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) exprimiert wird. Mittels PCR wurde mit dem Primerpaar 5'-Xho-sense/3'Sma-asense die nSMase-cDNA aus dem Vektor mnSMase/pRC-CMV amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) subkloniert.

Durch Sequenzierung wurde die cDNA auf Fehler überprüft und mit Hilfe der eingefügten Restriktionsschnittstellen XhoI und SmaI *in frame* an das 5' Ende der EGFP-cDNA im Vektor pEGFP-N2 (Clontech, Accession# U57608) kloniert. Nach Transfektion dieses Vektors (pNSM-EGFP) wird die nSMase als ein Fusionsprotein mit dem EGFP exprimiert.

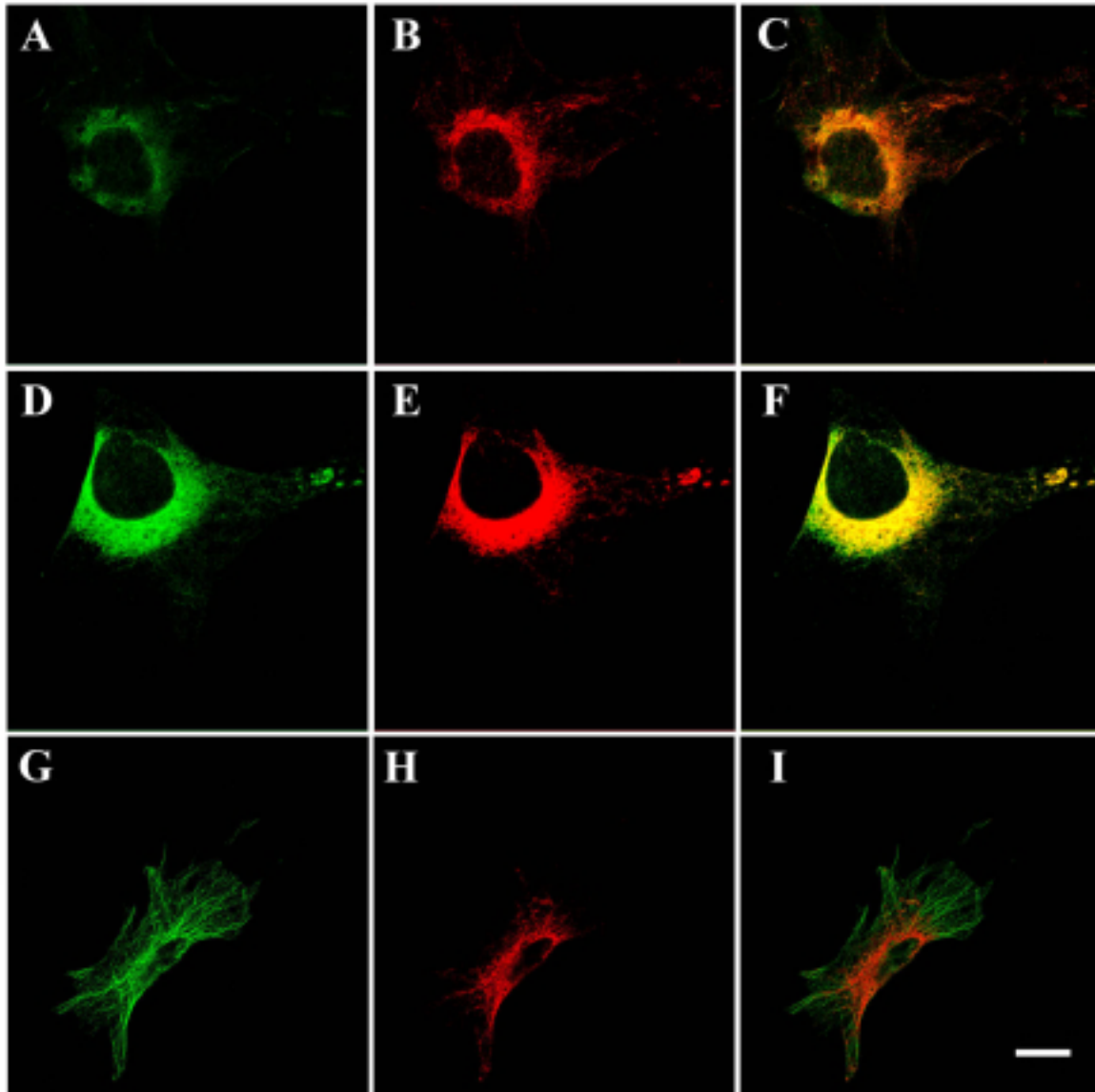


Abb. 17 Konfokale Aufnahmen von transient mit der murinen nSMase-cDNA transfizierten EMFIs.

Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen die nSMase (mKT, 1 mg/ml, 1:500) zusammen mit Antikörpern gegen Proteine des endoplasmatischen Retikulums (anti-BiP, Biomol, 1:200), des Golgi Apparates (anti-58K, Sigma, 1:50) sowie des Cytoskelettes (anti- α -Tubulin, Sigma, 1:1000) und Cy-2 bzw. Cy3 markierten Zweitantikörpern (Jackson, anti-Maus Cy2, 1:500, anti-Kaninchen-Cy3, 1:800). A, anti 58K-Cy2, D, anti BiP-Cy2, G, anti α -Tubulin-Cy2. B, E, H, anti nSMase Cy-3. C, F, I Überlagerung der Cy2 und Cy3-Kanäle. Gelbe Färbung zeigt eine Kolo-kalisation. Balken: 5 μ m

Dieses Konstrukt wurde durch Elektroporation in verschiedene Zelllinien neuronalen und nicht neuronalen Ursprunges eingebracht und die Zellen 24 – 48 Stunden später analysiert. Die Expression des Fusionsproteins führt im *in vitro* Assay zu einer nSMase Aktivitätssteigerung, während mock-transfizierte Zellen keine Steigerung der nSMase Aktivität zeigten (nicht gezeigt).

Abbildung 18 zeigt verschiedene Zelllinien transfiziert mit pNSM-EGFP. In allen Zelllinien ist eine kernnahe Lokalisation zu erkennen (Abb. 18A-E). Als Kontrolle wurden Zellen mit dem Ausgangsvektor pEGFP-N2 transfiziert. Die Fluoreszenz des 20 kDa großen EGFP Proteins verteilte sich homogen über die gesamte Zelle (Abb. 18F).

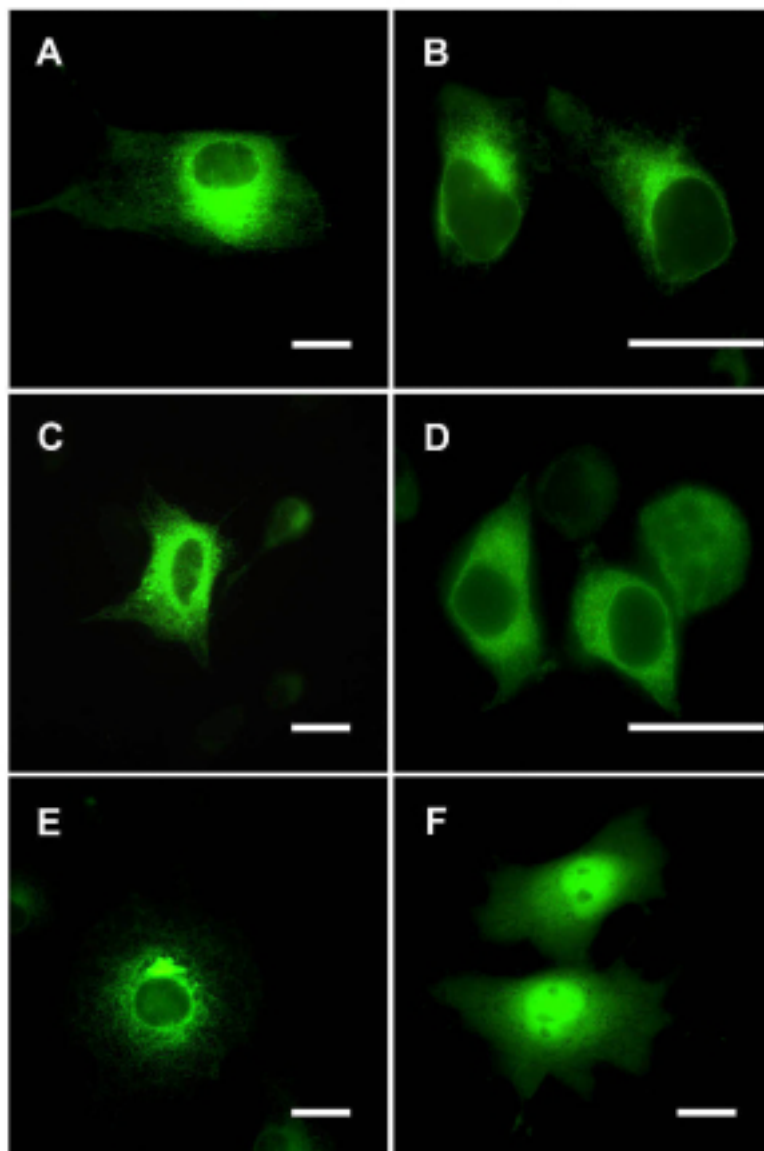


Abb. 18 Lokalisation des EGFP-NSM Fusionsproteins nach Transfektion in verschiedene Zelllinien.

A, EMFI; B, HEK293; C, SH-SY5Y; D, PC12; E, Cos; F, Cos, mock-transfiziert.
Balken: 5 µm

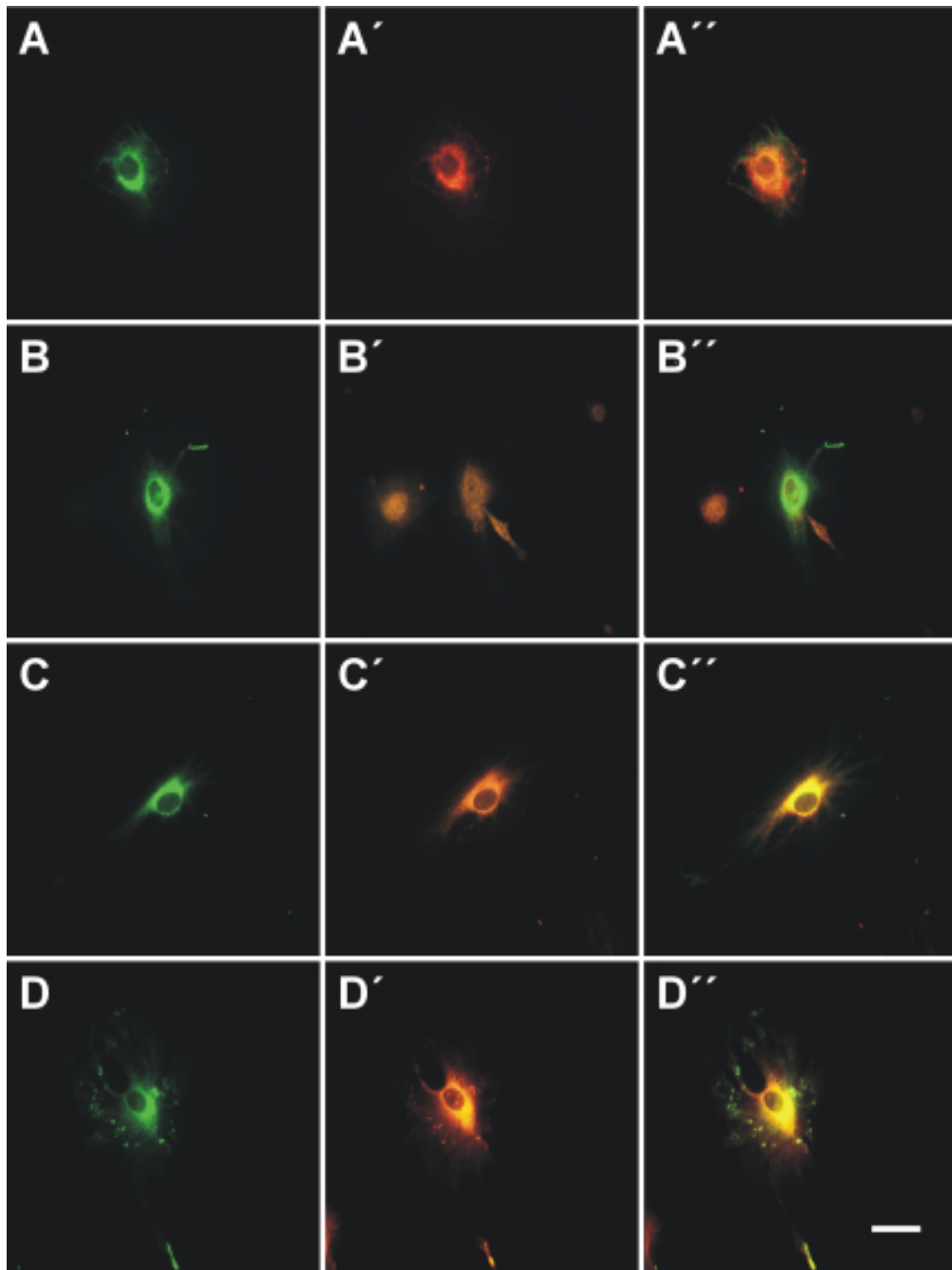


Abb. 19 Einfluß von Brefeldin A auf die Lokalisation des nSMase Proteins.

Zellen wurden mit dem Vektor pNSM-GFP transfiziert, nach 24 h für 4 Stunden mit 5 µg/ml BFA inkubiert, nach Fixierung mit Antikörpern gegen den ER-Marker BiP (Biomol, 1:200) bzw. den Golgi-Marker 58K (Sigma, 1:50) und Cy3 gekoppelten Zweitantikörpern (anti-Maus-Cy3, Sigma, 1:300) gefärbt und mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

A-D, NSM-GFP Fluoreszenz. A'; B', anti-58K-Cy3. C'; D', anti-BiP-Cy3. A''-D'' Überlagerung der Kanäle von A-D und A'-D'. A und C: Kontrolle ohne BFA, B und D: + BFA.

Gelbe Färbung zeigt eine Kolokalisation an. Balken: 10 µm

Das Makrolidantibiotikum BrefeldinA (BFA) führt zu einer Vesikulierung des Golgi-Apparates und zur Verschmelzung dieses Kompartimentes mit dem ER [172, 173]. Nach vierstündiger Inkubation von NSM-GFP transfizierten Zellen mit BFA (5 µg/ml) konnte keine Änderung der NSM-GFP Fluoreszenz festgestellt werden. Ebenso war bei konfokaler Immunfluoreszenzanalyse die Kolokalisation mit dem ER Marker BiP unverändert. Die partielle Kolokalisation mit dem Golgi Marker 58K war nach BFA Inkubation nicht mehr nachweisbar (Abb. 19).

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse ist eine Lokalisation des überexprimierten Proteins an der Plasmamembran auszuschließen.

Alle Versuche, die Lokalisation des endogenen nSMase-Proteins in primären Zellen (Neuronen- bzw. Oligodendrozytenkulturen) sowie in verschiedenen Zelllinien oder an Kryobzw. Paraffinschnitten verschiedener Organe aus *wt* Mäusen immunocytochemisch nachzuweisen scheiterten an der zu geringen Proteinmenge.

3.4 Klonierung und Charakterisierung des murinen nSMase Gens

Für *gene targeting* Experimente ist es notwendig, den Genlocus, die Genstruktur und die flankierenden Regionen des Gens zu kennen. Dazu werden genomische Klone aus Cosmid- oder Phagenbibliotheken isoliert, subkloniert und durch Restriktionsspaltung und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden und cDNA-Fragmenten näher charakterisiert. Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die cDNA-Sequenzen der nSMase von Maus und Mensch bekannt [118], so daß zuerst das murine Gen und seine flankierenden Bereiche isoliert werden mußten.

Zur Isolierung des murinen nSMase Gens wurde eine genomische λ -Phagen Bibliothek (Lambda FIX II, Mouse 129/SvEvTacfBR, Stratagene) verwendet. In einem *plaque lifting* Ansatz wurden ca. 500.000 Phagen der genomischen Bank mit einem 770 bp HindIII cDNA-Fragment aus dem 5'-Bereich der cDNA durchsucht. Dies führte zur Isolierung von sechs Klonen, von denen zwei (λ -mNSM1 und λ -mNSM3) unterschiedliche Restriktionsenzym-spaltungsmuster zeigten. Hybridisierung mit dem Oligonukleotid ATG-Nco-sense zeigte, daß beide Phagenklone das Startcodon enthielten.

Durch *shotgun* Klonierung der Restriktionsfragmente nach XbaI- bzw. SstI Spaltung in den Vektor pBluescriptSK+ wurden drei überlappende Subklone erhalten (λ -mNSM-1/8 kb SstI, λ -mNSM-3/4.5 kb SstI und λ -mNSM-3/8 kb XbaI). Durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden ATG-Nco-sense und NotI-TM-antisense zeigte sich, daß auf dem Klon λ mNSM-3/4.5 kb SstI das gesamte Gen lokalisiert ist. Durch Einzel-, und Doppelrestriktionen mit verschiedenen Restriktionsenzymen und durch weitere Subklonierungen und Hybridisierung mit der cDNA-Sonde bzw. Oligonukleotiden konnte die Genstruktur aufgeklärt und eine Restriktionskarte für das Gen und dessen flankierende Bereiche erstellt werden. Das gesamte Gen ist auf Klon λ mNSM-3 / 4.5 kb SstI enthalten, jeweils ca. 4 kb flankierender Bereich sind in 5'- und 3'-Richtung durch die beiden überlappenden Klone λ -mNSM-1/8 kb SstI bzw. λ -mNSM-3/8 kb XbaI vorhanden (Abb. 20). Durch sukzessive Sequenzierung wurde schließlich die gesamte Gensequenz aufgeklärt (siehe Anhang), die Sequenzen der Exon-Intron Übergänge stimmen mit den Kosensussequenzen überein. Das Gen erstreckt sich über ca. 3.3 kb und ist in 10 Exons aufgeteilt. Diese haben eine Länge von 77 bp (Exon III) bis 447 bp (Exon X). Die Introns haben eine Länge zwischen 78 bp (IntronVII) und 421 bp (Intron I).

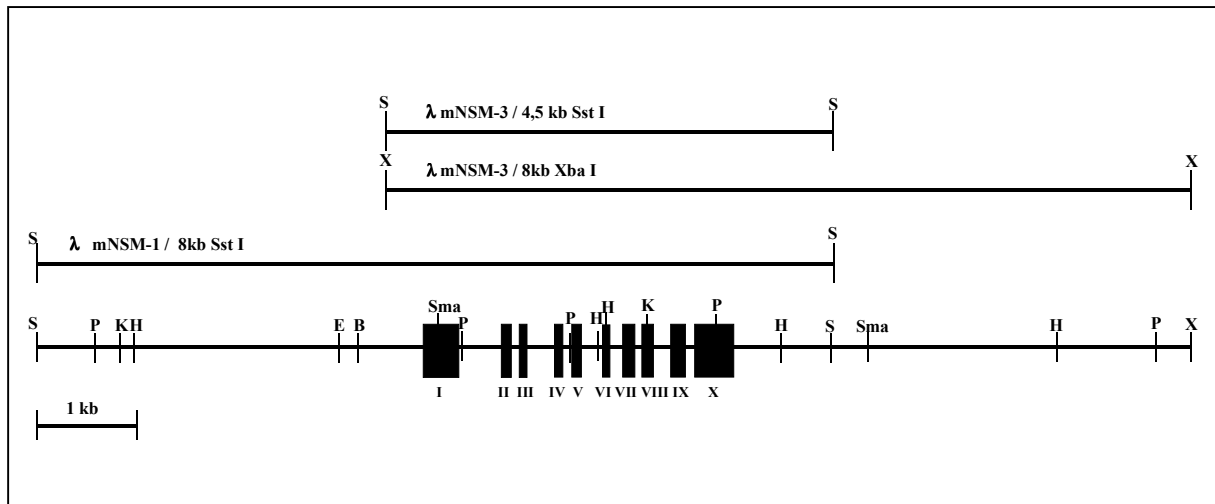


Abb. 20 Restriktionskarte des murinen *nsmase* Gens.

Angegeben sind die drei Phagensubklone, die wichtigsten Restriktionsschnittstellen und die Genstruktur. Die römischen Ziffern bezeichnen die Exons. B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; K, KpnI; Pst, PstI; Sma, SmaI; S, SstI, X, XbaI.

Durch die Sequenzanalyse wurden die für die katalytische Aktivität wichtigen Aminosäurereste den entsprechenden Exons zugeordnet. Diese Informationen sind für *gene targeting* Experimente notwendig, da nach erfolgter homologer Rekombination keine Polypeptide mit enzymatischen Restaktivitäten oder Peptidfragmente, die in die Membran integrieren und für den Organismus toxisch sein können, synthetisiert werden sollten. Aus *in vitro* Experimenten war bekannt, daß der Austausch jeder einzelnen der für die Katalyse wichtigen Aminosäuren, bzw. die Deletion einer oder beider Transmembrandomänen des nSMase Proteins zu einem vollständigem Aktivitätsverlust führt [118]. Eine wichtige Voraussetzung für die Konstruktion eines *targeting* Vektors ist zu überprüfen, ob durch Deletion nur eines Exons trotzdem ein Protein synthetisiert werden kann, d.h. die anderen Exons im richtigen Leseraster (*in frame*) gespleißt werden können, oder ob es zu einem Abbruch der Translation nach Verschiebung des Leserasters kommt.

Exon I codiert für den 5'-untranslatierten Bereich und das Startcodon (ATG). Die weiteren für die enzymatische Aktivität wichtigen Aminosäuren sind in Exon II (E49, Mg²⁺-bindendes Glutamat), Exon VII (N180, in die Substratbindung involviertes Asparagin) und Exon IX (H272, katalytische Base) codiert. In Exon X sind die beiden Transmembrandomänen codiert. Abbildung 21 zeigt die Exonstruktur auf cDNA, und Proteinebene.

1 GTGCTGGTGGGAAGCCGAGCCGGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGGMCGCGGTGCGGAGAAC
 61 CCACCGAAGGACCTAAGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCCTTCCAGGACTGCCGGC
 121 GGCCTCGCGCAGCCCGGGATTTGCAGCCGACCTTCTTTCCGGGTGGAAGGACGGCC
 181 TTTGTCCCAGTAACGCAGGAGTAGCCCCACCCCCAACCCAGCTCGCGTTTCTGGGTGCG
 241 GGCAGCGCAGGACAGGGCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCCTCGCCGCCCTTGCTCCG
 301 AAGCACTCCAGCCATGAAGCTCAACTTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTTCAATCTCAACTG
 M K L N F S L R L R V F N L N C
 i | ii
 361 CTG|GGACATCCCCTACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTT
 W | D I P Y L S K H R A D R M K R L G D F
 ii | iii
 421 TCTGAACTTGGA^{AA}ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAG|GTGTGGAGTGAGCAGGACTT
 L N L E N F D L A L L E **E** | V W S E Q D F
 iii | iv
 481 CCAGTACCTAAGGCAAAGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTCAGAAG|CGG
 Q Y L R Q R L S L T Y P D A H Y F R S | G
 541 GATGATAGGCAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCCAAACACCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCA
 M I G S G L C V F S K H P I Q E I F Q H
 iv | v
 601 TGTCTACAGTCTGAATGGTTACCCCTACATG|TTCCATCATGGAGACTGGTTCTGTGGGAA
 V Y S L N G Y P Y M | F H H G D W F C G K
 661 GTCTGTGGGGCTGCTGGTGTCTCCGTCTAAGTGGACTGGTGTCTCAATGCCTACGTGACTCA
 S V G L L V L R L S G L V L N A Y V T H
 v | vi
 721 T|CTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTGCACACCGTGTGGCCCAAGC
 | L H A E Y S R Q K D I Y F A H R V A Q A
 vi | vii
 781 TTGGGAACTGGCCAGTTCATCCCA|CCACACATCCAAGAATGCAGATGTGGTTCTATTGTG
 W E L A Q F I H | H T S K N A D V V L L C
 841 TGGAGACCTCCAATATGCACCCCAAAGACCTGGGCTGCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGG
 G D L **N** M H P K D L G C C L L K E W T G
 vii | viii
 901 GCTCCATGATGCTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTAAG|GGCTCTGATGATGGCTGTACCAT
 L H D A F V E T E D F K | G S D D G C T M
 961 GGTACCCAAGAACTGCTACGTACGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTCCGTCTGGTATCCG
 V P K N C Y V S Q Q D L G P F P S G I R
 viii | ix
 1021 GATTGATTACGTGCTTTACAAG|GCAGTCTCTGAGTTCCACGTCTGCTGTGAGACTCTGAA
 I D Y V L Y K | A V S E F H V C C E T L K
 1081 AACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTGACAAGCCCTTCTCTGATCACGAGGCCCTCAT
 T T T G C D P H S D K P F S D **H** E A L M
 ix | x
 1141 GGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCCTCAGGAAGACCCCTGTACTGCCTGTG|GCC
 A T L Y V K H S P P Q E D P C T A C G | P
 1201 ACTGGAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGTAAAGGGAGGCcAGGACAGAGCTGGGGCTAGG
 L E R S D L I S V L R E A R T E L G L G
 1261 CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGGCTGTC
 I A K A R W W A A F S G Y V I V W G L S
 1321 CCTTCTGGTGTGCTGTGTGTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
 L L V L L C V L A A G E E A R E V A I I
 1381 CCTCTGCATACCCAGTGTGGGCTGGTGGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTTCTCCACAA
 L C I P S V G L V L V A G A V Y L F A V H K
 1441 GCAGGAGCCAAGGGCTTATGTGGGCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
 Q E A K G L C R A Q A E M L H V L T R E
 1501 AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGCAGCAGGAGGG
 T E T Q D R G S E P H L A Y C L Q Q E G
 1561 GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAAACTTGCTTGACACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 D R A **stop** poly A Signal

Abb. 21 (vorherige Seite) Darstellung der Genstruktur auf cDNA- und Proteinebene.

Angegeben ist die Nukleotidsequenz der cDNA und die Proteinsequenz im Einbuchstaben-Code. Startcodon, Stopcodon, sowie die Codons für die an der Katalyse beteiligte Aminosäuren Glutamat 49, Asparagin 180 und Histidin 272 sind fett und unterstrichen hervorgehoben. Die an den Transmembrandomänen beteiligten Aminosäurereste sind fett hervorgehoben. Exongrenzen sind grau unterlegt. Das Polyadenylierungssignal ist fett und kursiv gedruckt.

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts des nSMase Gens wurde eine *primer extension* Analyse durchgeführt. Dafür wird mRNA mit endständig radioaktiv markierten Oligonukleotiden, deren Sequenz komplementär zum 5'-Bereich des Gens ist, hybridisiert und mittels reverser Transkription in *antisense* Richtung bis zum Transkriptbeginn verlängert. Die Fragmentgrößen der Produkte werden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Sequenz-Vergleich mit einer Sequenzierungsreaktion mit demselben Oligonukleotid zugeordnet und damit der Transkriptionsstart festgelegt.

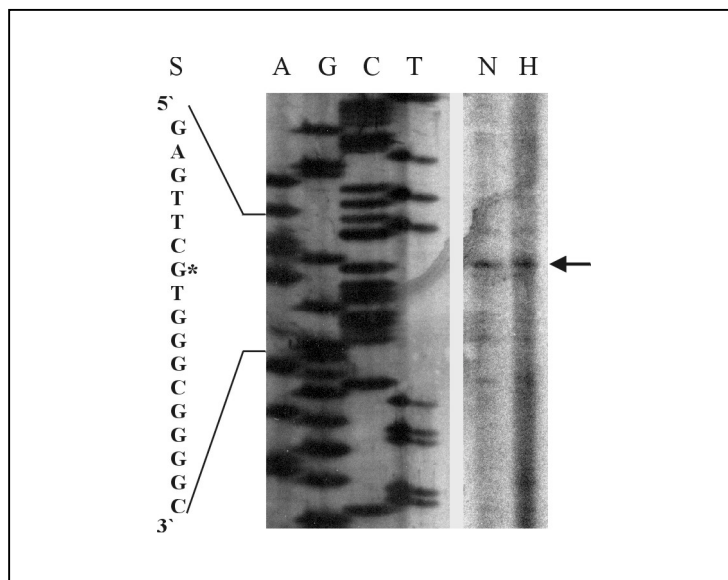


Abb. 22 Primer extension Analyse aus Hirn und Nieren mRNA.

Der Pfeil zeigt das *primer extension* Produkt. Der Vergleich mit der Sequenzleiter (A,G,C,T) erlaubt die genaue Zuordnung des Transkriptionsstartes. Das mit einem Stern gekennzeichnete Nukleotid entspricht dem Transkriptionsstart. s, Sequenz des *sense* Stranges. N, Niere; H, Hirn

Die Autoradiographie wurde einen Tag (Sequenzierungsreaktion) bzw. sieben Tage exponiert.

Es wurden je 5 µg mRNA aus Hirn und Niere mit dem am 5'-Ende radioaktiv markiertem Oligonukleotid 5'UT-*antisense*, dessen 3'-Ende 267 bp vor dem Translationsstart (ATG) liegt, hybridisiert. Nach reverser Transkription wurden die Reaktionsprodukte auf einem 5%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 22). Das erhaltene Produkt liegt nach Vergleich mit der Sequenzierungsreaktion sowohl im Hirn als auch in der Niere in Position – 343 zum Translationsstart.

Durch Sequenzierung wurden ebenfalls Informationen über den

Promoterbereich des Gens erhalten. Der Promoter enthält keine TATA-Box und die identifizierten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen deuten auf ein *housekeeping* Gen hin [174].

3.5 Klonierung des humanen nSMase Gens und Bestimmung der Chromosomenlokalisierung

Durch *screening* einer humanen genomischen Leukozyten Phagenbank (HL1111j, Clontech) mit der gesamten humanen nSMase cDNA [118] wurden zwei Klone (hNSM-#3 und hNSM-#5) isoliert, die das gleiche Restriktionsspaltungsmuster zeigten. Sequenzierungen mit den Primern hNSM-H272N as, hNSM-humII, hNSM-N180H und hNSM-SacII zeigten das auf den Klonen die ersten 663 bp des 5`Endes des Gens fehlen.

Im weiteren wurde versucht das *hnsase* Gen durch PCR zu amplifizieren. Dabei war es nicht möglich ein PCR-Fragment direkt aus der Phagenbank zu amplifizieren. Aus genomischer Leber DNA wurde mit dem Primerpaar hNSM-SacII und hNSM3`as ein ca. 3 kb großes Fragment isoliert, in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Das humane Gen besteht analog zum Maus Gen aus zehn Exons. Die Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

Der Chromosomenloкус wurde von M. Stoffel in zwei unabhängigen Verfahren bestimmt.

Für die primer-spezifische PCR Amplifikation von monochromosomalen somatischen Zellhybriden wurde mit den Primern Intron 5` (lokalisiert in Intron VIII) und hNSM3`as (ExonX) ein spezifisches 700bp Fragment, das nur aus humaner DNA, nicht aber aus Maus DNA amplifiziert werden kann, eindeutig dem Chromosom 6 zugeordnet.

Die genauere Lokalisierung erfolgte durch *fluorescence in situ hybridisation* (FISH). Dafür diente der biotinylierte Phagenklon hNSM-#3 als Sonde zur Hybridisierung von elongierten Metaphasechromosomen, die aus Phythemagglutinin stimulierten Lymphozyten isoliert worden sind. Als genauer Lokus wurde Chromosom 6, Bande q 23 bestimmt. Dieser Chromosomenregion wurden bis jetzt noch keine Gene für humane Erkrankungen zugeordnet.

3.6 Generierung einer nSMase defizienten Mauslinie

3.6.1 Klonierungsstrategie für *replacement* Vektoren zur Inaktivierung des nSMase Gens

Die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus ermöglicht die gezielte Mutagenese eines Genlokus. Dabei werden endogene Sequenzen durch homologe, aber veränderte exogene Sequenzen ausgetauscht. Je nach verwendetem Konstrukt kann man so ein Gen inaktivieren (null-Mutation), Punktmutationen oder Deletionen einführen. Diese durch *in vitro*-Transfektion eingeführten Veränderungen können im Tiermodell untersucht und somit die *in vivo* Funktion eines Proteins aufgeklärt werden.

Zur Inaktivierung des nSMase Gens wurde ein linearisierter *replacement* Vektor verwendet, der durch Elektroporation in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht wurde. Da ein homologes Rekombinationsereignis im Vergleich zur zufälligen Integration an einem anderen Locus (der heterologen Rekombination) sehr selten ist, enthalten *targeting* Vektoren zwei Selektionsmarker zur Anreicherung homolog rekombinierter Klone (positiv-negativ-Selektion). Als positiver Selektionsmarker wurde das Neomycin-Phosphotransferase (*neo*)-Gen in die kodierende Sequenz des nSMase-Gens inseriert. Um die Wahrscheinlichkeit der Integration des *neo*-Gens bei einem homologen Rekombinationsereignis zu erhöhen, sollte es von mindestens 2 kb homologer Sequenz umgeben sein [175]. Das *neo*-Gen vermittelt Resistenz gegen das Neomycin-Analogon G418, so daß nur ES Zellen die den *targeting* Vektor integriert haben, unter G418 Selektion überleben.

Als negativer Selektionsmarker wurde das Thymidinkinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus (HSV-*tk*) an den Rand der homologen Sequenz eingeführt, so daß es bei einer heterologen Rekombination in das Wirtsgenom eingebaut wird. Die HSV-Thymidin-Kinase phosphoryliert Guanosinanaloga wie Gancyclovir (GanC). Durch Zugabe von GanC zum Medium wird dieses Nukleotidanaloga bei der DNA-Synthese eingebaut, was zu einem Abbruch der Replikation und damit zum Absterben der heterolog rekombinierten ES-Zellen führt. Diese positiv-negativ Selektion führt zu einer Anreicherung homolog rekombinierter ES-Zellklone [176].

Zum Nachweis eines homologen Rekombinationsereignisses verwendet man einen durch die Insertion der *neo*-Gens entstehenden Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), der mittels *Southern Blotting* und Hybridisierung mit einer außerhalb des Konstruktes

liegenden Sonde nachgewiesen werden kann. Weiterhin kann eine homologe Rekombination durch PCR nachgewiesen werden.

Die beschriebene Isolierung, sowie die Charakterisierung des murinen nSMase-Gens und seiner flankierenden Bereiche bildeten die Grundlage zur Generierung einer nSMase-defizienten Mauslinie durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen.

Zur Klonierung des *targeting* Vektors wurde der pPNT-Vektor als universeller Klonierungsvektor verwendet [177]. Dieser Vektor enthält bereits die beiden Selektionsmarker, die unter der Kontrolle des starken PGK-Promotors stehen, in gleicher Orientierung. Weiterhin sind einige singuläre Restriktionsschnittstellen vorhanden, die zur Klonierung genutzt wurden.

3.6.2 Klonierung der *targeting* Vektoren

Es wurde ein Vektor konstruiert, der das Gen beginnend vor der codierenden Sequenz von Exon I bis zur KpnI Schnittstelle in Exon VIII durch das *neo*-Gens ersetzt. Dadurch wurden das Startcodon und die katalytisch wichtigen Aminosäuren Glutamat 49 und Asparagin 180 deletiert. Das *tk*-Gen wurde 3'-wärts der SmaI Schnittstelle im 3'-*upstream* Bereich des Gens insertiert. Als 5'-homologer Bereich wurde die gesamte vorhandene Sequenz des Phagenklons λ -mNSM1-8kb SstI verwendet (siehe Abb. 20). Durch Einführung einer NotI-Restriktionsschnittstelle mittels PCR wurde eine Möglichkeit zur Linearisierung geschaffen. Die Restriktionsschnittstellen, die durch die Insertion des *neo*-Selektionsmarkers eingeführt werden, führen zu einem RFLP der Enzyme EcoRI und XbaI, die zum Nachweis der homologen Rekombination mit einer externen 3'-Sonde genutzt werden können. Abbildung 22 zeigt die Strategie zur Deletion des *nsmase*-Lokus.

Die Konstruktion des *targeting* Vektors erfolgte in den folgenden Schritten:

1. Klonierung des 2.2 kb KpnI/SmaI Fragmentes in die SpeI Schnittstelle von pBluescript II SK+.
2. Exzision des Fragmentes mit EcoRI/NotI und Klonierung in EcoRI/HindII von pPNT. Dabei wurden die NotI und die HindII Restriktionsschnittstellen zerstört.
3. Amplifikation des 3.8 kb 5'-Fragmentes durch PCR mit den Primern 5'-Not-sense und 3'-Xho- asense aus dem Phagensubklon λ -mNSM1-8 kb SstI und Klonierung in den pCR2.1 Vektor.

4. Exzision des Fragmentes mit den eingeführten Schnittstellen NotI und XhoI aus pCR2.1 und Ligation in den mit NotI/XhoI linearisierten pPNT.

Dieser Vektor, pNSM-neoTK, wurde als Vorstufe für die weiteren Klonierungen verwendet.

5. Freisetzung des 3'-Fragmentes mit XbaI und *blunt end* Klonierung in die BamHI Restriktionsschnittstelle von EcoRI-defizientem pPNT.

6. Aus diesem Vektor Freisetzung des 3'-Fragmentes mit XbaI/SstII und Ligation in XbaI/SmaI geschnittenen pNSMneoTK.

Das PCR-Produkt und die Zwischenstufen wurden durch Sequenzierung auf das Vorhandensein aller wichtigen Schnittstellen überprüft.

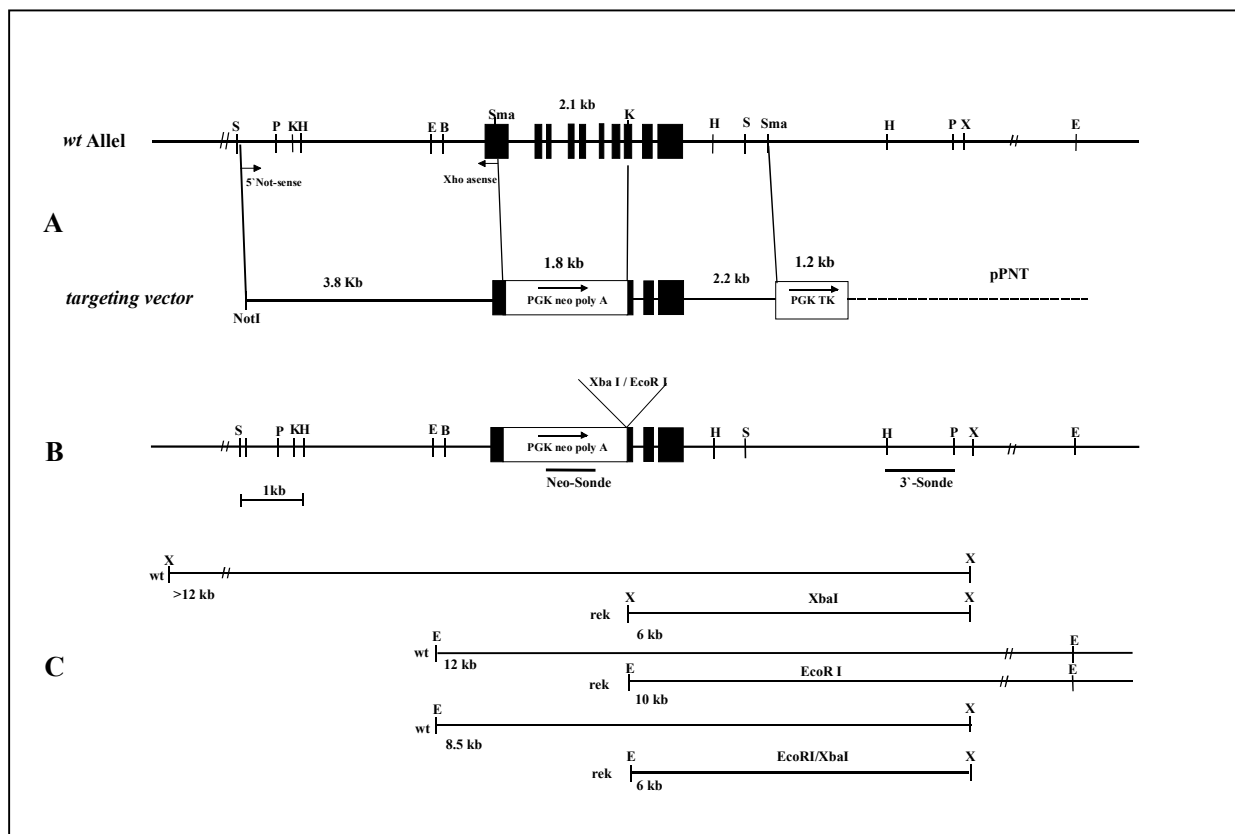


Abb. 23 Strategie zum gene targeting des *nsmase* Locus.

A, *nsmase* Locus und targeting Vektor pNSMneoTKII. Angegeben sind die notwendigen Restriktionsenzymchnittstellen, die Größe der einzelnen Fragmente, sowie die Position der Primer, die zur Amplifikation des 5'-Endes verwendet wurden.

B, Homolog rekombinierter Genlocus. Angegeben sind die eingefügten Schnittstellen, die externe 3'-Sonde für den Nachweis der homologen Rekombination und die interne *neo*-Sonde.

C, RFLP's, die zum Nachweis der homologen Rekombination verwendet wurden. Angegeben sind jeweils die Fragmentlängen, die durch die entsprechenden Restriktionsspaltung im Wildtyp (wt), bzw im homolog rekombinierten (rek) Locus erhalten werden. X, XbaI; E, EcoRI; E/X, EcoRI/XbaI.

Das resultierende Konstrukt pNSMneoTKII kann mit NotI linearisiert werden. Die eingebrachten EcoRI und XbaI Restriktionsschnittstellen in der *neo*-Box führen zu einem RFLP, der mit der externen 3'-Sonde und der internen *neo*-Sonde nachgewiesen werden kann (Abb. 23).

Ein weiterer Vektor (pNSMneoTKIII) wurde kloniert, um einen größeren homologen Bereich zur Rekombination zur Verfügung zu haben. Er unterscheidet sich vom Vektor pNSMneoTKII nur durch ein verlängertes 5'-Fragment, das bis ExonII reicht. Der verwendete Primer EII Xho-asense ist im ExonII lokalisiert, 30 bp vor dem Codon für Glutamat 49. Neben der XhoI-Schnittstelle wurde mit dem Primer auch ein Translations-Stopcodon eingeführt, somit sollte, falls Transkription und Translation erfolgen, nur ein Polypeptid von 38 Aminosäuren entstehen.

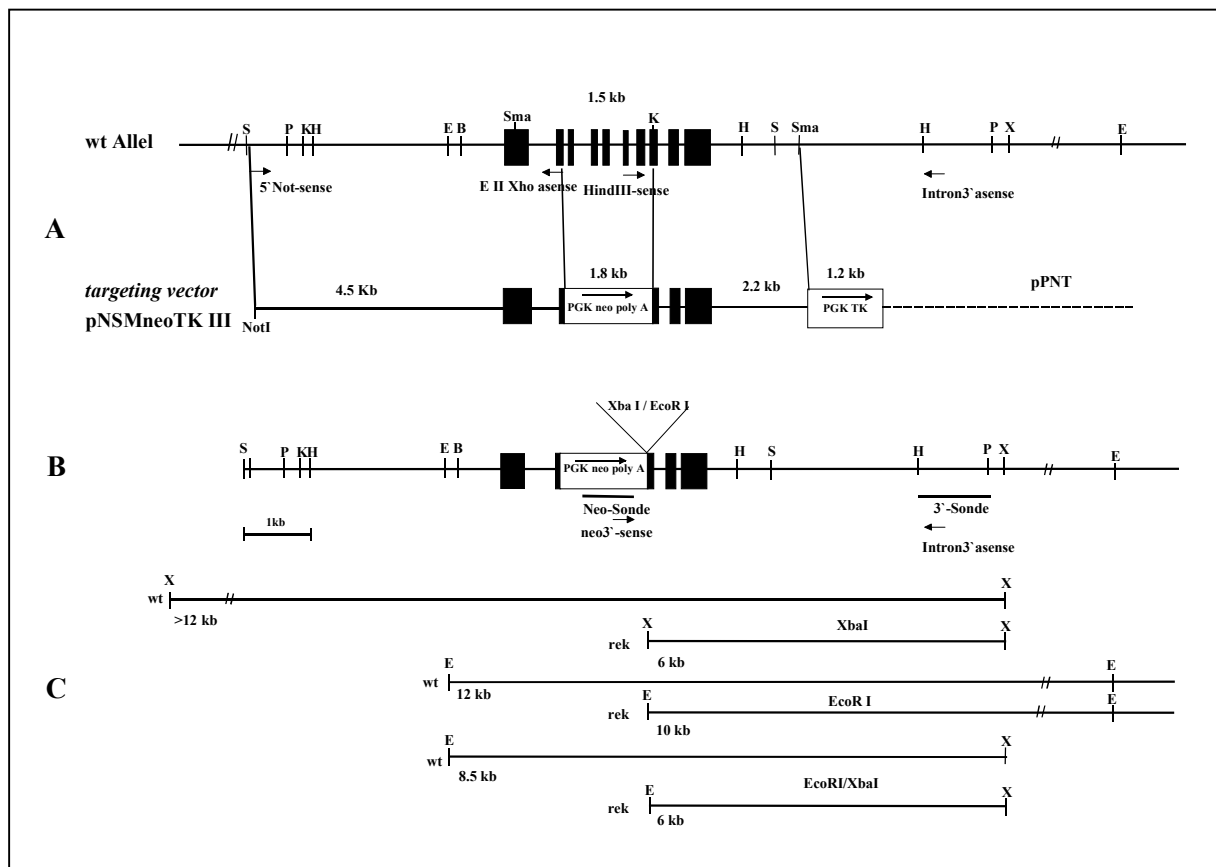


Abb. 24 Strategie zum gene targeting des *nsmase* Lokus.

A, *nsmase* Lokus und *targeting* Vektor pNSMneoTKIII mit den wichtigsten Restriktionsenzymsschnittstellen, der Größe der einzelnen Fragmente, sowie den Primerpositionen für die Klonierung des 5'-Fragmentes und den genomischen PCR Nachweis des *wt* Allels.

B, Homolog rekombinierter Genlokus mit den eingefügten Schnittstellen, der externen 3'-Sonde für den Nachweis der homologen Rekombination, der internen *neo*-Sonde und den Primerpositionen für den genomischen PCR Nachweis des homolog rekombinierten Allels.

C, RFLP's die zum Nachweis der homologen Rekombination verwendet wurden. Angegeben sind jeweils die Fragmentlängen die durch die entsprechenden Restriktionsspaltung im Wildtyp (*wt*), bzw im homolog rekombinierten Lokus (*rek*) erhalten werden. X, XbaI; E, EcoRI; E/X, EcoRI/XbaI

Ein Herausspleißen von Exon II bis Exon VIII sollte ebenfalls zu keinem funktionellen Protein führen, da Exon I und Exon IX nicht *in frame* sind und es damit zu einem Translationsstop nach 29 Aminosäuren kommt.

Durch PCR wurde mit den Primern 5'-Not-sense und EII-Xho-sense ein 4.5 kb großes Fragment aus dem Phagensubklon λ -mNSM1-8kb SstI amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor kloniert. Dieses Fragment wurde durch Sequenzierung charakterisiert und dann nach NotI/XhoI Restriktion gegen das 5'-Fragment aus pNSMneoTKII ausgetauscht.

Der Vektor pNSMneoTKIII kann mit NotI linearisiert werden. Neben dem Nachweis der homologen Rekombination mit den oben beschriebenen RFLP's für die Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI ist auch ein PCR-Nachweis möglich. Für das *wt*-Allel ergibt sich mit der Primerkombination HindIII-sense (lokalisiert in Exon VI) / Intron 3'-asense ein ca. 3.5 kb großes Fragment. Das homolog rekombinierte Allel wird mit der Primerkombination neo3'-sense / Intron 3'-asense als ca. 4 kb großes Fragment nachgewiesen (Abb. 24).

3.6.3 Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell Klone

Zur Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone wurden die ES Zelllinien R1 (129/J x 129/Sv-CP), CJ7 (129/SvJ) und MPI-II (129Sv) verwendet [178-180]. Um eine vorzeitige Differenzierung zu verhindern, erfolgte die Kultivierung der ES-Zellen auf einer Schicht Mitose-inaktivierter embryonaler Fibroblasten unter Zugabe von LIF (*leukemia inhibitory factor*) [137]. Die Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert. Dafür wurden 20-40 μ g des mit NotI linearisierten *targeting* Konstruktes eingesetzt und ca. 2×10^7 exponentiell wachsende ES-Zellen mit 500 μ F und 180-250 V elektroporiert. 24 Stunden später wurden die Zellen für 7 Tage der positiv-negativ-Selektion mit 400 μ g/ml G418 und 5×10^4 μ g/ml GanC ausgesetzt. Bei den durchgeführten Elektroporationen wurden G418-Kontrollplatten mit transfizierten und nicht-transfizierten Zellen angelegt. Während die nicht-transfizierten Zellen als Kontrolle der Effizienz der G418-Selektion dienten, wurde anhand der G418-resistenten Klone die Anreicherung durch die positiv/negativ Selektion ermittelt. Nach Beendigung der Selektion wurden die ES-Zellklone isoliert und expandiert. Ein Teil der Zellen wurde eingefroren, der andere Teil für die Präparation von genomischer DNA verwendet.

Obwohl mit beiden *targeting* Vektoren pNSMneoTKII und pNSMneoTKIII hohe Anreicherungsfaktoren erzielt wurden (zwischen 15 und 30-fach), wurden aus insgesamt 2327 analysierten ES-Zell Klonen nur 3 homolog rekombinierte Klone isoliert. Alle Klone stammten aus der ES-Zelllinie CJ7 (Tabelle 1). Alle Versuche, durch Veränderung der Elektroporationsbedingungen und des Reinheitsgrades der transfizierten DNA, die Effizienz der homologen Rekombination zu verbessern, hatten keinen Erfolg.

ES-Zelllinie	Konstrukt	Anzahl der Elektroporationen	Anzahl der analysierten Klone	Homolog rekombinierte ES Zell Klone (Bezeichnung)
R1	pNSMneoTKII	10	829	-
CJ7		9	452	2 (V/71, XX/26)
MPI-II		4	78	-
R1	pNSMneoTKIII	6	336	-
CJ7		13	528	1 (VIII/25)
MPI-II		5	104	-
		Σ 47	Σ 2327	Σ 3

Tabelle 1 Zusammenfassung der Elektroporationen der ES Zelllinien R1, CJ7 und MPI-II mit den beiden *targeting* Konstrukten.

Zum Nachweis der homologen Rekombination wurde die genomische DNA der Klone mit dem Restriktionsenzym XbaI oder der Kombination EcoRI / XbaI geschnitten.

Die *Southern Blot*-Analyse mit der externen 3'-Sonde zeigt ein über 12 kb großes Fragment bzw. ein 8.5 kb großes *wt*-Fragment und jeweils ein 6 kb großes Fragment für ein homologes Rekombinationsereignis mit beiden Konstrukten. Rehybridisierung der *Blots* mit der *neo*-spezifischen Sonde zeigte ein über 8 kb großes Fragment für die XbaI Restriktion und ein 3 kb (pNSMneoTKII) bzw. 4 kb großes Fragment (pNSMneoTKIII) für die Doppelrestriktionen.

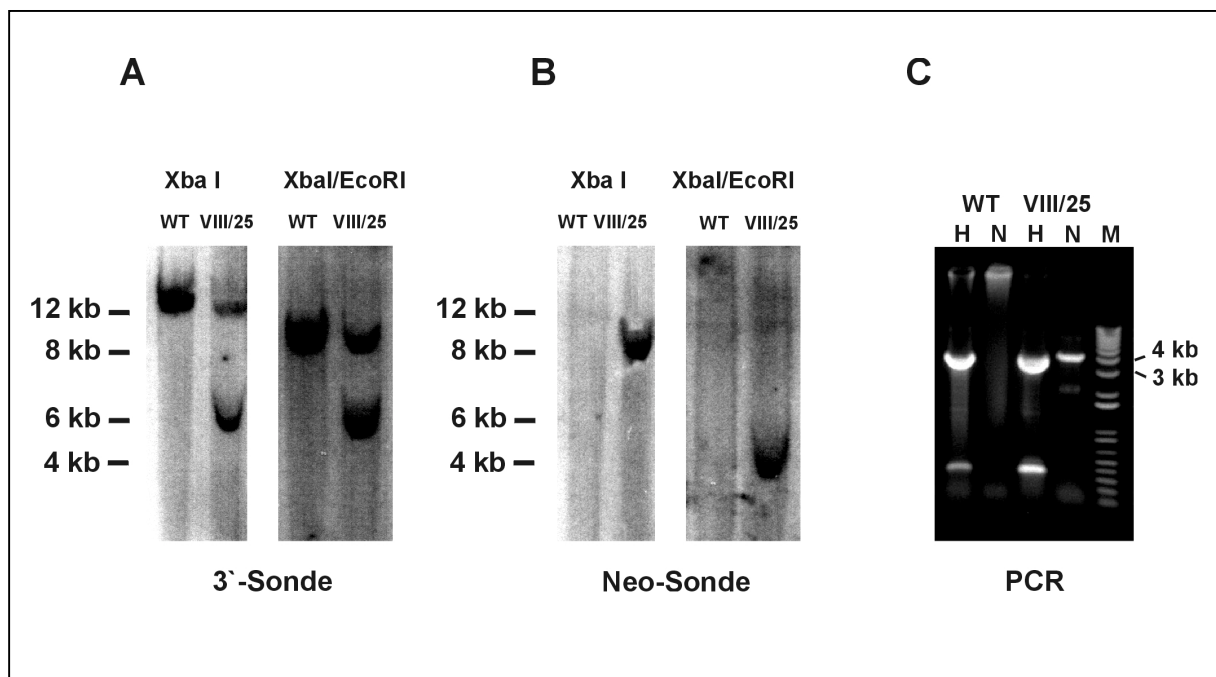


Abb. 25 Nachweis der homologen Rekombination am Beispiel von Klon VIII/25.

A, *Southern Blot*-Analyse von genomischer DNA nach XbaI bzw. XbaI/EcoRI Restriktion. Hybridisierung mit der 3'-Sonde. B, Rehybridisierung von A mit der *neo*-Sonde. C, PCR-Nachweis der homologen Rekombination mit der Primerkombination HindIII_{sense} / Intron3'-*asense* (H), bzw. *neo*3'-*sense* / Intron3'-*asense* (N). M: 1kb Plus Marker.

Als weiterer Nachweis wurde durch PCR mit dem Primerpaar HindIII_{sense} / Intron3_{asense} ein ca. 3.5 kb großes *wt*-Fragment und mit dem Primerpaar neo3_{'-sense} / Intron3_{asense} ein für die homologe Rekombination spezifisches ca. 4 kb großes Fragment amplifiziert (Abb. 25).

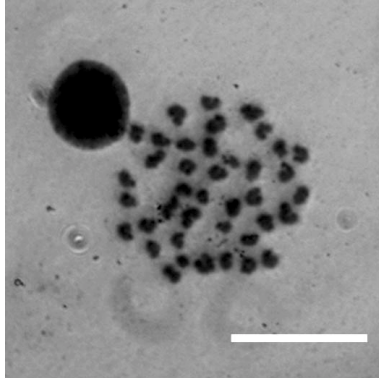


Abb. 26 Karyogramm des ES Zell Klons VIII/25.

Der Klon enthält die korrekte Anzahl von 40 Chromosomen.

Balken, 5µm

Bei *gene targeting* Experimenten sind die ES-Zellen durch die Elektroporation, die lange Kultivierung, sowie den damit verbundenen Einfrier- und Auftauvorgängen erhöhtem Stress ausgesetzt, aufgrund dessen es zu chromosomalen Veränderungen kommen kann. Dabei handelt es sich häufig um Mono- oder Trisomien, Aneuploidien die die Integration der ES-Zellen in die Keimbahn der manipulierten Embryonen verhindern [181].

Vor der Injektion der homolog rekombinierten ES-Zell-Klone in Blastozysten wurden daher die embryonalen Stammzellen auf ihre Euploidie überprüft. Für die Karyotypisierung wurden die ES-Zellen osmotisch lysiert und nach Anfärbung mit

Giemsa-Färbelösung die Chromosomensätze mikroskopisch ausgezählt (Abb. 26). Alle drei homolog rekombinierten ES-Zell Klone zeigten einen normalen Chromosomensatz.

3.6.4 Blastozysteninjektion und Rückkreuzungsexperimente

Die drei homolog rekombinierten ES Zell Klone wurden zur Injektion in Blastozysten verwendet. Blastozysten wurden am Tag 3.5 p.c. aus C57/Bl6 und CD1 Mäusen isoliert und 10-20 ES Zellen mit Hilfe einer Mikroinjektionsapparatur möglichst auf der inneren Zellmasse der Blastozyste abgelegt. Nach mindestens einer Stunde im Brutschrank wurden 6-12 Blastozysten in ein Uterushorn einer scheinchwangeren (Tag 2.5 p.c.) CD1 Maus reimplantiert. Der Chimaritätsgrad der aus diesen Experimenten hervorgegangenen Nachkommen wurde anhand des Agouti Fellmarkers, der von den ES Zellen weitergegeben wird, bestimmt. Die Keimbahnchimarität der Böcke wurde durch Rückkreuzung mit Weibchen des Stammes, der auch als Blastozystenspender verwendet worden war, getestet. Nur der Klon VIII/25 führte zu keimbahnchimären Tieren. Diese vier Männchen zeigten eine Keimbahn-Transmission zwischen 0.3 % und 3.3 % (Tabelle 2).

ES Zell Klon	Blastozysten-spender	Anzahl reimplantierter Blastozysten	Nachkommen	Chimäre Männchen	Keimbahn-chimäre Männchen
V/71	CD1	354	29	14	-
XX/26	CD1	154	21	7	-
	C57/Bl6	141	17	2	-
VIII/25	CD1	307	32	12	-
	C57/Bl6	131	17	11	4

Tabelle 2 Zusammenfassung der Injektionsexperimente.

Der Genotyp der F1 Generation wurde analog zur Genotypisierung der ES-Zell Klone mittels *Southern Blot* und PCR aus genomischer DNA, gewonnen aus Schwanzspitzenbiopsien, bestimmt. Von den 9 agoutifarbenen Nachkommen der chimären Böcke zeigten 5 Heterozygotie. Diese wurden mit C57/Bl6 Wildtyp (+/+) Mäusen verpaart und die Nachkommen der F2 Generation wieder zurückgekreuzt, so daß hetero- (+/-), und homozygote (-/-) Tiere erhalten wurden. Abbildung 27 zeigt die Genotypisierung der F3 Generation.

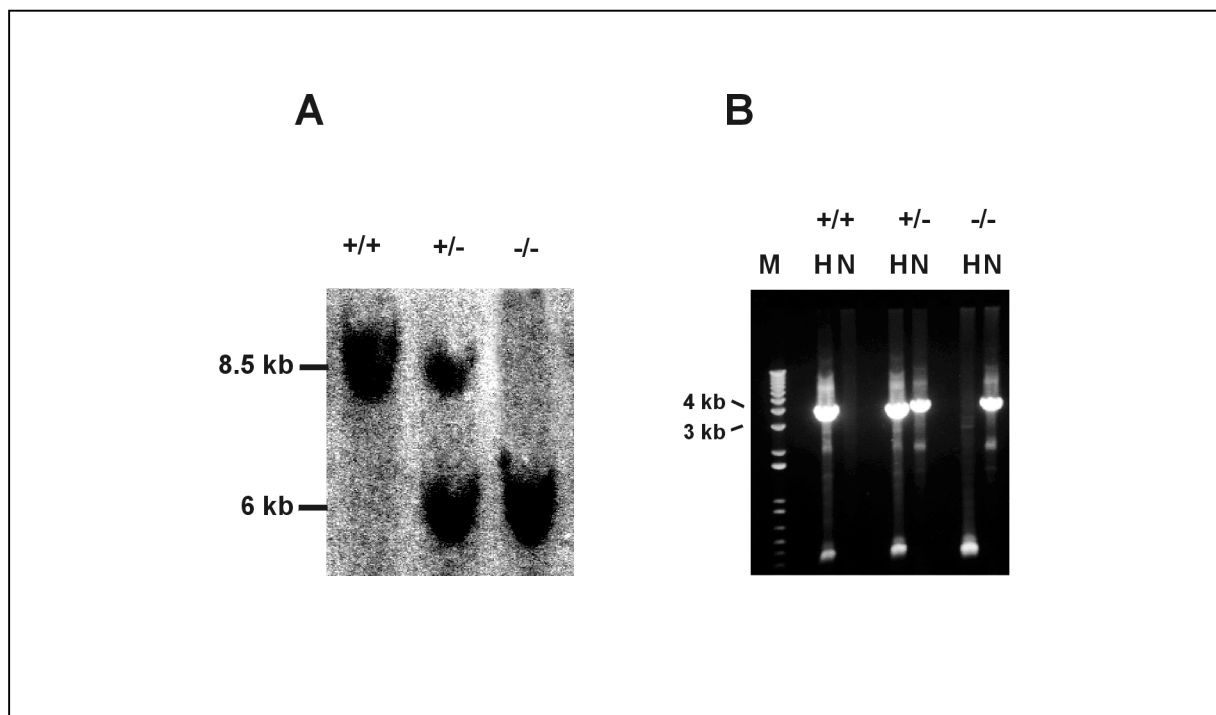


Abb. 27 Genotypisierung von wildtyp $nsmase^{(+/+)}$, heterozygoten $nsmase^{(+/-)}$ und homozygoten $nsmase^{(-/-)}$ Mäusen.

A, *Southern Blot* Analyse nach XbaI / EcoRI Restriktion und Hybridisierung mit der externen 3`-Sonde. B, PCR Analyse mit den Primerkombinationen HindIII-sense/Intron3`-asense (H), bzw. neo3`-sense/Intron3`-asense (N). M: 1kb-Plus Marker.

3.7 Analyse des nSMase defizienten Phänotyps

Die genotypische Verteilung der Nachkommen der F2 Generation gehorcht den Mendel'schen Regeln. Somit kann eine letal verlaufende Embryonalentwicklung bei *nsmase*^(-/-)-Tieren ausgeschlossen werden.

Homozygote Tiere entwickeln sich wie heterozygote oder Wildtyp Tiere. Sie sind fertil und auch nach einer Lebensspanne von 7 Monaten phänotypisch unauffällig.

Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen des nSMase defizienten Phänotyps wurden Tiere desselben Geschlechtes verwendet, die aus gleichen Würfen heterozygoter Verpaarungen stammten.

3.7.1 RNA-Analyse

Die 1.6 kb große nSMase mRNA wird im Wildtyp ubiquitär exprimiert, wobei die höchste Expression in der Niere zu finden ist. Die Insertion der *neo*-Box in den nSMase Genlokus sollte zu einer null-Mutation des nSMase Gens führen.

Obwohl die Integration der *neo*-Box in ein Gen zum Abbruch der Transkription führen sollte, wurde bei der Generierung transgener Mäuse häufig das Auftreten chimärer RNAs beobachtet. Diese entstehen aus aberrant gespleißten Transkripten, oder aus einem *read through* durch den Selektionsmarker [182-184].

3.7.1.1 Northern Blot Hybridisierungsanalyse

RNA wurde aus Niere, Leber und Gehirn von 6 Wochen alten *wt*-, *nsmase*^(+/-)- und *nsmase*^(-/-)-Mäusen isoliert. Die gesamte aus 500 µg Nieren-RNA, 400 µg Hirn-RNA und 1 mg Leber-RNA erhaltene polyA-RNA wurde in der *Northern Blot* Hybridisierungsanalyse mit einem 770 bp HindIII Fragment aus dem 5'-Bereich der cDNA (ExonI-ExonVI) hybridisiert. In allen drei Organen ist im Wildtyp ein spezifisches, ca. 1.6 kb großes Signal zu erkennen. In den *nsmase*^(-/-)-Mäusen ist dieses Signal nicht mehr nachweisbar, während *nsmase*^(+/-)-Mäuse eine um ca. 50 % verringerte Expression aufweisen. Die Rehybridisierung des *Blots* mit einem 350 bp β-Aktin Fragment als interne Kontrolle zeigt, daß gleiche Mengen an mRNA aufgetragen wurden (Abb. 28).

Vor allen in der Niere, aber auch in den anderen Organen waren in hetero- und homozygoten Tieren neue Transkripte sichtbar. Diese sind deutlich größer als das nSMase Transkript. Zusätzlich war in der Niere aber auch ein kleineres Signal zu erkennen. Dieses kleinere Signal wurde bei einer Rehybridisierung des *Blots* mit einem 700 bp Fragment aus dem kodierenden

Bereich der *neo*-Box deutlicher, wie auch mindestens vier größere Transkripte. Nur in der Leber war die ca. 700 bp lange *neo* mRNA detektierbar. Von diesem Organ wurde die doppelte Menge an RNA eingesetzt.

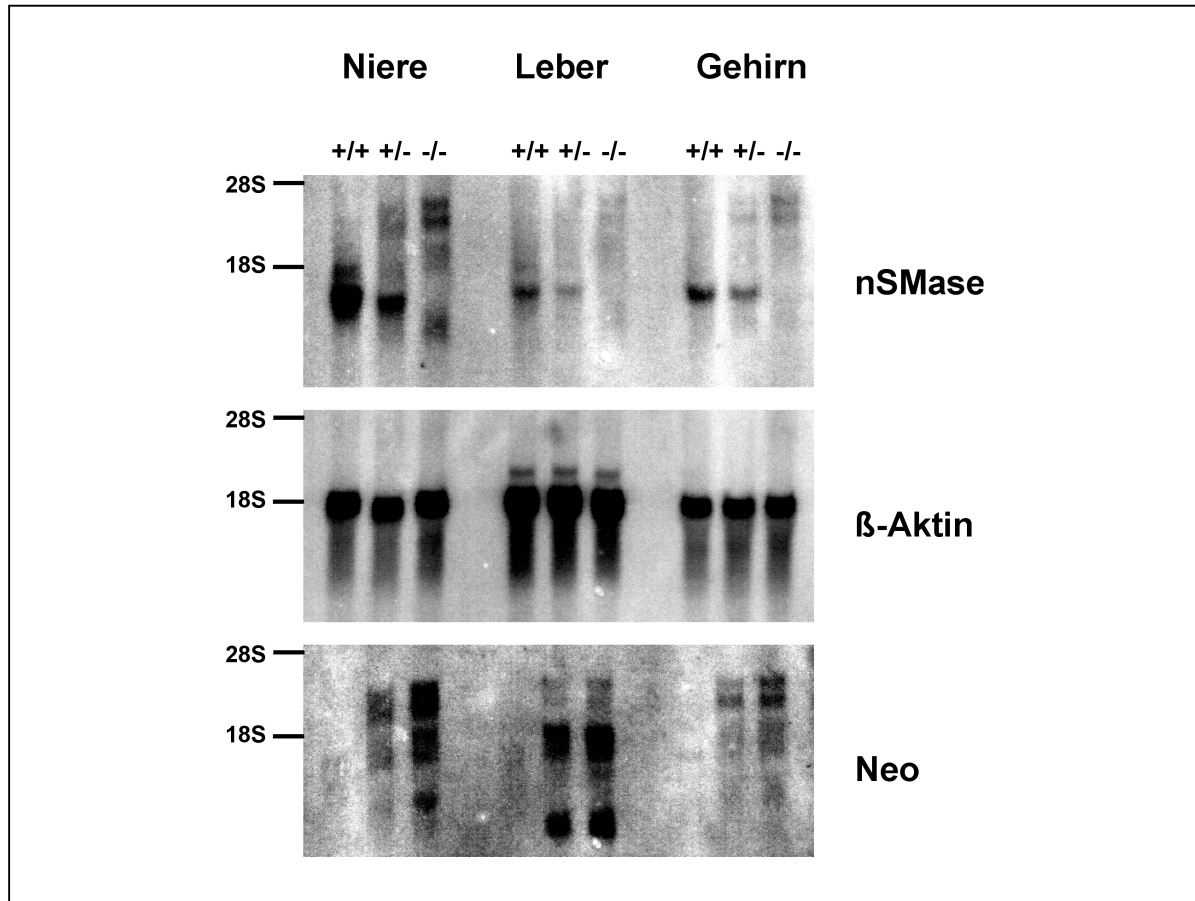


Abb. 28 Northern Blot Hybridisierungsanalyse der nSMase Expression in verschiedenen Geweben.

PolyA-RNA wurde aus den Organen der verschiedenen Genotypen präpariert und nach Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel auf eine *GenescreenPlus*-Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem radioaktiv markierten 770 bp HindIII Fragment der nSMase cDNA. Die Membran wurde danach mit einem 350 bp β-Aktin Fragment und einem 700 bp PstI Fragment aus der *neo*-Box rehybridisiert.

Die in Abbildung 28 sichtbaren Transkripte bei hetero- und homozygoten Tieren können keine chimären RNAs aus der *neo*-Box und der nSMase sein, die vom starken PGK Promoter der *neo*-Box initiiert werden. Die Signale, die sich bei Hybridisierung mit der *neo*-Sonde ergeben, stimmen mit denen der Hybridisierung mit der nSMase Sonde überein.

3.7.1.2 RT-PCR Analyse

Zur Untersuchung der neugebildeten Transkripte wurden semiquantitative RT-PCR Analysen durchgeführt. Dafür wurde 5 µg Nieren RNA revers transkribiert und je $\frac{1}{5}$ des Ansatzes für

die PCR mit Pwo-Polymerase eingesetzt. In Abbildung 29A sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

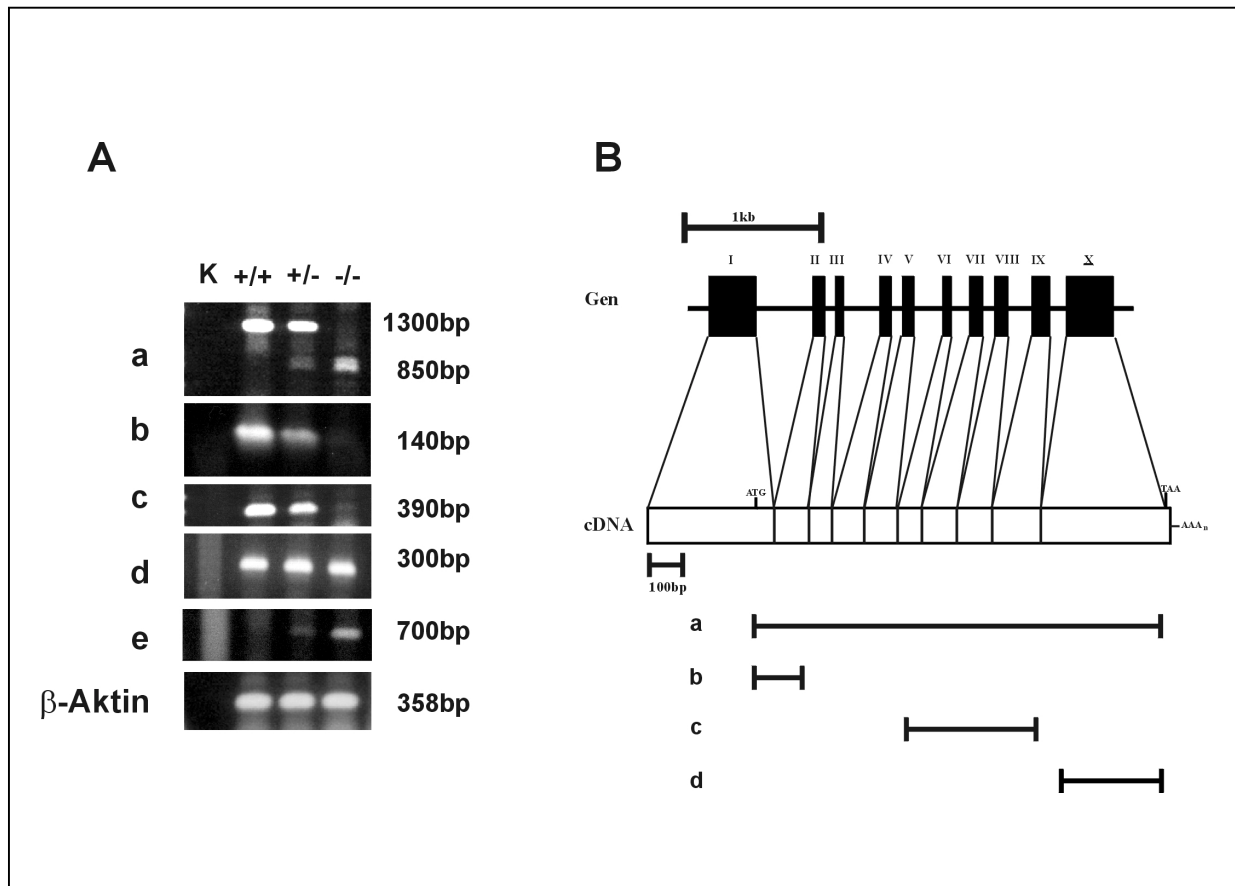


Abb. 29 RT-PCR Analyse der verschiedenen Genotypen.

5 μ g Nieren RNA wurde in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in die PCR mit verschiedenen Primerkombinationen eingesetzt. Dabei waren die PCR Bedingungen in allen Ansätzen gleich (60°C, 30 Zyklen).

A, Auftrennung der Amplifikate im Agarosegel. K; Kontrolle, PCR ohne Template. Die verwendeten Primerkombinationen: a, 5'Xho-sense/3'Sma-asense; b, 5'Xho-sense/EII-Xho-asense; c, HindIII-sense/NotI-asense; d, Pst-stop/3'Sma-asense; e, 5'Xho-sense/neo5'asense. Die PCR mit den Primern β -Aktin5'/ β -Aktin3' diente als Kontrolle.

B, schematische Übersicht über den *nsmase* Genlocus und die cDNA. Die in A, a-d amplifizierten WT Fragmente sind eingezeichnet.

Die Primer auf Start und Stopcodon amplifizierten neben dem erwarteten 1300 bp *wt*-Transkript in hetero-, und homozygoten Tieren drei kleinere Transkripte zwischen 700 bp und 850 bp (a). Mit der Primerkombination 5'Xho-sense/EIIXho-asense (b) wurde nur in homozygoten Tieren das erwartete 140 bp Fragment nicht amplifiziert, ebenso ein 390 bp Fragment mit Primern die in ExonVI und IX lokalisiert sind (c). Exon X wurde dagegen in allen drei Genotypen in gleichem Maße amplifiziert (d). Die Amplifikation eines β -Aktin Fragmentes diente als interne Kontrolle.

Mit der Primerkombination 5`Xho-sense/neo5`-asense wurde aus der cDNA homozygoter Tiere ein ca. 700 bp langes Fragment amplifiziert (e). Somit kann man auf eine Fusion des ersten Exons mit der *neo*-Box schließen.

Zur Amplifikation der im *Northern Blot* gezeigten längeren Transkripte wurden die Syntheszeiten in der PCR auf fünf Minuten verlängert und die Zyklenzahl erhöht. Aus der Niere wurden aber keine weiteren Transkripte amplifiziert.

Bei weiteren RT-PCR Analysen aus Leber RNA wurden die in Niere gefundenen Ergebnisse bestätigt und unter Verwendung des *Expand-High-Fidelity*-PCR-Systems mit der Primerkombination 5`Xho-sense/ 3`Sma-asense weitere Transkripte mit einer Größe zwischen 1.6 kb und 3 kb amplifiziert. Diese wurden kloniert und sequenziert. Es handelt sich dabei um sieben verschiedene Spleißvarianten, die durch die Integration der *neo*-Box in den Genlokus entstehen (Abb. 30).

ExonI wird in verschiedenster Weise mit Fragmenten aus der *neo*-Box zusammengespleißt, wobei kryptische Spleißsignale verwendet werden.

Das kurz hinter dem *neo*-Translations-Stopsignal gelegene Polyadenylierungssignal wird in allen Fällen, in denen die kodierende Sequenz des *neo*-Gens verwendet wird, nicht genutzt. Es werden auch Fragmente aus dem nicht-kodierenden Bereich des *neo*-Gens zusammengespleißt. ExonII des nSMase Gens wird nicht verwendet.

Alle diese identifizierten chimären RNA`s würden bei einer möglichen Translation Polypeptide von weniger als 30 Aminosäuren ergeben. Da die katalytisch wichtigen Aminosäuren aus ExonII und XII nicht in ein mögliches Polypeptid eingebaut werden können und selbst im kleinsten Transkript vor den Transmembrandomänen ein Translationsstop eingefügt wird, ist nicht mit funktionellen Polypeptiden zu rechnen. Ebenfalls können daher toxische Effekte dieser möglichen Peptidfragmente ausgeschlossen werden.

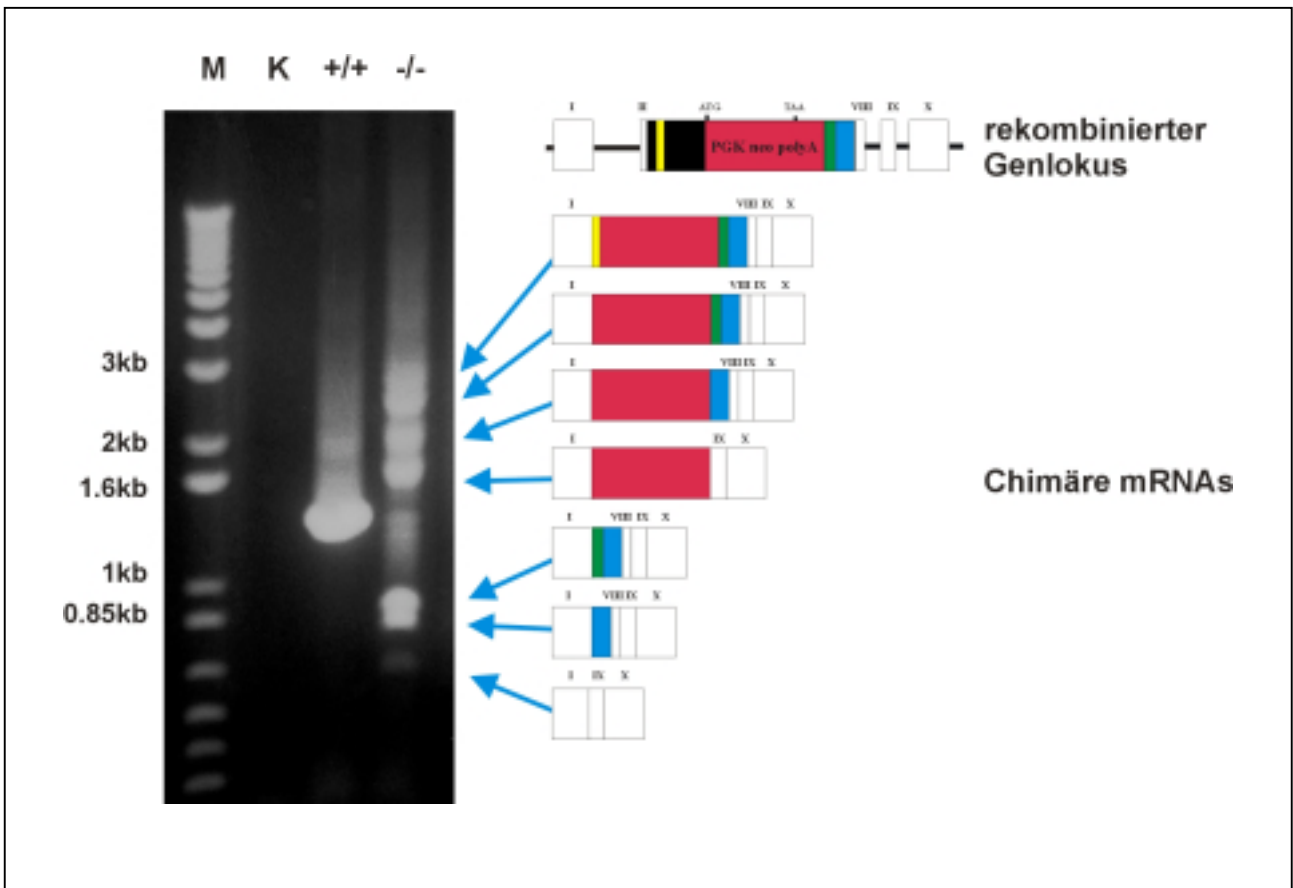


Abb. 30 RT-PCR Analyse der chimären Transkripte.

Leber RNA wurde revers transkribiert und mit der Primerkombination 5'Xho-sense/3'Sma-asense der kodierende Bereich der nSMase cDNA amplifiziert. Im Vergleich zur PCR Reaktion in Abb. 28 wurde die Syntheszeit auf fünf Minuten verlängert und die Zyklenzahl auf 40 erhöht. K; Kontrolle, PCR ohne Template.

Auf der rechten Seite sind die verschiedenen Transkripte schematisch dargestellt. Oben ist der rekombinierte nSMase Lokus gezeigt, Exons sind weiß, die in ExonII und VIII integrierte *neo*-Box ist farbig dargestellt. Start- (ATG) und Stop-Codon (TAA) der *neo*-Box sind eingezeichnet. Darunter sind die sieben identifizierten chimären RNAs dargestellt. Expressionsunterschiede der verschiedenen Transkripte sind wegen der PCR Bedingungen in diesem Experiment nicht mehr detektierbar gewesen.

3.7.2 Proteinanalyse

Nach den Ergebnissen der RNA Untersuchungen stellte sich die Frage, ob das nSMase Protein oder mögliche Proteinfragmente in homozygoten Tieren noch exprimiert werden und ob noch enzymatische Aktivität in Geweben meßbar war.

3.7.2.1 Western Blot Untersuchung

Der Gehalt an nSMase Protein in Organen ist sehr niedrig [118].

Für *Western Blot* Analysen wurden daher aus Homogenaten von Niere, Leber und Gehirn durch differentielle Zentrifugation zelluläre Membranen angereichert und Proteine extrahiert.

Die Proteine wurden auf 15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und im *Western Blot* mit gegen die nSMase gerichteten Antikörpern identifiziert.

Die unterschiedlichen Mengen der nSMase in den verschiedenen Organen der Wildtyp Tiere werden in Abbildung 31 deutlich. Dabei ist zu beachten, daß die eingesetzten Proteinmengen für Leber und Gehirn wesentlich größer waren. Das Signal des ca. 46 kDa großen nSMase-Proteins war bei heterozygoten Tieren um ca. 50 % reduziert und fehlte in homozygoten Tieren. Daraus läßt sich schließen, daß das funktionelle Protein in *nsmase*^(-/-)-Tieren nicht mehr synthetisiert wird. Es wurden auch keine kleineren immunreaktiven Polypeptide detektiert, die aus den verschiedenen chimären RNAs entstanden sein könnten.

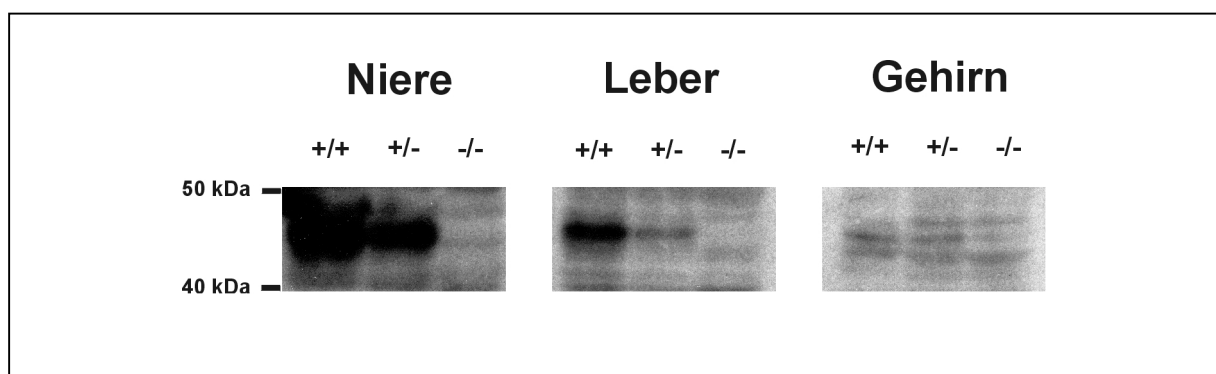


Abb. 31 *Western Blot* Analyse von Organen der drei Genotypen.

Je 100 µg (Niere), bzw. 150 µg (Leber, Gehirn) von aus angereicherten Membranen extrahiertem Protein wurden auf einem 15 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch *semi-dry electroblotting* auf Nitrozellulose übertragen. 1. Antikörper: mLT (affinitätsgereinigt, 1 mg/ml, 1:500), 2. Antikörper anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat (Sigma, 1:15000).

3.7.2.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten in verschiedenen Organen

Das Fehlen des nSMase Proteins in homozygoten Tieren wurde durch Messung der spezifischen neutralen Sphingomyelinase Aktivität in den Organen bestätigt. Für die enzymatischen Aktivitätstests wurden, wie für die *Western Blot* Analysen, Proteine aus angereicherten Membranfraktionen extrahiert und im enzymatischen Assay getestet. Da die spezifische enzymatische Aktivität in allen Geweben außer im Gehirn sehr niedrig ist, mußten auch hier große Proteinmengen eingesetzt werden.

Aufgrund der Ergebnisse der enzymatischen Tests an homozygoten Tieren kann man die Organe in drei Klassen einteilen. Organe, die keine meßbare Restaktivität aufweisen, Organe mit unveränderter Aktivität und Organe mit reduzierter, aber noch deutlich meßbarer Aktivität. In der Niere, dem Organ mit der größten immunreaktiven Proteinmenge, ist in *nsmase*^(-/-)-Mäusen keine spezifische neutrale Sphingomyelinase-Aktivität mehr detektierbar gewesen, heterozygote Tiere hatten eine um ca. 50 % verringerte Aktivität. Dasselbe wurde in

Extrakten aus Herz beobachtet. In der Leber und in der Lunge waren dagegen in homozygoten Tieren noch Restaktivitäten meßbar. Heterozygote Tiere zeigten spezifische Aktivitäten, die zwischen denen von *wt* und homozygoten Tieren lagen. Gleiches wurde auch an Extrakten aus Thymus und Hoden beobachtet (nicht gezeigt). Gehirn und Darm gehören zu der Klasse, in der die spezifische nSMase-Aktivität von der Deletion des nSMase Gens nicht beeinflusst wird (Abb. 32).

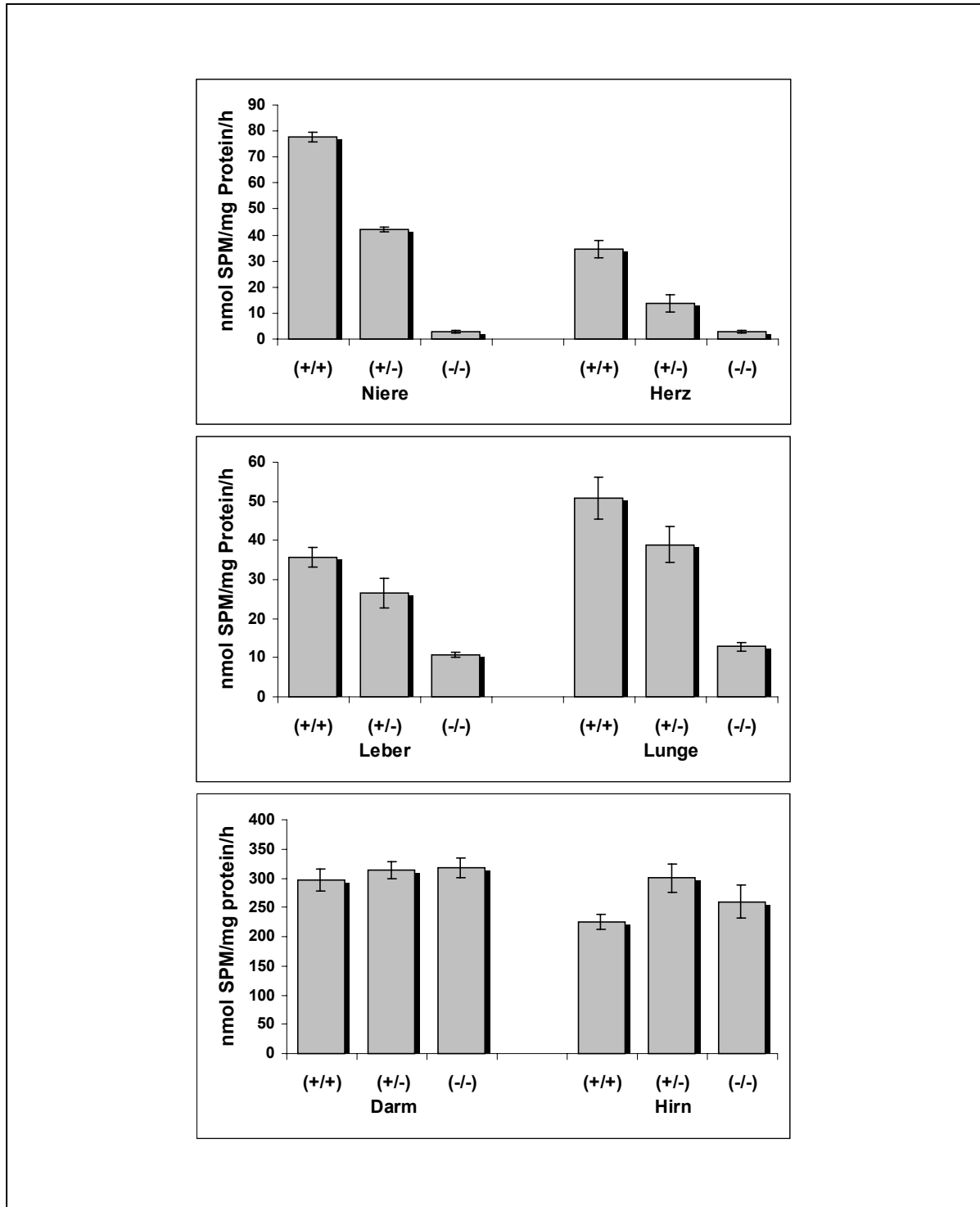


Abb. 32 (vorherige Seite) Enzymatische Aktivitäten in Organen der verschiedenen Genotypen.

Membranextrakte der verschiedenen Organe wurden im mizellaren Assay mit 10 nmol [¹⁴CH₃]-Sphingomyelin inkubiert und das enzymatisch freigesetzte [¹⁴CH₃]-Cholin nach Extraktion im Szintillationszähler gemessen. Die Proteinmengen wurden so gewählt, daß der lineare Bereich des Aktivitätstests von weniger als 10-20 % des Substratumsatzes nicht überschritten wurde.

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Es wurde aus Niere und Leber 70 µg, aus Herz und Lunge 50 µg, und aus Hirn und Darm je 20 µg Protein eingesetzt, um im linearen Bereich der Messung zu bleiben.

Die Aktivitätstests der Gehirnextrakte verliefen an der oberen Grenze des linearen Bereiches.

Zu beachten sind die wesentlich höheren spezifischen Aktivitäten in Darm und Gehirn gegenüber den anderen Organen.

Dabei ist wahrscheinlich, daß ein Teil des im Darm gemessenen Substratumsatzes durch unspezifische Phospholipaseaktivitäten erfolgt.

Die in den nSMase-defizienten Mäusen gemessenen nSMase-Aktivitäten bestätigen die Befunde, daß mit gegen die nSMase gerichteten Antikörpern die enzymatische Aktivität aus der Niere zu ca. 75 %, die Hirnaktivität aber nicht präzipitierbar war [185].

3.7.3 Histologische Untersuchungen

Die Ergebnisse von RNA und Proteinanalysen zeigen deutlich, daß die Integration des *neo*-Gens in den nSMase-Lokus zur Ablation der Funktion des Proteins geführt hat.

Um Informationen über eventuelle morphologische Auswirkungen der nSMase-Defizienz zu erhalten, wurden Organschnitte angefertigt und mikroskopisch analysiert. 12 Wochen alte *wt*-, und *nsmase*^(-/-)-Männchen wurden über den linken Herzventrikel mit Paraformaldehyd perfundiert. Nach Entnahme der Organe wurden diese in Paraffin eingebettet und Mikrotom-Schnitte angefertigt. An Hämatoxilin/Eosin gefärbten Organschnitten der verschiedenen Organe waren keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Tieren zu erkennen. Abbildung 33 zeigt exemplarisch die Nieren-Histologie.

Für Blutuntersuchungen wurden Mäuse über den linken Herzventrikel ausgeblutet und das Blut im Institut für Klinische Chemie der Universität zu Köln untersucht. Im Blutbild waren zwischen *wt*- (n = 4) und *nsmase*^(-/-)-Tieren (n = 2) keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Blutbestandteile zu erkennen. Messungen des Plasmacholesterin- und Triglyceridspiegels ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (*wt*, n = 6, *nsmase*^(-/-), n = 7).

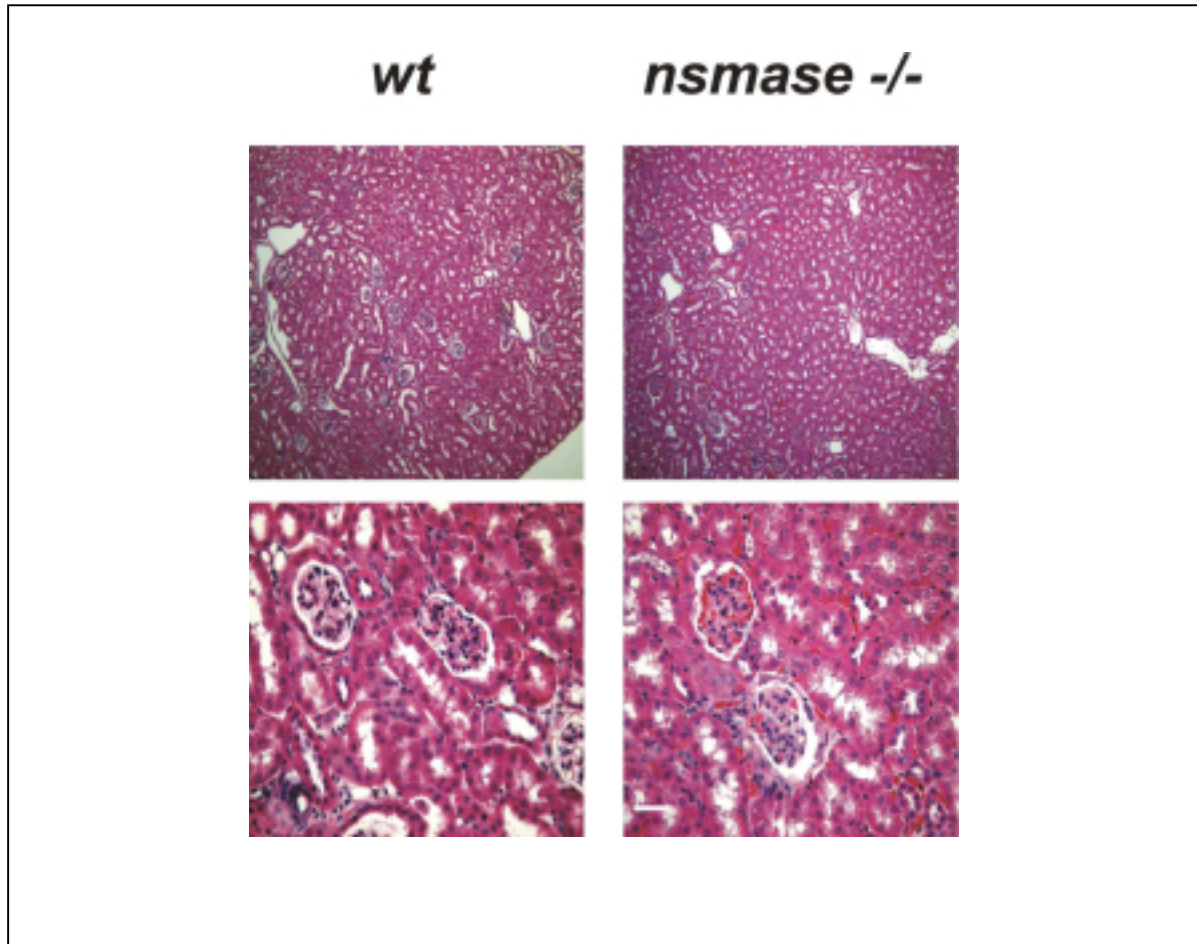


Abb. 33 Histologische Färbung von Nierenschnitten.

Die Nieren von *wt*-, und *nsmase*^{-/-}-Mäusen zeigten eine histologisch intakte Morphologie (Übersicht, 10-fache Vergrößerung). Die Glomeruli waren ebenfalls ohne Auffälligkeiten (Ausschnitt, 40-fache Vergrößerung). HE Färbung.

3.7.4 Lipidanalyse

Der Einfluß der nSMase-Defizienz auf den Sphingomyelin-Katabolismus wurde durch Lipidanalysen untersucht. Dafür wurden Lipide aus Niere, Leber und Gehirn von *wt* und *nsmase*^(-/-)-Mäusen extrahiert und analysiert.

Die Gesamtlipide wurden durch Chloroform/Methanol-Extraktion aus Homogenaten der Organe von 8-12 Wochen alten *wt* und *nsmase*^(-/-)-Mäusen, die alkalistabilen Lipide durch alkalische Verseifung der Gesamtlipidextrakte mit 0.5 M methanolischer KOH gewonnen. Letztere spaltet alle Esterbindungen der Phospholipide und reichert dadurch die Sphingolipide und Lyso-Plasmalogene an. Die Lipidextrakte wurden dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Laufmittelsystemen aufgetrennt und nach Veraschung oder spezifischer Färbung densitometrisch analysiert. Die Zuordnung der Lipide erfolgte anhand von Standards.

Abbildung 34 zeigt zwei exemplarische Chromatogramme

Weder für die Gesamtextrakte noch für die alkalistabilen Lipide wurden Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gefunden.

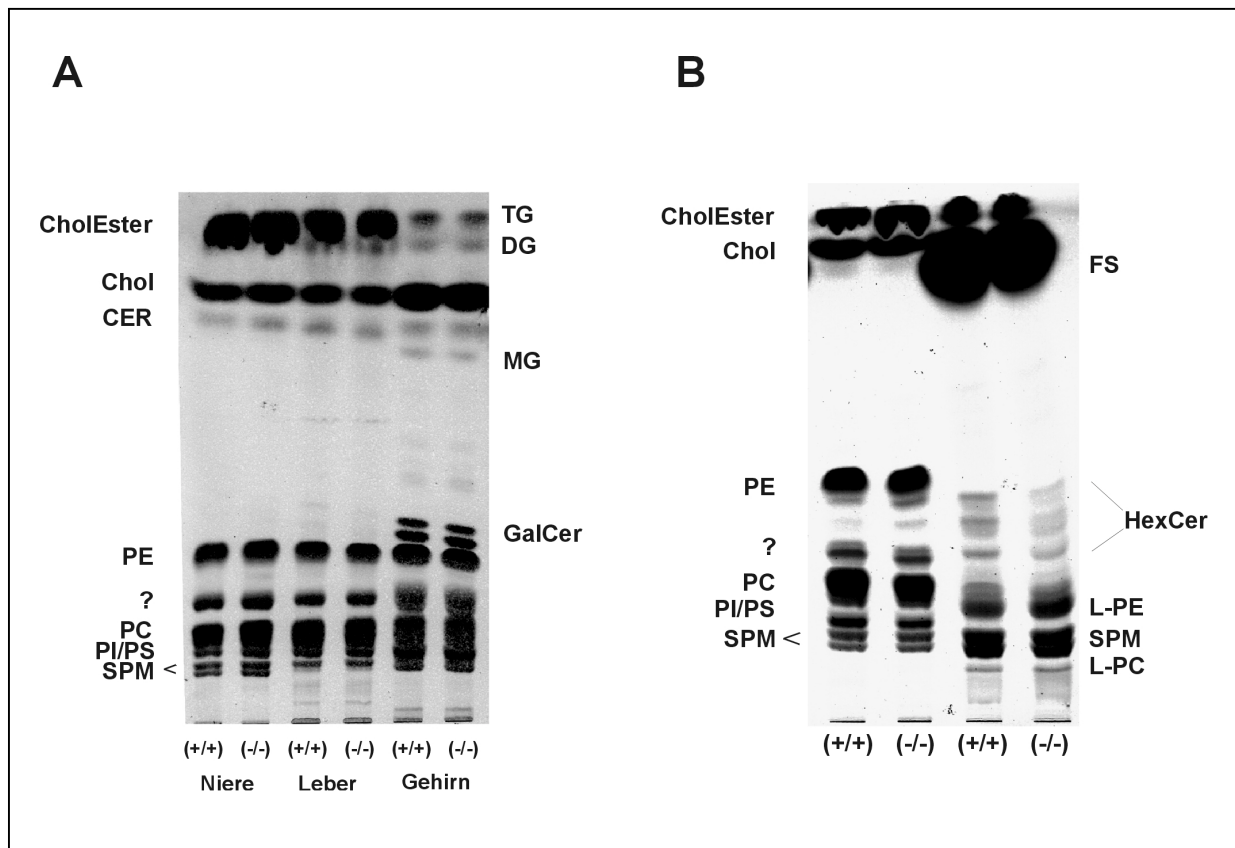


Abb. 34 (vorherige Seite) Lipidanalyse von Organen aus *wt* und *nsmase*^(-/-)-Mäusen.

A, Gesamtlipidextrakte aus Niere, Leber und Gehirn. Die Dünnschichtplatte wurde zur Hälfte im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/H₂O (65/25/4, v/v/v) entwickelt, luftgetrocknet und anschließend im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol (15:1, v/v) entwickelt. Die Darstellung der Lipide erfolgte durch Veraschung mit 50 %iger H₂SO₄.

B, Lipidextrakte aus Niere. Linke Hälfte: Gesamtextrakt, rechte Hälfte: alkalistabile Lipide. (Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/H₂O (65/25/4, v/v/v)).

L-PC, lyso-Phosphatidylcholin (Plasmalogen); L-PE lyso-Phosphatidylethanolamin (Plasmalogen) SPM, Sphingomyelin; PS, Phosphatidylserin; PI, Phosphatidylinositol; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin; GalCer, Galaktosylceramid (Cerebrosid); MG, Monoglycerid; DG, Diglycerid; TG, Triglycerid. Cer, Ceramid; Chol, Cholesterin; CholEster, Cholesterin Ester; FS, freie Fettsäure; HexCer, Mono-, Di-, Tri- und Tetrahexosylceramid; ?, nicht identifiziertes Phospholipid

3.7.5 Radioaktive Markierungsexperimente an *nsmase*^(-/-) Fibroblasten

Radioaktive Markierungsexperimente wurden an nSMase-defizienten, primären embryonalen Fibroblasten (EMFIs) durchgeführt. Da die Embryonen aus heterozygoten Verpaarungen stammten wurden die Zellen einzeln präpariert, kultiviert und expandiert. Der Genotyp wurde durch *Southern Blot* und genomische PCR bestimmt. Enzymatische Aktivitätstests ergaben eine spezifische nSMase-Aktivität von 44 ± 5 nmol SPM/mg Protein/h für *wt* Zellen. Heterozygote EMFIs hatten ca. 50 % reduzierte Aktivitäten (20 ± 1.6 nmol SPM/mg Protein/h), *nsmase*^(-/-)-Zellen nur noch eine Restaktivität von 7.6 ± 0.1 nmol/SPM/mg Protein/h.

Für die weiteren Experimente wurden nur *wt* und *nsmase*^(-/-)-EMFIs der Passagen 4 bis 6 verwendet. In Analogie zu den Markierungsexperimenten an nSMase überexprimierenden HEK Zellen wurden *wt* und *nsmase*^(-/-)-EMFIs für 24-48 Stunden mit 1-[¹⁴C]-markiertem Acetat oder 1-[¹⁴C]-Palmitat inkubiert, die Lipide extrahiert und gleiche Mengen an Radioaktivität dünnschichtchromatographisch analysiert. Weder in Gesamtextrakten, noch in verseiften Extrakten zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 35).

In weiteren Markierungsstudien wurde untersucht, ob die EMFIs Unterschiede in der Synthese oder dem Abbau einzelner Lipide zeigten. Die Zellen wurden für unterschiedlich lange Zeiten mit 1-[¹⁴C]-Acetat markiert und Gesamtextrakte in verschiedenen Laufmittelsystemen dünnschichtchromatographisch analysiert. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Verhältnissen der Lipide zwischen *wt* und *nsmase*^(-/-)-Zellen (Abb. 36).

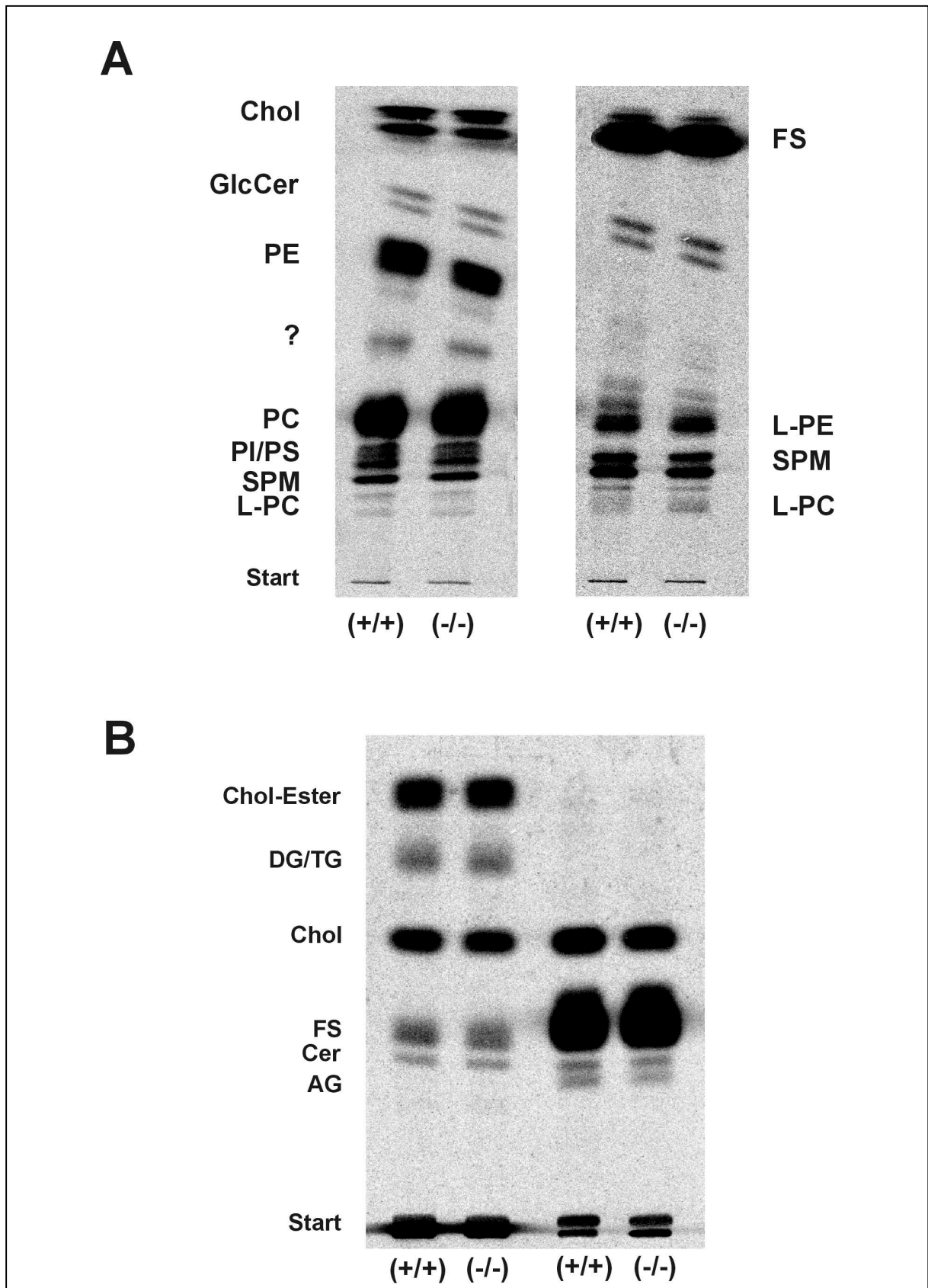


Abb. 35 Analyse ^{14}C -markierter Lipide aus *wt* und *nsmase*^{-/-}-EMFIs.

70.000 DPM Gesamtlipidextrakte (linke Hälfte) und 85.000 DPM alkalistabile Lipide (rechte Hälfte) wurden im Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/ H_2O (65/25/4, v/v/v) (A), bzw. Chloroform/Methanol (15:1, v/v) (B) entwickelt. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte mit einem Phosphorimager. Abkürzungen vgl. Abb.34. GlcCer, Glucosylceramid, AG Alkylglycerol.

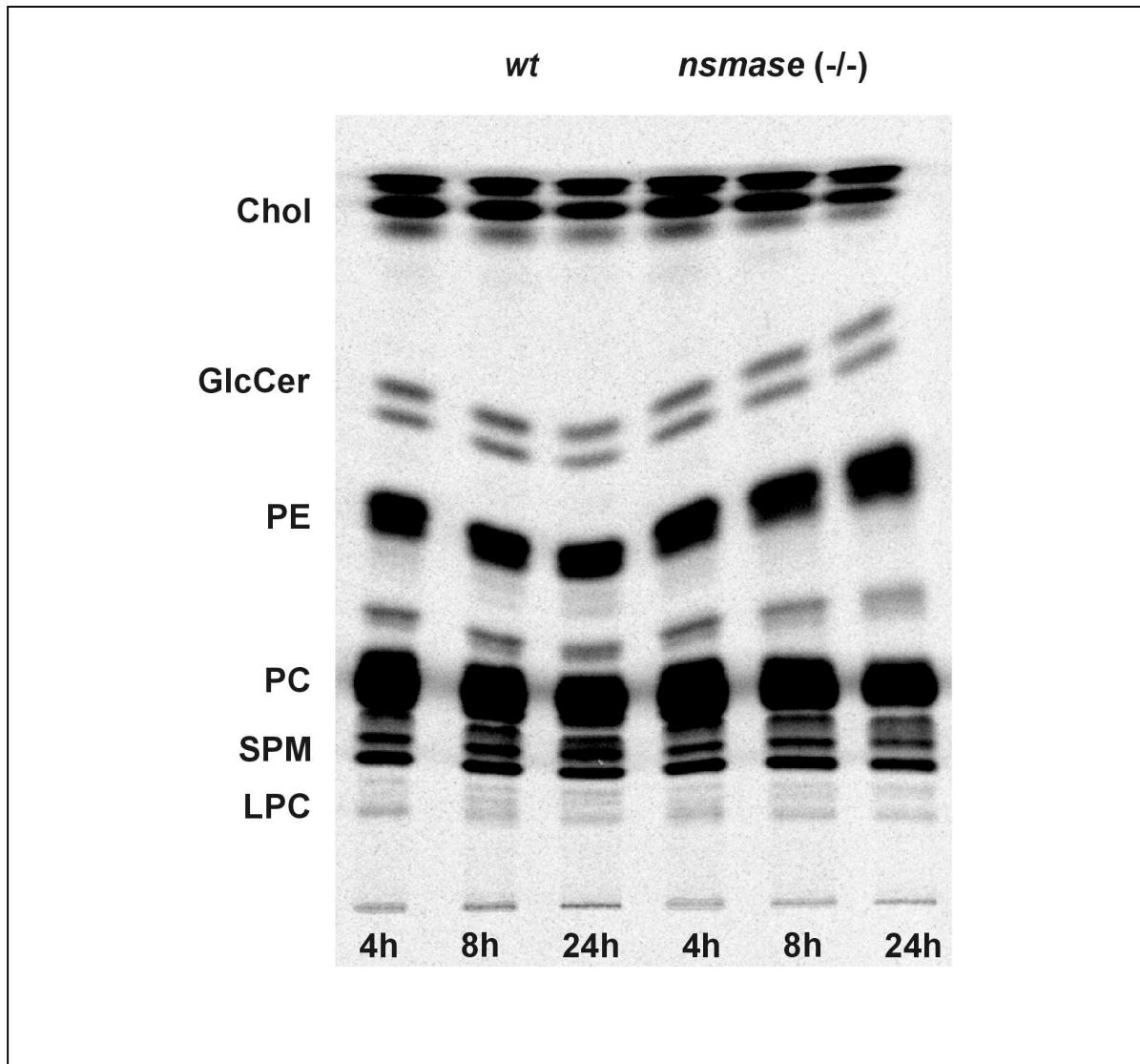


Abb. 36 Metabolische Markierung mit 1-[¹⁴C]-markiertem Acetat.

EMFIs wurden für die angegebenen Zeiten mit radioaktivem Acetat inkubiert, Gesamtlipidextrakte präpariert und je 70.000 DPM dünnenschichtchromatographisch im Laufmittelsystem Chloroform/ Methanol/H₂O (65/25/4, v/v/v) aufgetrennt.

Abkürzungen vgl. Abb. 34

Der Lipidkatabolismus wurde in *pulse chase* Experimenten untersucht. Dabei wäre ein verlangsamter Abbau von Sphingomyelin oder lyso-PC zu erwarten gewesen. EMFIs beider Genotypen wurden für 16 Stunden mit 1-[¹⁴C]-Acetat metabolisch markiert, gefolgt von einer bis zu 12-stündigen Inkubation in nicht-radioaktivem Medium. Auch in diesem Experiment waren keine Unterschiede in alkalisch hydolysierten (nicht gezeigt) oder Gesamtlipidextrakten zu erkennen (Abb. 37).

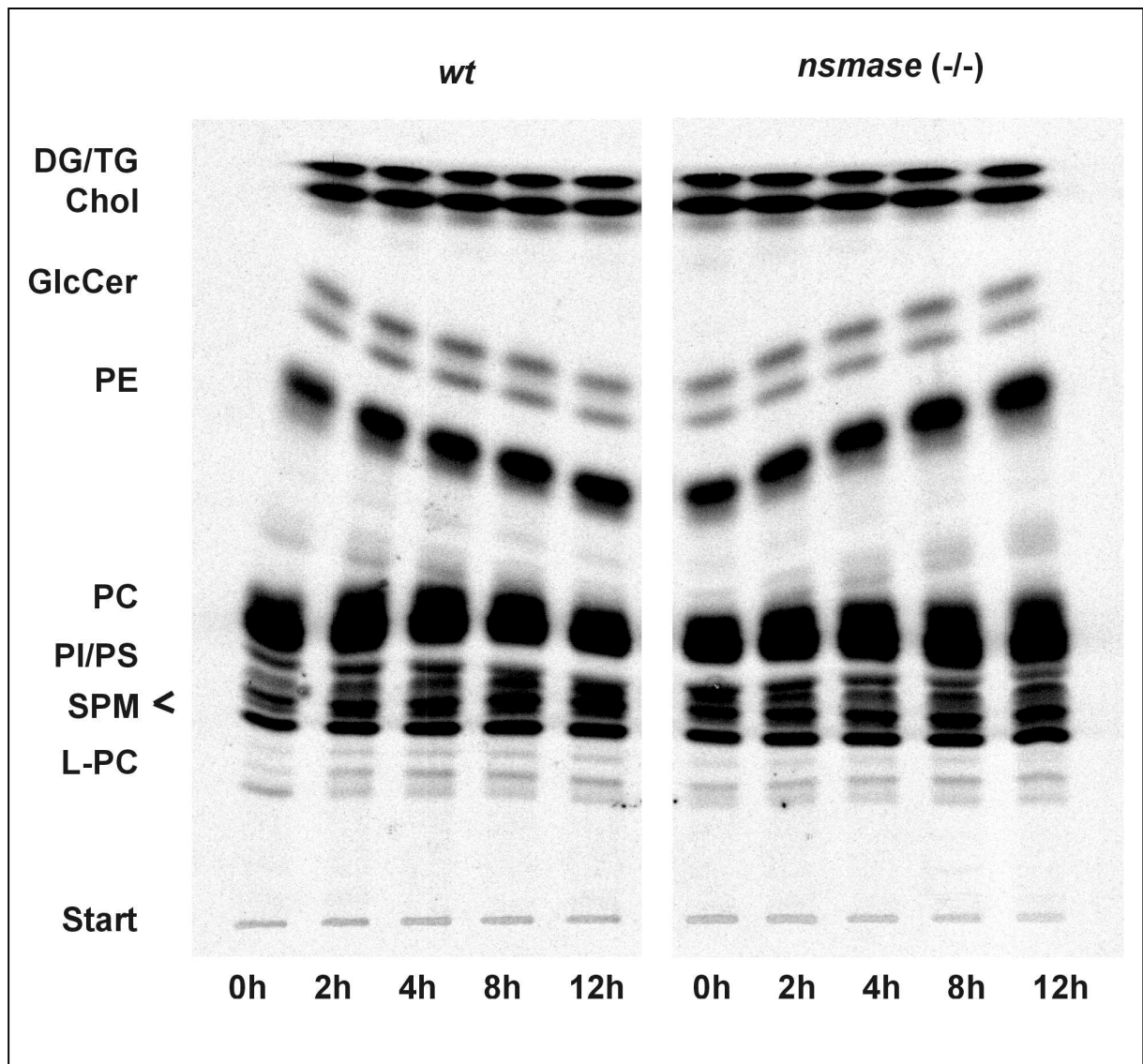


Abb. 37 Pulse chase Experiment.

EMFIs wurden 16 Stunden mit 1-[^{14}C]-Acetat markiert und dann für die angegebenen Zeiten in nicht-radioaktivem Kulturmedium inkubiert. Es wurden 50.000 DPM Lipidextrakt je Fraktion aufgetragen und im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/ H_2O (65/25/4, v/v/v) entwickelt. Abkürzungen vgl. Abb.34.

Aufgrund der an nSMase exprimierenden HEK Zellen erhaltenen Ergebnisse war eine Beteiligung der nSMase am Metabolismus von lyso-PC und lyso-PAF nicht auszuschließen. Es wurde daher an nSMase-defizienten EMFIs überprüft, ob diese Substrate im Vergleich zu *wt*-EMFIs unterschiedlich metabolisiert werden.

Wt und *nsmase*^(-/-)-Zellen wurden analog zu den Experimenten an HEK Zellen mit [1-O-Octadecyl]- ^3H -lyso PAF oder [1-Palmitoyl] ^{14}C -lyso PC metabolisch markiert und die Lipide analysiert. Die nSMase-defizienten EMFIs metabolisierten sowohl lyso-PAF (Daten nicht gezeigt), als auch lyso-PC ohne Unterschied zu den *wt*-Zellen (Abb. 38).

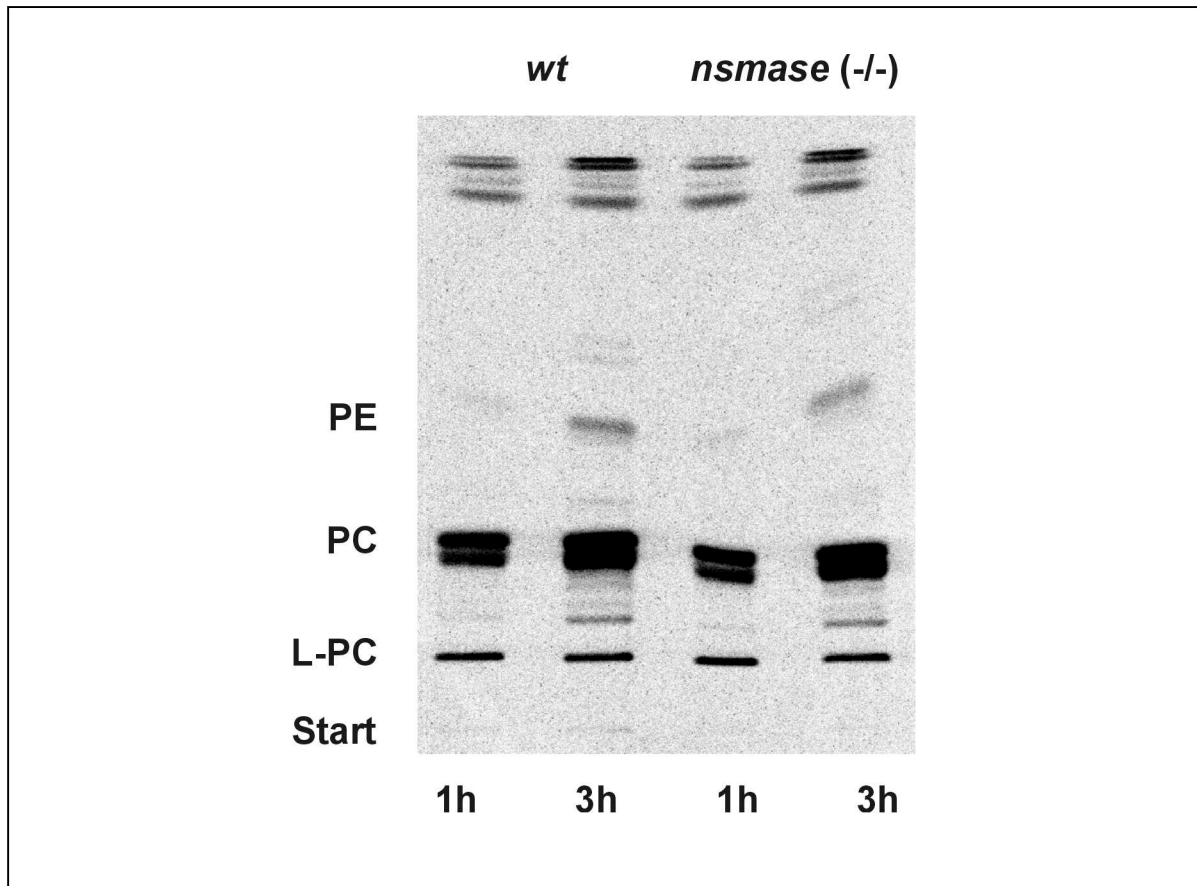


Abb. 38 Metabolische Markierung von *wt* und *nsmase*^(-/-)-EMFIs mit lyso-PC.
 Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit [1-Palmitoyl]¹⁴C-lyso PC inkubiert und je 10.000 DPM markierte Lipide im Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/H₂O (65/25/4, v/v/v) aufgetrennt. L-PC, lyso-PC; PC, Phosphatidylcholin; PE, Phosphatidylethanolamin.

3.7.6 DNA-Chip Expressionsanalyse

Die nSMase-defizienten Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp und in den oben beschriebenen Lipidanalysen mit den zur Verfügung stehenden Nachweismöglichkeiten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Mit dem Ziel, durch differentielle Expression ausgelöste, kompensatorische Mechanismen zu finden, wurden Genexpressionsprofile von *wt*- und *nsmase*^(-/-)-Tieren mittels einer DNA-Chip Analyse erstellt.

Die Chips der Firma Affymetrix enthalten für jedes Gen bzw. jeden EST 16 verschiedene, über die cDNA verteilte Oligonukleotide (*perfect match*-Oligonukleotide, PM). Zur Kontrolle sind dieselben Oligonukleotide, jeweils mit einer Punktmutation versehen (*mismatch*-Oligonukleotide, MM), aufgebracht. Nach Hybridisierung mit biotinylierter cRNA und Färbung mit Phycoerythrin konjugiertem Streptavidin werden die Fluoreszenzintensitäten für jede Probe gemessen. Die Intensitäten zwischen den PM- und MM-Oligonukleotiden des Gens werden verglichen und daraus mit Hilfe eines Algorithmus` für jedes Gen ein Profil (*call*) erstellt. Anhand dieses *calls* wird eine Aussage über die Expression und die Expressionsstärke eines Gens getroffen. Aussagen über die Expressionsunterschiede zwischen zwei Genotypen werden dann aus dem Vergleich von zwei einzelnen Chips gemacht. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten der beiden Chips auf einander normiert und mit Hilfe einer speziellen Software ausgewertet.

RNA wurde aus den Lebern von 12 Wochen alten *wt* und *nsmase*^(-/-) Männchen präpariert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde mit einem Oligonukleotid durchgeführt, das die Sequenz der T7-Polymerase Bindungsstelle in *antisense* Orientierung, gefolgt von einer poly-dT Sequenz enthält (T7(dT₂₄)). Nach Synthese des Zweitstranges wurde die doppelsträngige cDNA in einer *in vitro* Transkription mit biotinylierten Ribonukleotiden in markierte *antisense* RNA (cRNA) überführt (*target preparation*). Die cRNA wurde nicht-enzymatisch fragmentiert und 15 µg zur Hybridisierung der Affymetrix MG-U74A DNA-Chips eingesetzt. Nach verschiedenen Waschschritten (Affymetrix Fluidics Station, Protocol EukGE-WS1, EukGE-WS2) wurden die Chips mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin (SAPE) gefärbt. Zur Signalamplifikation wurden diese dann mit einem biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörper inkubiert und mit SAPE gefärbt. Detektion und Prozessierung der Signale erfolgte durch Einlesen der Chips mit einem Affymetrix Chip *Scanner* und Auswertung mit der dazugehörigen GeneChip® Expressions Software (MicroArray Suite 4.1).

Die *target*-Präparation und die Chiphybridisierung erfolgten ausgehend von derselben RNA in zwei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden für jeden Chip getrennt ausgewertet und am Ende kombiniert.

Scatter-Plots von gegeneinander aufgetragenen Fluoreszenzintensitäten zeigen die Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Genotypen im Gegensatz zu den gegeneinander aufgetragenen Wildtyp-Intensitäten (Abb. 39). Dabei wird deutlich, daß nur wenige Gene stark unterschiedlich exprimiert werden.

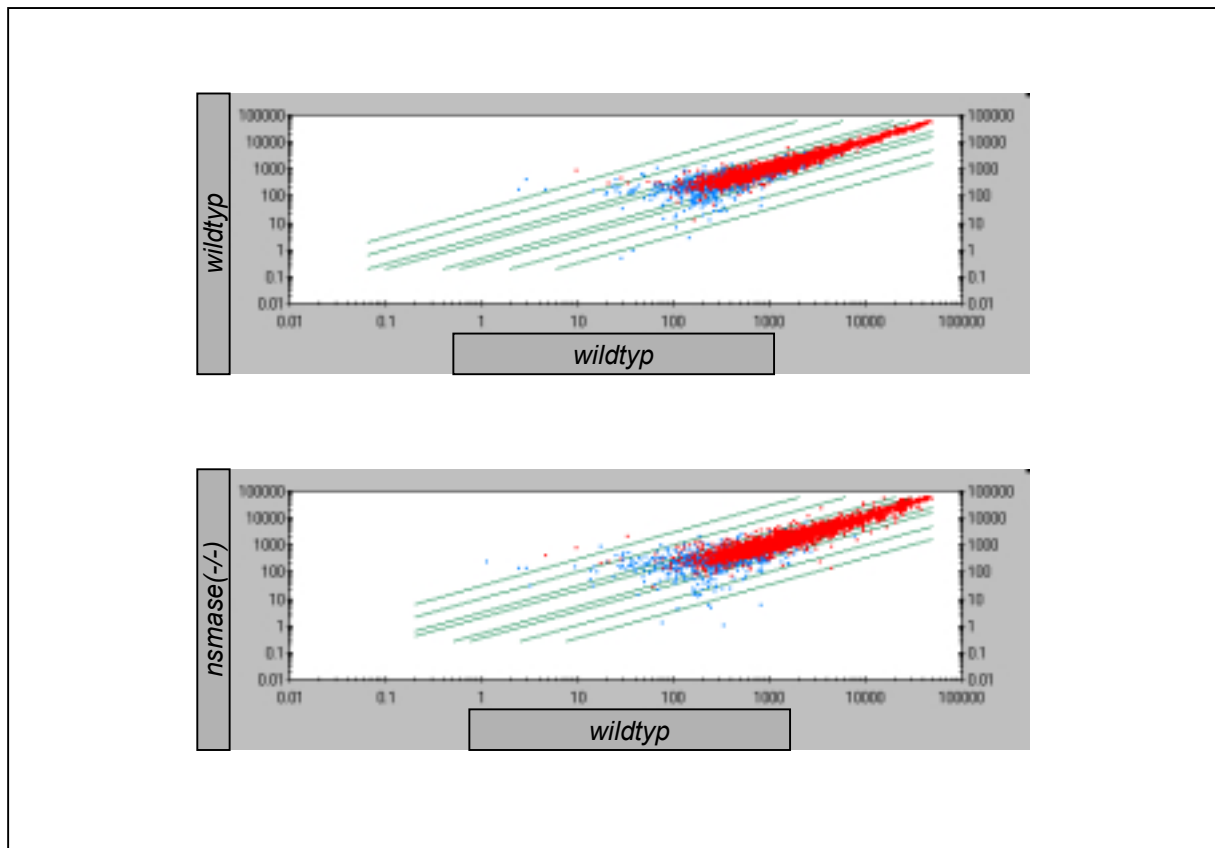


Abb. 39 Scatter Plot der Fluoreszenzintensitäten von *wt* und *nsmase*^(-/-)-Proben.

Die ermittelten *Average Differences* von *wt* und *nsmase*^(-/-)-Proben sind logarithmisch gegeneinander aufgetragen (unteres Bild). Jeder Punkt repräsentiert ein Gen. Rote Punkte bedeuten in beiden Proben exprimierte Gene, blaue Punkte nur in einer Probe exprimierte Gene. Zwischen den beiden mittleren Linien liegende Punkte zeigen Gene, die nicht unterschiedlich exprimiert werden. Die weiteren Linien bedeuten 3-fache, 10-fache und 30-fache Expressionsunterschiede. Zum Vergleich sind im oberen Bild die beiden *wt*-Proben gegeneinander aufgetragen.

Von den 12600 auf dem Chip vorhandenen Genen bzw. EST`s waren ungefähr $\frac{1}{3}$ in der Leber exprimiert. Davon wurden durch den Algorithmus des Auswerteprogrammes 129 Gene als differentiell exprimiert eingestuft, wobei 62 Gene eine um mehr als 2.5-fach unterschiedliche Expression zeigten. Fast die Hälfte dieser differentiell exprimierten Gene

sind EST's. Eine Liste der in beiden *Arrays* differentiell exprimierten Gene findet sich im Anhang.

Die nSMase wird als ca. 3-fach herunterreguliertes Gen mit noch vorhandener mRNA definiert (*marginally present*). Dies stimmt mit den in *Northern Blot* und RT-PCR erhaltenen Daten überein. Eine möglicherweise kompensatorisch regulierte cDNA ist die des Nocturnins. *Nsmase*^(-/-)-Tiere zeigten eine um den Faktor 3.8 höhere Expression dieses als *clock*-Gen identifizierten Mitgliedes der nSMase Superfamilie [128, 186].

Weitere regulierte Gene des Lipid- und Sterolstoffwechsels sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Einigen EST's konnten durch Datenbanksuche aufgrund von Homologien zu Säugerproteinen Funktionen zugeordnet werden.

Faktor	Beschreibung	Accession #
+ 8.4	putative Fettsäure Elongase	AI839004, EST
+ 6.95	putative Phospholipase A2, ER lokalisiert	AI845798, EST
+ 5.5	SREBP1 (<i>sterol regulatory element binding protein 1</i>)	AI843895, EST
+ 4.8	Fettsäure Synthase	X13135
+ 3.1	CytochromP450, CYP2A4	M19319
+ 1.7	Stearoyl-Coenzym A Desaturase 1	M21285
- 16.15	putative <i>short-chain</i> Dehydrogenase	AI042964, EST
- 5.1	Cytochrom P450, CYP4A10	AB01842
- 4	Apolipoprotein A4	M64248
- 1.8	putative Steroid Dehydrogenase	AF064635
- 1.7	<i>long-chain</i> Fettsäure-CoA Synthase	U15977

Tabelle 3 Zusammenfassung einiger in *nsmase*^(-/-)-Mäusen regulierten Gene aus dem Lipid- und Sterolmetabolismus.

Der in Spalte eins genannte Faktor gibt den Expressionsunterschied im Vergleich zum Wildtyp wieder.

Da die Überprüfung der ca. 120 differentiell exprimierten Gene durch *Northern Blot*, oder RT-PCR nicht sinnvoll erschien, sollte dies mit einem speziell angefertigten DNA Chip erfolgen. Dieser Chip wurde in Zusammenarbeit mit der MEMOREC-GmbH zusammengestellt. Er enthält die auf dem oben beschriebenen Chip regulierten und weitere Gene, insbesondere aus dem Sphingolipid-, Phospholipid- und Cholesterinstoffwechsel.

Diese Analysen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

3.8 Kryokonservierung von Embryonen

Zur sicheren Aufbewahrung der *nsmase*^(-/-) Mauslinie wurden lebensfähige Embryonen eingefroren [187].

Die Kryokonservierung erfolgte dabei in einem Zwei-Schritt-Verfahren [188]. Dafür wurden die Embryonen erst in Einfriermedium (PBS/ 1 M DMSO) vorgekühlt, dann auf -12°C abgekühlt und die Kristallisation manuell ausgelöst. Anschließend wurde schrittweise bis auf -80°C abgekühlt und die Embryonen direkt in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Auf diese Weise wurden 155 Embryonen konserviert. Diese können im Bedarfsfall zur Reetablierung der *nsmase*^(-/-) Mauslinie genutzt werden.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die neutrale, Mg^{2+} -abhängige Sphingomyelinase der Maus strukturell und funktionell *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

Eine Beteiligung der nSMase an den postulierten, Ceramid-induzierten Signaltransduktionswegen wurde an U937 Zellen untersucht. Es wurde kein Einfluß der nSMase-Überexpression auf die TNF- α -induzierte Aktivierung der mitogen- bzw. stressinduzierten Proteinkinasen ERK1 und JNK2 und des Transkriptionsfaktors NF- κ B festgestellt. Ebenfalls unbeeinflusst war die Kinetik der TNF- α induzierten PARP-Spaltung und Phosphatidylserin-externalisierung, beides Kennzeichen für Apoptose. Eine leichte Erhöhung der intrazellulären Ceramidkonzentration wurde in TNF- α stimulierten, nSMase exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen gemessen.

Eukaryotisch exprimiertes, rekombinantes Protein wurde enzymatisch aktiv durch Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Untersuchungen zur Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Metallionen und zur Aktivierbarkeit durch Fettsäuren verschiedenen Sättigungsgrades ergänzten schon vorliegende enzymatische Charakterisierungen.

Die subzelluläre Lokalisation des Proteins wurde durch Immunfluoreszenzstudien mit gegen das Protein gerichteten, polyklonalen Antikörpern aufgeklärt. Konfokale Untersuchungen zeigten eine Kolokalisation mit ER-Markerproteinen. Eine partielle Kolokalisation mit Golgi-Markern wurde ebenfalls beobachtet. Durch Expression eines GFP-Fusionsproteins in verschiedenen Zelltypen wurde eine zelltypspezifisch unterschiedliche Lokalisation ausgeschlossen.

Die Untersuchung der Lipidzusammensetzung von nSMase überexprimierenden HEK 293 Zellen zeigte keine Änderung in den Mengen von Sphingomyelin und Ceramid, dagegen aber die Akkumulation von Alkyl und Acylglycerol. In weiterführenden Untersuchungen wurden die beiden Phospholipide lyso-Phosphatidylcholin und lyso-*Platelet-Activating-Factor* als *in vitro* Substrate der nSMase identifiziert.

Zur Aufklärung der *in vivo* Funktion der nSMase wurde ein nullallelisches Mausmodell erstellt. Zunächst wurde dafür das Maus Gen durch *library screening* kloniert und vollständig charakterisiert.

Es erstreckt sich über 3.3 kb und besteht aus 10 Exons, die in ihrer Länge zwischen 77 bp (ExonIII) bis 447 bp (ExonX) variieren. Analysen des Promoterbereiches lassen auf ein *housekeeping* Gen schließen.

Ausgehend von diesen Informationen wurden zwei *replacement* Vektoren konstruiert und durch Elektroporation in verschiedene ES-Zelllinien eingebracht. Aus den über 2000 analysierten ES-Zell Klonen wurden drei homolog rekombinierte Klone der Linie CJ7 isoliert und charakterisiert. Blastozysteninjektionen eines dieser Zell-Klone ergab vier keimbahnchimäre Männchen, die zur Etablierung einer nSMase-defizienten Mauslinie führten.

Die nSMase-defizienten Tiere verhalten sich phänotypisch unauffällig. Untersuchungen auf Transkriptionsebene zeigten neben einem Verlust der 1.6 kb großen nSMase mRNA das Auftreten verschiedener chimärer Transkripte, die als Produkte aberranter Spleißprozesse mit Fragmenten der integrierten *neo*-Box identifiziert wurden. Durch DNA-Sequenzierungen wurde gezeigt, daß aus diesen Transkripten kein aktives Protein synthetisiert werden kann. Mittels *Western Blot* Analyse wurde die Ablation des nSMase-Gens auch auf Proteinebene bewiesen.

Die an verschiedenen Organen von *nsmase*^(-/-)-Mäusen durchgeführten enzymatischen Aktivitätstests zeigten einen vollständigen Aktivitätsverlust in Niere und Herz, einen partiellen Aktivitätsverlust in Leber, Lunge, Thymus und Hoden und eine unveränderte nSMase Aktivität in Gehirn und Darm.

Untersuchungen der Lipidzusammensetzung verschiedener Organe zeigten keine Unterschiede zwischen *wt*- und *nsmase*^(-/-)-Mäusen. Markierungsexperimente mit radioaktivem Acetat und Palmitat an aus homozygoten Tieren gewonnenen Embryonalen Fibroblasten (EMFIs) ließen keine Veränderung im Lipidmetabolismus dieser Zellen erkennen. Mit radioaktivem lyso-Phosphatidylcholin oder lyso-PAF inkubierte nSMase-defiziente EMFIs zeigten ebenfalls keine Unterschiede zu Wildtyp-Zellen.

Durch eine Genexpressionsanalyse an Lebern von *wt*-, und *nsmase*^(-/-)-Tieren wurden ca. 130 differentiell exprimierte Gene identifiziert. Von diesen waren ungefähr 50 % ESTs mit nur teilweise definierbaren Funktionen.

Das humane nSMase-Gen wurde durch *library screening* und PCR kloniert und charakterisiert. Es besteht aus 10 Exons, die in ihrer Größe und Anordnung homolog zum murinen Gen sind. Das humane nSMase Gen wurde auf Chromosom 6, Bande q23 lokalisiert.

5. Diskussion und Ausblick

Während die saure Sphingomyelinase molekularbiologisch und biochemisch gut charakterisiert ist, waren zu Beginn dieser Arbeit über neutrale Sphingomyelinasen keine strukturellen und nur wenige funktionelle Daten bekannt.

Die Klonierung der ersten neutralen Sphingomyelinase aus Säugern eröffnete die Möglichkeit, das Enzym molekularbiologisch und biochemisch zu charakterisieren [189]. Es stellte sich die Frage, ob es nur ein Enzym mit neutraler Sphingomyelinase-Aktivität gibt, oder ob verschiedene, durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen gekennzeichnete Isoformen existieren.

5.1 Charakterisierung der murinen nSMase in vitro

Für neutrale Sphingomyelinasen wurde postuliert, daß sie nach Aktivierung durch extrazelluläre Stimuli Sphingomyelin hydrolysieren und das Reaktionsprodukt Ceramid vielfältige intrazelluläre Kaskaden induzieren soll [153]. In den hier durchgeführten Experimenten konnte kein Einfluß der Überexpression der nSMase auf die TNF- α -induzierte Aktivierung der mitogen- oder stressinduzierten Proteinkinasen ERK1 und JNK2, des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Auslösung von Apoptose festgestellt werden. Die gemessene geringfügige Erhöhung des intrazellulären Ceramidspiegels wurde in anderen Experimenten zwar als signalinduzierte Ceramidbildung interpretiert [190, 191], aber schon der Wechsel des Kulturmediums kann diesen Effekt auslösen [192, 193]. Somit kann eine Beteiligung der nSMase an TNF- α -induzierten intrazellulären Prozessen ausgeschlossen werden.

Nur eine geringe Menge des in der Plasmamembran befindlichen zellulären Sphingomyelins soll in Signalprozessen einen Sphingomyelinase-sensitiven *pool* bilden [194].

Nach der Generierung polyklonaler anti mnSMase Antikörper [118] war es möglich, die subzelluläre Lokalisation der nSMase aufzuklären. Dabei wurde das überexprimierte, rekombinante Protein als ER-ständig identifiziert. Eine Lokalisation in der Plasmamembran war in diesen Experimenten nicht erkennbar. Die Ergebnisse dieser Lokalisationsstudien wurden inzwischen auch von anderen Gruppen bestätigt [195, 196].

Es kann ausgeschlossen werden, daß die gezeigte ER-Lokalisation der nSMase ein Artefakt der starken Überexpression ist. In *Western-Blots* subzellulärer Fraktionierungen von Mauslebern war das stärkste nSMase Signal in das ER-Fraktion zu finden.

Immunpräzipitation mit gegen die nSMase gerichteten Antikörpern präzipitierte ca. 80% der nSMase Aktivität aus dieser Fraktion [185].

In der weiteren funktionellen Analyse wurden Punktmutationen durch *in vitro* Mutagenese in die humane cDNA eingeführt, um so die an der Substratbindung und der Katalyse beteiligten Aminosäurereste auszuschalten. Expression dieser Konstrukte führte zu ER-lokalisierten, inaktiven Proteinen. Deletion der beiden Transmembrandomänen führte zum Verlust des immunocytochemischen Signals [118]. An mutierten murinen Proteinen wurde die Wichtigkeit der ersten Transmembrandomäne (TMD) für die ER-Lokalisation gezeigt. Verschiedene GFP-Konstrukte, die die erste TMD noch enthielten, zeigten in Übereinstimmung mit den oben angesprochenen Experimenten eine ER-Lokalisation. Die Deletion beider TMD's führte zu einem stark reduzierten immunocytochemischen Signal, das nicht mit dem ER kolokalisiert war. Die Fusion nur der ersten TMD der nSMase an das GFP genügte, um eine ER-Lokalisation zu erhalten [130]. Aufgrund der gezeigten Lokalisation im ER ist eine Rolle der nSMase in Signalprozessen, die an der Plasmamembran initiiert werden, auszuschließen. Neuere Untersuchungen geben zwar Hinweise auf ein im ER lokalisiertes Signaltransduktionssystem, eine Beteiligung von Sphingomyelin-Metaboliten ist aber für diesen *pathway* nicht untersucht worden [197, 198].

Die Ergebnisse der an den nSMase-defizienten Mäusen durchgeführten Aktivitätstests machen es aber fraglich, ob diese Enzymklasse überhaupt an Signalvorgängen beteiligt sein kann. Zumindest in der Niere und im Herz wurden Aktivitäten geringfügig über dem Leerwert des Assays gemessen. Es wäre also nur möglich, daß noch eine durch einen Stimulus aktivierbare (z.B. durch Phosphorylierung) neutrale Sphingomyelinase in diesen Organen vorhanden ist.

Die an dem gereinigten, rekombinanten Enzym durchgeführten enzymatischen Charakterisierungen ergänzen die schon an Membranextrakten überexprimierender HEK293-Zellen gefundenen Ergebnisse zur Ionenabhängigkeit. Die Stimulation von neutralen Mg^{2+} -abhängigen Sphingomyelinasen durch Arachidonsäure [168] wurde auch für das gereinigte, rekombinante Enzym bestätigt. Die schwächere Stimulation der nSMase durch Fettsäuren verschiedenen Sättigungsgrades deutet aber eher auf eine Funktion in der Substratpräsentation bzw. in der Nachahmung von lipophilen, membranösen Strukturen, als auf eine direkte Stimulation hin. Solche Funktionen übernehmen z.B. in der aSMase die Saponindomänen, die zur Solubilisierung des Sphingomyelin beitragen [171]. Eine ähnliche Stimulation der enzymatischen Aktivität durch Fettsäuren wurde auch für die nSMase2 gezeigt [128].

Die gereinigte, rekombinante nSMase hydrolysiert das Phospholipid lyso-PC und dessen Ätheranalogon lyso-PAF (1-Alkyl-2-lyso-3-glycero-phosphorylcholin) im *in vitro* Assay zu 1-Acyl-Glycerol bzw. 1-Alkyl-Glycerol. In nSMase überexprimierenden HEK-Zellen wurde im Gegensatz zu Kontroll-Zellen eine Akkumulation von 1-Acyl-Glycerol bzw. 1-Alkyl-Glycerol gefunden, die Hydrolyse von Sphingomyelin konnte in den Zellen aber nicht nachgewiesen werden. Gründe für die nicht beobachtete SPM-Hydrolyse könnten eine strikte Regulation des Enzyms, ein limitierter Zugang zum Substrat unter Normalbedingungen oder eine spezifische Substratpräsentation, wie sie unter bestimmten physiologischen Bedingungen erfolgt, sein. Eine Substratpräsentation durch aktivierbare, saponinähnliche Proteine wäre ebenfalls denkbar. Auch eine Translokation des Enzyms aus dem ER an einen anderen Wirkort könnte möglich sein. Eine solche Translokation, zumindest durch Cytokininduktion, wurde aber nicht beobachtet (eigene Beobachtung und [196]).

Lysophospholipide erfordern im Gegensatz zum SPM im Sphingomyelinase Assay kein Detergenz. Diese Monoacyl(alkyl)phospholipide sind aufgrund der fehlenden Fettsäure wesentlich besser wasserlöslich, induzieren in Membranstrukturen mizellare Strukturen und führen zur Umorganisation der Lipiddoppelschicht [199]. Wegen derselben polaren Kopfgruppe und ihrem Detergenz-ähnlichen Verhalten kann ihr Umsatz ohne Detergenz im Assay-Ansatz erfolgen. Für das membranständige, hydrophobe Sphingomyelin ist die Solubilisierung und damit auch die Präsentation als Substrat *in vitro* aber nur in mizellarer Form möglich. Abgesehen von der für die lyso-Phospholipide erforderlichen artefiziellen Umgebung im Assay, waren auch wesentlich größere Enzymmengen erforderlich, um die beschriebene lyso-PC/lyso-PAF-Hydrolyse nachweisen zu können.

In den gezeigten Experimenten wurde die Sphingomyelinhydrolyse im enzymatischen Assay durch Freisetzung des wasserlöslichen, radioaktiv markierten Phosphorylcholins und Messung im Szintillationszähler quantifiziert. Die Messung der Aktivität gegen lyso-PC/lyso-PAF erfolgte aber durch dünnschichtchromatographische Auftrennung des an der Fettsäure markierten Hydrolyseproduktes Alkyl-Glycerol und dessen Detektion mittels *Phosphorimaging*. Die unterschiedlichen Meßmethoden schließen einen sinnvollen quantitativen Vergleich der Aktivitäten aus. Die enzymatische Aktivität gegen die lyso-Phospholipide wurde auch von anderen Gruppen für die Enzyme aus Maus, Mensch und Ratte gezeigt. Während von dem humanen Enzym lyso-PC und lyso-PAF in gleichem Maße wie SPM umgesetzt wurden [200], waren lyso-PC und lyso-PAF schlechtere Substrate als SPM für das Maus und Rattenenzym [126, 130]. Aus diesen Befunden wurde der Schluß gezogen, daß

die nSMase aus Säugern auch eine Lysophospholipase C ist [196, 200]. Das Hefe-Homolog der nSMase hydrolysiert die Lysophospholipide nicht [127].

Sphingomyelin wird nur in geringer Konzentration im ER gefunden, während der Phospholipid- und Plasmalogenmetabolismus zum größten Teil im ER abläuft [42, 201]. So könnten die an nSMase überexprimierenden HEK Zellen gefundene Alkyl-Glycerol Akkumulation ihre Gründe in der Hydrolyse von im Metabolismus der Phospholipide entstehenden Zwischenprodukten haben, die aus oben genannten Gründen einfacher zugänglich sind als das Sphingomyelin. Es ist weiterhin anzunehmen, daß diese Zwischenprodukte im Gegensatz zum Sphingomyelin in größerer Menge im ER vorhanden sind und sie daher vom überexprimierten Enzym metabolisiert werden.

nSMase-defiziente EMFIs zeigten bei Markierung mit lyso-PC und lyso PAF keine Akkumulierung dieser Substanzen. Dies wäre nach den an nSMase exprimierenden HEK Zellen erhaltenen Ergebnissen zu erwarten gewesen, wenn die nSMase eine Schlüsselposition im Abbau von lyso-Phospholipiden hätte. Die Metabolisierung der lyso-Phospholipide war in Zellen beider Genotypen ebenfalls nicht zu unterscheiden, was eine verstärkte Reacylierung als möglichen kompensatorischen Mechanismus ausschließt. Da über die Zelltypen bzw. Organe, in denen die Enzyme des lyso-Phospholipid- und Plasmalogenstoffwechsels lokalisiert sind, nur unzureichende Kenntnisse vorliegen und die beteiligten Enzyme noch nicht kloniert sind, kann eine zelltypspezifisch unterschiedlich verlaufende Metabolisierung von lyso-PC und lyso-PAF nicht ausgeschlossen werden. Auch von der nSMase ist nicht bekannt, ob sie nur in bestimmten Zelltypen exprimiert wird. Alle Versuche, das endogene Protein in Zelllinien oder Gewebeschnitten immunocytochemisch nachzuweisen, scheiterte an den zu geringen Proteinmengen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß das Enzym in den untersuchten *wt*-HEK Zellen gar nicht exprimiert wird. Ein Nachweis von nSMase Protein und RNA war in den Kontroll-Zellen nicht möglich [118]. Auch wurde keine Hydrolyse von lyso-PC/lyso-PAF zu Alkyl- oder Acyl-Glycerol beobachtet.

Ein physiologischer Abbau von lyso-PAF zu Alkyl-Glycerol in einer von einer Lysophospholipase C katalysierten Reaktion ist bis jetzt nicht bekannt. Beschrieben wurde stattdessen der Abbau über eine Phospholipase D, gefolgt von einer Phosphohydrolyse-Reaktion [202].

Eine einzige Lysophospholipase C-Aktivität ist bis jetzt beschrieben worden. Dieses aus MDCK-Zellen und Rattenmikrosomen angereicherte, Mg^{2+} -abhängige Enzym hydrolysiert Äther-verknüpfte Lysophosphoglyceride und ist an der Synthese von Cholinplasmalogenen

aus Ethanolaminplasmalogenen beteiligt. Untersuchungen zur Beteiligung am Sphingomyelinkatabolismus wurden nicht durchgeführt [203]. Aus den oben genannten Gründen ist es daher wahrscheinlich, daß die beobachtete Lysophospholipase C-Aktivität der nSMase nur ein *in vitro* Artefakt ist.

5.2 Generierung der nSMase-defizienten Mauslinie

Das Maus Gen enthält 10 Exons und erstreckt sich über nur 3.3 kb. Dies führte zu Schwierigkeiten bei der Klonierung der *targeting* Konstrukte:

1. müssen singuläre Schnittstellen für die Klonierung vorhanden sein. Somit mußten hier zwangsläufig homologe Sequenzen deletiert werden. 2. bestand durch Insertion des 1.8 kb großen *neo*-Gens in nur ein Exon die Möglichkeit, daß dieses herausgespleißt wird und 3. mußten noch große flankierende Sequenzbereiche vorhanden sein, um eine homologe Rekombination zu ermöglichen.

Eine Mutation nur des ersten Exons hätte zu einem funktionellen Protein führen können, da ExonII ebenfalls mit einem Methionin beginnt und ExonI keine für die enzymatische Aktivität wichtigen Aminosäuren enthält. Daher wurden bei der Konstruktion der Vektoren große Teile des Gens deletiert. Die Länge der Vektorarme wurde mit 3.8 kb bzw 4.5 kb am 5'-Ende und 2.2 kb am 3'-Ende so gewählt, daß die Voraussetzungen für eine homologe Rekombination gegeben waren [175]. Die Klonierung des Gens erfolgte aus einer isogenen genomischen Phagenbank, da die Verwendung isogener DNA die Häufigkeit für homologe Rekombinationsereignisse erhöht [204, 205].

Nach Elektroporation der Konstrukte in ES-Zellen verschiedener Linien wurden über 2000 Klone analysiert. Aus diesen wurden drei homolog rekombinierte Klone isoliert. Diese niedrige Frequenz könnte darin begründet sein, daß es an diesem Locus nur in geringem Maße zu Rekombinationsereignissen kommt [206]. Ungewöhnlich sind auch die geringe Größe des Locus und die kleinen Introns. Des weiteren scheint zumindest das Maus Gen in einer Umgebung mit hoher Dichte an Genen zu liegen. 50 bp vom Stopcodon des nSMase-Gens endet ein in *antisense* orientiertes Gen, das für ein von einem EST Klon abgeleitetes putatives Protein codiert [207].

Ein weiterer Faktor, der die homologe Rekombination beeinflussen könnte, liegt in der Verwendung von Intergensequenz als "homologer" Sequenz. Diese Bereiche sind keinem Selektionsdruck ausgesetzt, daher akkumulieren dort Mutationen stärker als in den kodierenden Sequenzen. Da das 5'-Fragment des Vektors durch PCR aus einem Phagenklon isoliert wurde, ist nicht auszuschließen, daß durch diese Reaktion ebenfalls Basenaustausche

eingefügt worden sind und somit die Homologie verringert wurde. Auch der nicht eindeutige Hintergrund der auf dem 129er Stamm beruhenden ES-Zellen und der Phagenbibliothek könnte für dieses Phänomen verantwortlich sein [208]. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, daß nur aus der Zelllinie CJ7 (129/Sv) homolog rekombinierte Klone isoliert wurden.

Injektion der Klone in CD1 und C57/Bl6-Blastozysten führte in beiden Fällen zu hochfellchimären Tieren. Nur aus C57/Bl6 Blastozysten wurden jedoch keimbahnchimäre Männchen erhalten, deren Keimbahn-Transmissionspotential aber sehr gering war. Diese Unterschiede sind auch schon in anderen Untersuchungen beobachtet worden [184, 209].

Eine Verbesserung des Keimbahn-Transmissionspotentials der ES-Zellen kann durch Subklonierung und Injektionen von *wt*-Zellen erfolgen. Dies ist außerdem eine Qualitätskontrolle sowohl für die Kulturbedingungen, als auch für die Pluripotenz der kultivierten Zellen.

5.3 Der nSMase-defiziente Phänotyp

Für die Etablierung der nSMase-defizienten Mauslinie wurden die fünf von den keimbahnchimären Männchen abstammenden heterozygoten Nachkommen verwendet. Diese geringe Anzahl und die Tatsache, daß drei dieser Nachkommen Weibchen waren, erschwerte die Expandierung der Zucht.

Die Ausschaltung des nSMase-Gens führte zu einem Verlust der spezifischen mRNA und des in *Western Blots* detektierbaren Proteins. Die mindestens 7 verschiedenen chimären Transkripte können nicht zu einem funktionsfähigen Protein führen, da sie nicht miteinander *in frame* sind und daher Translations-Stopsignale nach spätestens 30 Aminosäuren auftreten. Diese möglichen Polypeptide konnten im Western Blot nicht nachgewiesen werden. Sie werden wahrscheinlich direkt nach der Translation abgebaut.

Aus den *Northern Blot* Hybridisierungsanalysen kann auch der Schluß gezogen werden, daß vom starken PGK Promoter der *neo*-Box nur die Transkription der *neo* RNA initiiert wird. Die nachgewiesenen chimären RNA's enthielten alle das ExonI und die Signale im *Northern Blot* stimmten bei der Hybridisierung mit der nSMase-Sonde und mit der *neo*-Sonde überein. Es wurde für den PGK Promoter gezeigt, daß er die Transkription weit entfernt lokalisierter Gene beeinflussen kann. Dies kann aufgrund der hier gemachten Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden [147].

Während die enzymatische Aktivität im Gehirn durch die Ausschaltung des nSMase-Gens unbeeinflusst blieb, war die Aktivität in Niere und Herz nur noch geringfügig über dem

Leerwert des Assays meßbar. Die Existenz einer weiteren neutralen Sphingomyelinase ist daher in diesen Organen unwahrscheinlich.

Für die hohe Aktivität im Gehirn muß dagegen mindestens eine andere nSMase verantwortlich sein. Übereinstimmend mit diesen Befunden eluierten die neutralen Sphingomyelinase-Aktivitäten aus Mausgehirn bei einer Proteinreinigung durch MonoQ-Chromatographie in vier Fraktionen. Die Fraktion mit der niedrigsten Aktivität konnte durch *Western Blotting* der nSMase zugeordnet werden [195]. Es war auch nicht möglich durch Immunpräzipitation mit gegen die nSMase gerichteten Antikörpern die enzymatische Aktivität aus dem Gehirn zu präzipitieren. Dies gelang dagegen aus Nieren Extrakten zu 75 % [185]. Ein geeigneter Kandidat für die Gehirn-spezifische nSMase-Aktivität ist die nSMase2, deren RNA fast ausschließlich im Gehirn exprimiert wird [128]. Die aus Rinderhirn und aus Rattenhirn gereinigten Sphingomyelinasen sind weitere mögliche Kandidaten, da sie sich in ihren enzymatischen Eigenschaften, vor allem die Stimulation durch Phospholipide und Arachidonsäure unterscheiden [116, 117].

Die Frage, ob die in Leber und Lunge gemessenen Restaktivitäten von einer weiteren, eventuell plasmamembranständigen, neutralen Sphingomyelinase stammen oder Restaktivität der sauren Sphingomyelinase sind, kann nicht eindeutig geklärt werden. Leber und Lunge sind Organe mit großem Lysosomenanteil und sind in aSMase defizienten-Mäusen, dem Mausmodell der humanen Niemann-Pick Erkrankung TypA, die am stärksten betroffenen Organe [96]. Obwohl die Assays unter Bedingungen durchgeführt wurden, die die aSMase inhibieren sollten [70], könnte wegen der großen Proteinmengen die zur Detektion der nSMase Aktivität eingesetzt werden mußten, eine Restaktivität der aSMase zu den gemessenen Aktivitäten beigetragen haben.

Für die Existenz einer weiteren neutralen Sphingomyelinase spricht, daß neben der in Leber Mikrosomen gemessenen nSMase Aktivität auch eine Plasmamembranaktivität in diesem Organ beschrieben wurde [110]. In subzellulären Fraktionen aus Mauslebern konnte diese Plasmamembran Aktivität nur zu 30 % durch anti-nSMase Antikörper gefällt werden, während die mikrosomale Aktivität zu 80 % präzipitierbar war. Die Menge an präzipitierbarer Plasmamembranaktivität entspricht aber ungefähr dem Kontaminationsgrad dieser Fraktion durch die mikrosomale Fraktion [118]. Enzymatische Tests an subzellulären Fraktionen von Lebern nSMase-defizienter Tiere könnten Hinweise auf das Vorhandensein weiterer Sphingomyelinasen geben. Eine endgültige Klärung würde aber nur die Kreuzung der aSMase-defizienten Mauslinie in den *nsmase*^(-/-)-Stamm bringen.

Die Lipidextrakte verschiedener Organe der nSMase-defizienten Mäuse zeigten keine quantitativen Veränderungen des Lipid-Pattern. Sowohl die Sphingomyeline als auch die nach alkalischer Hydrolyse sichtbaren lyso-Plasmalogene und lyso-Ätherphospholipide zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *wt*- und *nsmase*^(-/-)-Tieren. Allerdings hat die Methodik der Dünnschichtchromatographie in diesem Zusammenhang einige Nachteile. Es muß eine große Menge Lipid eingesetzt werden, damit dieses nach der Veraschung sichtbar wird. Die Veraschung ist zwar quantitativ, aber densitometrische Auswertungen sind nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear. Ein weiteres Problem, gerade bei verseiften Extrakten, war die Standardisierung der Lipidmengen. Nach den vorherigen Beobachtungen war eine Änderung des Sphingomyelins und auch der Lysoplasmalogene anzunehmen. Daher konnte in den verwendeten Laufmittelsystemen nur noch die Normierung auf Cholesterin oder die in der Front laufenden Lipide erfolgen. Die Quantifizierung über einen internen Standard war ebenfalls nicht möglich, da sich die Laufeigenschaften z.B. eines kurzkettigen, synthetischen Phospholipides nicht so stark von den natürlichen Substanzen unterscheiden. Weiterhin wurden die Lipide aus dem gesamten Organ extrahiert, was die Erfassung geringer, lokaler Änderungen, z.B. im ER, ausschloß.

Die radioaktiven Markierungsexperimente an nSMase-defizienten EMFIs zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. In enzymatischen Assays wurde gezeigt, daß die EMFIs noch eine meßbare Restaktivität besitzen. Daher ist nicht auszuschließen, daß eine weitere nSMase den Verlust der Aktivität und eine eventuelle Akkumulation von Sphingomyelin kompensiert.

Die bisherigen Experimente machen deutlich, daß für weitere quantitative Lipidanalysen sensitivere Methoden verwendet werden müssen. Mit massenspektrometrischen Methoden, oder durch HPLC und Detektion durch das *light scattering* Verfahren wären gleichzeitig eine Quantifizierung und eine Standardisierung möglich. Beide Methoden wurden schon für die Quantifizierung von Sphingo- und Phospholipiden eingesetzt [210-214]. Ebenfalls sollten subzelluläre Fraktionierung mit nachfolgender Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten und der Lipidzusammensetzung einzelner Organellen weiterführende Aussagen ermöglichen. Da in den ersten funktionellen Analysen kein offensichtlicher Phänotyp festgestellt werden konnte, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um eventuelle kompensatorische Mechanismen aufzudecken. Diese Analysen wurden an Lebern durchgeführt, da dort der Phospholipid- und Cholesterinstoffwechsel gut charakterisiert ist und sich Hepatozyten für weitere Untersuchungen kultivieren lassen. Die über die Micro-Array Technik identifizierten, differentiell regulierten Gene lassen auf eine Veränderung im Lipid- und Sterolmetabolismus

dieser Tiere schließen. Die Ergebnisse sind aber nicht konsistent für einen *pathway*. So sind z.B. zwei *targets* der SREPBs, Fettsäure-Synthase und Steaoyl-CoA-Desaturase, positiv reguliert. Wenn es aber zu einer Induktion der ganzen Kaskade kommen würde, müßte es auch zu einer erhöhten Transkription der Gene für die HMG-CoA-Synthase oder der HMG-CoA-Reduktase kommen [215]. Beide Gene sind aber nicht unterschiedlich reguliert.

Ein interessantes, evtl. kompensatorisch reguliertes Gen ist das Nocturnin. Es gehört zur nSMase Superfamilie und wurde bisher für eine Nuklease gehalten [174]. Die erhöhte Expression dieses Gens könnte z.B. die in der Leber gefundene Restaktivität erklären. Neutrale Sphingomyelinase Aktivitäten sind auch in der Plasmamembran und in den Zellkernen von Hepatozyten beschrieben worden [110, 216]. Eine unterschiedliche Expression der hier gefundenen Gene ist z.T. auch in transgenen Mäusen, die den *scavenger* Rezeptor B1 überexprimieren bzw. in nullallelischen Tieren für das Apoprotein AI oder den ABC-Transporter 1 gefunden worden [217, 218]. Alle diese Proteine sind eng mit der zellulären Cholesterinhomöostase assoziiert. Diese Befunde weisen auf eine mögliche Beteiligung der nSMase an der Cholesterinhomöostase hin. Es ist aber nicht auszuschließen, daß auch individuelle Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Tieren zu einigen der gefundenen Expressionsunterschiede geführt haben. Falschpositive Ergebnisse können auch durch stammspezifische Polymorphismen entstehen. Die Tiere der generierten Mauslinie sind noch nicht genetisch identisch, sondern Mosaik aus dem ES-Zell-Stamm 129Sv und dem Blastozystenspender Stamm C57/Bl6. Ein Beispiel für einen solchen Polymorphismus ist das Gen TGN38B (Accession# D50032), daß in den *nsmase*^(-/-)-Tieren als nicht vorhanden definiert ist (*fold change* -4). Es ist bekannt, daß dieses Gen stammspezifisch sehr unterschiedlich exprimiert wird und in den Stämmen BALB/C, C57BL/6 und DBA/2 völlig fehlt [219].

Eine Reevaluierung dieser Daten mit einer größeren Anzahl von Tieren wird durch eine weitere DNA Chip Analyse erfolgen. Dabei werden, zusätzlich zu den in der ersten Analyse regulierten Genen, auch Gene aus dem Sphingolipidstoffwechsel, wie die erst kürzlich klonierten Ceramidasen, untersucht werden [73, 74]. Weiterhin wird die Analyse auch auf Tiere unterschiedlichen Alters und die Untersuchungen von Niere und Gehirn ausgedehnt werden.

5.4 Mögliche Funktionen der nSMase

Die phänotypischen Unauffälligkeiten der Tiere und die in den beschriebenen Experimenten nicht meßbaren Veränderungen im Lipidstoffwechsel könnten sich mit dem noch relativ

jugen Alter der untersuchten Tiere (8-16 Wochen) erklären lassen. Viele Mausmodelle schwerer metabolischer Störungen wie z.B. die *asmase*^(-/-)-Mäuse entwickeln erst in dem hier untersuchten Alter einen deutlichen Phänotyp [96]. Andere Modelle zeigen einen meßbaren Phänotyp erst unter bestimmten metabolischen Bedingungen oder einer bestimmten Diät [183, 217].

Aus den hier durchgeführten Experimenten kann daher abschließend nicht auf eine Funktion der nSMase *in vivo* geschlossen werden. Das in dieser Arbeit generierte nSMase-defiziente Mausmodell bietet aber die Möglichkeit, unterschiedliche zellbiologische, biochemische und physiologische Aspekte auf eine Beteiligung des Enzyms zu untersuchen.

Sphingomyelin und Cholesterin liegen in der Plasmamembran in einem konstanten Verhältnis vor [220]. Es ist denkbar, daß dieses Gleichgewicht in ähnlicher Art reguliert wird, wie es für das Cholesterin beschrieben ist [78]. So müßte eine Verminderung der Cholesterinmenge in der Plasmamembran zu einem Rücktransport von Sphingomyelin in das ER führen, wo es dann durch die nSMase degradiert wird. Ein solcher Rücktransport ist bisher aber nur für das Cholesterin gezeigt [82].

Ebenso könnte die nSMase eine Funktion in der Depletion von überschüssigem, neu synthetisiertem Sphingomyelin übernehmen, das dafür aus dem Golgi-Lumen zum ER transportiert werden müßte. Da aber die Lokalisation der Sphingomyelin-Synthase noch nicht genau geklärt ist [52], könnte die nSMase auch einen direkteren Zugriff auf das Substrat haben.

Eine weitere Funktion könnte der nSMase bei der Vesikelabschnürung oder Fusion zukommen. Es wurde eine Sphingomyelinase induzierte Vesikel-Membran-Fusion gezeigt [221, 222]. Sphingomyelinasebehandlung von Zellen induziert Endozytose und es wurde ferner beobachtet, daß sekretorische *Cop1-coated* Vesikel im Gegensatz zu ihren Donormembranen nur geringe Mengen an Sphingomyelin enthalten [212, 223, 224]. Bei einer essentiellen Aufgabe der nSMase in diesen Vorgängen wäre nicht mit lebensfähigen Tieren zu rechnen, so daß höchstens eine unterstützende Funktion angenommen werden kann.

Detailliertere zellbiologische und biochemische Untersuchungen, sowie die Kreuzung der nSMase-defizienten Mauslinie mit der in der Zucht befindlichen nSMase2-defizienten Linie werden die Frage klären, wie viele weitere neutrale Sphingomyelinasen es in der Maus gibt und damit tiefere Einblicke in deren *in vivo*-Funktion geben.

6. Material und Methoden

6.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle im Ergebnisteil beschriebenen molekularbiologischen Methoden, die hier nicht näher erläutert werden, wurden nach Sambrook *et al.* durchgeführt [225].

6.1.1 Präparation von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml *E. coli*-Übernachtskulturen nach der Methode von Birnboim präpariert [226]. Die Präparation von größeren Mengen (100-500 ml *E. coli*-Übernachtskulturen) erfolgte mit Hilfe von Qiagen tip-500 Säulen (Qiagen) bzw. Nucleobond-500-Säulen (Machery & Nagel) nach den Angaben der Hersteller.

6.1.2 Präparation von Phagen DNA

200 µl kompetente NM 538-Zellen wurden mit ca. 10^7 Phagen der entsprechenden Bank für 20 Minuten bei 37° C infiziert. Mit dieser Suspension wurden 200 ml LB-Medium (10 mM MgCl₂; 0.2 % Maltose) angeimpft und über Nacht bei 37° C geschüttelt. Nach Zugabe von 0.5 ml Chloroform wurde weitere 30 min bei 37° C geschüttelt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 x g und 4° C abgetrennt. Der Überstand wurde mit 200 µl DNase (10 mg/ml) und 300 µl RNase (10 mg/ml) versetzt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Es wurde dann mit festem NaCl eine Konzentration von 1 M und mit festem Polyethylenglykol (PEG) 6000 eine Konzentration von 10 % eingestellt und die Phagen für eine Stunde bei 4° C gefällt. Nach Zentrifugation bei 10.000 x g wurde aus dem Sediment mittels Qiagen tip-500 Säulen nach den Herstellerangaben die Phagen DNA gewonnen.

6.1.3 Präparation genomischer DNA aus ES Zellen

Für die Gewinnung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen wurden pro Loch einer 24-Loch-Kulturschale 500 µl Lysis-Mix (100 mM Tris-HCl pH 8.5; 5 mM EDTA; 0.2 % SDS; 200 mM NaCl) mit 100 µg/ml Proteinase K (Merck) eingesetzt. Nach Isopropanol-Fällung und Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA in 200 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,2) resuspendiert. Für eine Restriktionsanalyse wurden 50-100 µl, für eine PCR-Analyse 2 µl eingesetzt. Für 90 mm-Kulturschalen wurden 1.5 ml Lysis-Mix mit 150 µg Proteinase K verwendet und die DNA in 1 ml TE aufgenommen.

6.1.4 Präparation genomischer DNA aus Mausschwanz Biopsien

Für die Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen wurden ca. 1 cm der Schwanzspitze von 8 - 14 Tage alten Mäusen abgeschnitten und über Nacht in 700 µl Lysis-Mix (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1 % SDS) mit 250 µg Proteinase K bei 55° C inkubiert. Nach Isopropanol-Fällung und Waschen mit 70 % EtOH wurde die DNA in 200 µl TE aufgenommen. Für eine Restriktionsanalyse wurden 50 –70 µl DNA, für eine PCR- Analyse 2 µl eingesetzt.

6.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte durch Elektroelution, mit *Qiaex*-Suspension (Qiagen) oder Nucleospin-Säulen (Macherey & Nagel) jeweils nach Herstellerangaben.

6.1.6 Klonierungen

Die Präparation von kompetenten *E. coli* (DH5α) Zellen und die Transformationen erfolgten nach der Methode von Hanahan [227]. Alle weiteren für Klonierungen notwendige allgemeine molekularbiologische Methoden, wie Restriktionen oder Ligationen wurden entsprechend den Angaben der Enzymanbieter (Roche, *Life Technologies*, *NEB-Biolabs*, Gibco/BRL) durchgeführt.

6.1.7 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach einem PCR-basierten modifizierten Protokoll nach Sanger unter der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Abbruchnukleotiden auf einem ABI 377 (Applied Biosystems) sequenziert [228]. Für die *primer extension* Analyse wurde das *T7-Sequencing-Kit* (Pharmacia) nach Herstellerangaben verwendet. Für den Einbau der Radioaktivität wurde [α -³⁵S]-dATP verwendet und die markierten Fragmente auf einem denaturierendem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Makrophor, LKB)

6.1.8 RNA Präparation

Die Präparation der Gesamt-RNA aus Mausorganen bzw. Zellen wurde mit Trizol (Sigma) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. PolyA⁺ RNA wurde mit dem Oligotex mRNA-Kits (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben präpariert.

6.1.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem *random primed DNA labeling Kit* (Roche) und α [³²P]-dATP (*Amersham*, 30 μ Ci pro Ansatz). Oligonukleotide wurden mit T₄-Polynukleotid-Kinase (Gibco-BRL) am 5'-Ende mit ³²P markiert. Das Kinase Reaktionsgemisch enthielt in 20 μ l Gesamtvolumen:

20 pmol Oligonukleotid, 2 μ l 10 x Kinase-Puffer (500 mM Tris/HCl pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM EDTA), 30 μ Ci γ -[³²P]-ATP (*Amersham*), 10 U T₄-Polynukleotid-Kinase

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37° C inkubiert und nach Zugabe von 5 μ l t-RNA, 25 μ l 4 M Ammoniumacetat und 130 μ l Ethanol 96 %ig (-20° C) 15 min bei -80° C gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm (4° C) wurde das Sediment luftgetrocknet und in TE aufgenommen.

6.1.10 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Nukleinsäuren durch *Southern-Transfer* (alkalisch) auf *GeneScreenPlus* (*NEN Products*) oder *Qiabrane* (*Qiagen*) Membranen gemäß den Angaben des Herstellers übertragen.

Für einen *Northern-Transfer* wurden die RNA Proben in Probenpuffer (200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7, 50 % Formamid, 6 % Formaldehyd) gelöst, für zwei Minuten bei 65° C erhitzt und für die elektrophoretische Auftrennung auf denaturierende Agarosegele (6 % Formaldehyd, 1 x MOPS) aufgetragen. Der Transfer auf *GeneScreenPlus* Membranen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (10xSSC).

Nach mindestens 2 h Prähybridisierung (50 % Formamid, 1 % SDS, 2 x SSC, 10 % Dextransulfat 100 mg/ml Heringssperma (*P-L Biochemicals*)) bei 42° C wurden die *Southern-* und *Northern-Blots* über Nacht in 50% Formamid, 1% SDS, 2 x SSC, 10 % Dextransulfat und 1-6 x 10⁵ cpm [³²P]-markiertem Fragment hybridisiert. Die hybridisierten Membranen wurden bei RT zweimal für jeweils fünf Minuten mit 2 x SSC und anschließend für 15-45 Minuten bei 50-65°C mit 2 x SSC, 1 % SDS gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem Phosphorimager (*PhosphorImager SI 445*) und der entsprechenden *ImageQuant*-Software (*Molecular Dynamics*).

6.1.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Reaktion wurde in 50 μ l Ansätzen (je 10 mM dNTPs, je 10 pmol Oligonukleotide, 1-5 ng Plasmid-DNA-Matrize, 2 U Taq-DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine) in einem *Peltier Thermal Cycler* (*Biozym*). PCR

Reaktionen mit Pwo-Polymerase (Roche) wurden nach Herstellervorschrift durchgeführt. Zur Amplifikation genomischer Fragmente wurde das *Expand-High-Fidelity*-PCR Kit (Roche) nach den Herstellerangaben verwendet. Denaturierungs-, *Annealing*-, und Elongationszeiten wurden den jeweiligen Bedingungen angepaßt. Die *Annealing*-Temperatur wurde ca. 5°C unter der geschätzten Schmelztemperatur der Oligonukleotide festgelegt. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Länge des erwarteten PCR-Amplifikats (ca. 1 kb/min). Pwo-Amplifikate wurden im Anschluß an die PCR nach Zugabe von 10 nmol dNTPs und 2 U Taq-Polymerase 10 min bei 72°C inkubiert.

Zur Klonierung wurden die PCR-Fragmente entweder direkt in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) kloniert oder durch Extraktion aus TBE-Agarosegelen vorher gereinigt.

6.1.12 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für eine RT-Reaktion wurden 1-2 µg Gesamt-RNA bzw. 100-500 ng polyA⁺ RNA eingesetzt. In einem Volumen von 4.5 µl wurde die RNA für 5 min auf 75°C erhitzt und nach Zugabe von 0.5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Hexameren-Mix (50 mM; Roche), 1 µl 0.1 M DTT, 2 µl 5 x RT-Puffer (Gibco/ BRL), 0.5 µl RNase-Inhibitor (Promega) 2 min bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 µl SuperscriptII (Gibco/BRL) wurde der Ansatz 1 h bei 42° C inkubiert. Die gewonnenen *Template*-Mengen wurden für mehrere PCR-Reaktionen eingesetzt. Bei einigen RT-Reaktionen erfolgte vorher eine Inkubation mit RNase-freier DNase (Roche) für 30 min bei 37° C in 50 mM Tris pH 7.4, 5mM MgCl₂. Die RNA wurde durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation gereinigt und dann wie oben beschrieben weiter verwendet. Nach der RT-Reaktion wurden die umgeschriebenen cDNA's für 30 min mit RNaseH (Roche) inkubiert.

6.1.13 Primer Extension Analyse

40 pmol Oligonukleotid wurden endständig radioaktiv markiert und nach Fällung in 50 µl 0.3 M NaOAc aufgenommen. 1 x 10⁶ CPM (2 µl) des Oligonukleotids und 5 µg mRNA wurden mit H₂O auf 100 µl verdünnt und mit 10 µl 3M NaOAc und 280 µl EtOH bei -20° C gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 4° C, 14.000 rpm) wurde das Sediment 30 min luftgetrocknet und in 15 µl S1-Puffer (80 % Formamid, 40 mM Pipes pH 6.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Der Hybridisierungsansatz wurde 10 min bei 70° C erhitzt, 3 min auf 25° C abgekühlt und dann üN bei 30° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Hybride gefällt und das Sediment für die *primer extension* in 50 µl RT-Puffer (Gibco/BRL) gelöst. Nach zweiminütiger Inkubation bei 37° C wurde 2 µl SuperscriptII (Gibco/BRL) zugegeben und der Ansatz 2 h bei 42° C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl RNase

((10 mg/ml), 30 min 37° C), wurde der Ansatz phenolisiert und gefällt. Zur Auftrennung der *primer-extension*-Produkte wurden das Sediment mit 4 µl TE und 4 µl *stop-solution* (T7-*Sequencing-Kit*, Pharmacia) aufgenommen und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

6.2 Affymetrix DNA Chip Analyse

Die RNA Präparation aus Mausorganen erfolgte mit Trizol (Sigma). Die RNA wurde nach der Ethanolpräzipitation einer weiteren Aufreinigung mit dem RNAeasy Midi-Kit (QIAGEN) unterzogen.

Doppelsträngige cDNA wurde aus 30 µg der so gereinigten RNA mit den *SuperScript Choice System* (Gibco BRL) nach den Herstellerangaben synthetisiert. Dafür wurde ein HPLC gereinigtes Oligonukleotid verwendet, das die Sequenz der T7-Polymerase Bindungsstelle in *antisense* Orientierung, gefolgt von einer poly-dT Sequenz enthält (T7(dT₂₄)).

Die doppelsträngige cDNA wurde mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen) gereinigt. Die *in vitro* Transkription zur Herstellung der biotinylierten cRNA wurde mit dem *BioArrayTM HighYieldTM RNA Transcript Labelling Kit* (Enzo Diagnostics, Farmingdale) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Nach Aufreinigung der cRNA mit *RNAeasy* Mini-Säulen (Qiagen) wurde die Größenverteilung und die Konzentration der cRNA mit einem Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt.

Die Fragmentierung der cRNAs wurde im Volumen von 40 µl in Fragmentierungspuffer (40 mM Tris-Acetat pH 8.1, 100 mM KOAc, 30 mM MgOAc) für 35 min bei 94° C durchgeführt. Aliquots wurden auf eine komplette Fragmentierung überprüft.

Eine Test Chip Hybridisierung erfolgte mit 5 µg fragmentierter cRNA. Für die Hybridisierung des MG-U74A Chips wurden 15 µg cRNA eingesetzt. Die Hybridisierungen, sowie alle Färbe- und Waschschrte erfolgte nach Protokollen des Herstellers (Affymetrix Inc. Santa Clara) mit den dafür erforderlichen Geräten (Fluidics Station, Array Scanner) an der Universität Münster, Institut für Artheroskleroseforschung, AG Dr. Funke.

Zur Auswertung der Rohdaten (.dat Dateien) wurde die MicroArray Suite 4.1.Sofware (Affymetrix Inc, Santa Clara) verwendet.

6.3 Biochemische Methoden

6.3.1 nSMase-Aktivitätsmessung

Als Substrat dienen $[\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Sphingomyelin (6000 -10000 dpm/nmol) [229]. Vor der Verwendung im Assay wurde das Substrat in Chloroform/Methanol 2:1 (v:v) gelöst und mit 0.1 M Natriumacetat, pH 4.5 ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die organische Phase unter Stickstoff zur Trockene eingengt und anschließend in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 0,05 % Triton X-100 aufgenommen. Protein Aliquots wurden in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 0,05 % Triton X-100, 5 mM DTT 1 x Complete™ (ohne EDTA, Roche) und 10 nmol $[\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Sphingomyelin in einem Gesamtvolumen von 200 μl 15 - 30 min bei 37° C inkubiert. Messungen der aSMase-Enzymaktivität unterschieden sich vom nSMase-Assay nur durch die Verwendung eines sauren Reaktionspuffers (0.1 % Triton X-100, 0.1 M Na-Acetat, pH 4.5). Nicht umgesetztes Substrat wurde nach Zugabe von 100 μl ddH₂O und 800 μl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) extrahiert. 100 μl Aliquots der wässrigen Oberphase wurden mit 5 ml Ultima-Gold™ (Packard) Szintillationslösung versetzt und in einem Szintillationszähler (Wallac 1409) gemessen. Die eingesetzten Enzymmengen wurden so variiert, daß ein Substratumsatz von 10-20 % nicht überschritten wurde.

6.3.2 Lyso-PC-PLC und Lyso-PAF-PLC Aktivitätsmessungen

$[\text{1-}^{14}\text{C-Palmitoyl}]$ -lyso-PC (55 mCi/mmol) und $[\text{1-O-Octadecyl-}^3\text{H}]$ -lyso-PAF (167 mCi/mmol) (Amersham) wurden unter N₂ eingedampft und in 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 0.05 % Triton X-100, gelöst und mit nicht-radioaktiver Substanz eine Konzentration von 1 nmol / μl eingestellt. Für die Aktivitätstests wurden unterschiedliche Proteinmengen 30 min mit je 10 nmol lyso-PC (ca. 52.000 DPM), bzw. 10 nmol lyso-PAF (ca. 220.000 DPM) in 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 1 x Complete™ (ohne EDTA, Roche) inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 μl ddH₂O und 800 μl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) ausgeschüttelt, die organische Phase unter N₂ zur Trockene eingengt und in 30 μl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) gelöst. Die gesamte Menge wurde auf HPTLC Kieselgel Platten (Merck) aufgetragen und das Chromatogramm im Laufmittelsystem Chloroform/ Methanol/H₂O (65:25:4, v/v/v) entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgt mit einem Phosphorimager (*PhosphorImager SI 445*) und der entsprechenden *ImageQuant*-Software (*Molecular Dynamics*).

6.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinlösungen mit einem Detergenzgehalt bis zu 0.1 % wurden nach der Vorschrift von Bradford quantifiziert [230]. Hierbei wurden Doppelproben von je 10 µl mit 200 µl der Färbelösung (0.06 % Coomassie G-250 in 1.9 % Perchlorsäure) in 96-Loch-Platten gemischt und in einem ELISA-Reader (EAR 400 AT, SLT Labinstruments) bei 620 nm ausgewertet. Proben mit höherem Detergenzgehalt aber ohne DTT wurden mit Hilfe des BCA-Standard-Tests bei 562 nm quantifiziert [231]. Als Standard dienten BSA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen in Probenpuffer.

6.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden je nach Größe in 10 - 15%igen Polyacrylamidgelen nach dem Protokoll von Laemmli gelelektrophoretisch aufgetrennt [232]. Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue (0.1 % Coomassie R-250 (Serva) in 10 % Essigsäure, 40 % Methanol).

6.3.5 Extraktion von Membranproteinen aus adhärenen HEK293-Zellen

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem *rubber-policeman* von den Platten abgelöst, in Eppendorfgefäße überführt und durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 960 x g sedimentiert. U937-Zellen wurden 5 min bei 200 x g sedimentiert, nach Absaugen des Mediums in PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Absaugen des PBS bei -80°C gelagert oder direkt weiter verwendet.

Zur Extraktion wurden die Zellen in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 x Complete™ ohne EDTA (Roche) resuspendiert und durch dreimaliges Schockgefrieren aufgebrochen. Die rohe Membranfraktion wurde durch fünfminütige Zentrifugation des Lysats bei 2.700 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1x Complete™ ohne EDTA (Roche), 0.2 % Triton X-100) aufgenommen, kräftig geschüttelt und 15 min bei 4° C über Kopf gerollt. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde 20 min bei 100.000 x g (4° C) zentrifugiert. Zur Lagerung bei -20° C ohne nSMase-Aktivitätsverlust wurde in den Extrakten eine Glycerin-Konzentration von mindestens 20 % eingestellt.

6.3.6 Extraktion von Membranproteinen aus Mausgewebe

Organe wurden in 1.5 bis 3 ml Homogenisierungspuffer (50 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 5 mM DTT, 0.32 M Sucrose, 2 x Complete™ ohne EDTA (Roche) in einem Elvehjem-Potter durch 5-6 "strokes" bei ca. 1200 rpm homogenisiert. Zellkerne und Bindegewebe wurden in 10 min bei 900 x g sedimentiert. Der Überstand wurde eine Stunde bei 100.000 x g zentrifugiert und das Sediment in 200-500 µl Extraktionspuffer (Homogenisierungspuffer + 0.5 % Triton X-100) resuspendiert und die Proteine eine Stunde bei 4° C im Überkopfschüttler extrahiert. Unlöslich Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min bei 100.000 x g (4° C)) sedimentiert. Die so angereicherten Membranproteine wurden für enzymatische Aktivitätstests oder für *Western Blot* Analysen verwendet. Zur Lagerung bei -20° C ohne nSMase-Aktivitätsverlust wurde in den Extrakten eine Glycerin-Konzentration von mind. 20 % eingestellt.

6.3.7 Affinitätsreinigung der nSMase aus stabil transfizierten HEK293-Zellen

Für eine Aufarbeitung wurden 10 150 mm-Petrischalen mit konfluent gewachsenen Zellen verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, von den Platten abgelöst und bei 200 x g 5 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 3 ml Lysispuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1x Complete™ ohne EDTA, (Roche) resuspendiert und durch dreimaliges Schockgefrieren lysiert. Durch fünfminütige Zentrifugation (2.700 x g, 4° C) wurde aus dem Zelllysate eine rohe Membranfraktion gewonnen. Hieraus wurden durch 15 min Inkubation mit 1 - 2 ml Extraktionspuffer (Lysispuffer + 0.2 % Triton X-100) bei 4° C im Überkopfschüttler die Membranproteine extrahiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 100.000 x g, 4° C) entfernt. Der Extrakt wurde auf 2 mM Imidazol eingestellt und auf eine mit Extraktionspuffer äquilibrierte Mini-Talon-Säule (Säulenmaterial Clontech) (Bettvolumen 0.25 - 0.5 ml) aufgetragen. Durch Rezirkulierung wurde die Ausbeute des spezifisch an die Säule gebundenen Proteins deutlich erhöht. Die Säule wurde anschließend mit Extraktionspuffer und Waschpuffer (12 mM Imidazol in Extraktionspuffer) solange gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr nachweisbar war. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit 100 mM Imidazol im Extraktionspuffer (200 µl Fraktionen).

6.3.8 Lipidanalyse

Lipidextraktion aus Zellen

Die Lipidextraktionen aus Zellen und Organen erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer [233].

HEK Zellen, bzw. EMFIs wurden mit einmal mit PBS gewaschen und in PBS mit einem *rubber policeman* von der Kulturschale gekratzt. Nach Sedimentation (960 x g, 5 min) wurden die Zellen in 0.5 ml H₂O resuspendiert und in ein Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 1.5 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) und 0.4 ml 1 M NaCl wurde unter wiederholtem kräftigen Mischen (vortex) 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 0.5 ml 1 M NaCl und 0.5 ml Chloroform wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die organische Phase wurde unter N₂ zur Trockene eingengt und in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) gelöst.

Lipidextraktion von Organen

Die Maus-Organen wurden in 1 ml PBS mit einem Elvehjem-Potter durch 5-6 "strokes" bei ca. 1200 rpm homogenisiert. Es wurden 3 ml Chloroform/Methanol 1:2 (v/v) und 0.8 ml 1 M NaCl zugegeben und das Gemisch unter wiederholtem kräftigen Mischen (vortex) 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 1 ml Chloroform und 1 M NaCl wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die organische Phase unter N₂ zur Trockene eingedampft und in Chloroform/Methanol 2:1 gelöst.

Darstellung der alkali-stabilen Lipide

Für die Darstellung der alkalistabilen Lipide wurden die Gesamtlipid-Lösung unter N₂ zur Trockene eingedampft, in 1 ml 0.5 N methanolischer KOH gelöst und für 1-2 h bei 37° C hydrolysiert. Nach Zugabe von 1 ml H₂O wurden die Lipide mit 1 ml Chloroform extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die Unterphase in ein frisches Röhrchen überführt und die Oberphase erneut mit 1 ml Chloroform/Methanol 2:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter N₂ zur Trockene eingedampft und in Chloroform:Methanol (2:1) gelöst.

Dünnschichtchromatographie

In Abhängigkeit der aufzutrennenden Lipide wurden die Proben in verschiedenen Laufmitteln auf HPTLC Kieselgel 60 Platten (Merck) aufgetrennt.

Gesamt- und alkalistabile Lipide wurden in den Laufmitteln Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4 v/v/v), und Chloroform/Methanol (15:1) aufgetrennt. Zur gleichzeitigen Darstellung von Sphingomyelin und Ceramid, bzw. lyso-PC/lyso-PAF und Alkyl/Acyl-Glycerol wurden die Dünnschichtplatten ca. 8 cm im Laufmittel Chloroform/Methanol/H₂O (65:25:4 v/v/v), entwickelt. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Platten dann im Laufmittel Chloroform/Methanol (15:1) entwickelt. Zur schärferen Trennung der Phospholipide wurde alternativ 8 cm in Chloroform/Methanol/ 2 N NH₄OH (65:35:5), gefolgt vom Laufmittel Chloroform/Methanol (15:1) entwickelt. Zur Analyse zuckerhaltiger Lipide wurden diese mit

Chloroform/Methanol/2 N NH₄OH (65:35:5) oder Chloroform/Methanol/15mM CaCl₂ (65:35:8) aufgetrennt.

Die aufgetrennten Gesamtlipide wurden mit 50 % H₂SO₄ besprüht und bei 120° C verascht. Phospholipide wurden mit Zinzadze-Reagenz angefärbt [234], Amin-haltige Lipide mit Ninhydrin und zuckerhaltige Lipide durch Orcin-Färbung dargestellt[235].

6.3.9 PARP Spaltung

5 x 10⁶ U937-Zellen wurden in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät und 3 h in je 2 ml frischem Medium bei 37° C 5 % CO₂ inkubiert. Nach Stimulation über verschiedenen Zeiten mit 200 ng/ml humanem TNF- α (6.6x 10⁶ Units/mg, BASF-Knoll) und 10 μ g/ml Cycloheximid (Sigma) wurden die Zellen 3 min bei 960 x g sedimentiert, mit PBS gewaschen und in 150 μ l Probenpuffer (Herstellerangabe Roche) 10 min bei 100°C inkubiert. Die so extrahierten Proteine wurden auf 10 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und einer *Western Blot* Analyse unterzogen (1. Antikörper: Anti-PARP, Roche, 1:2.000 in 1 % BSA, 0.1 % NP40, PBS, 2. Antikörper: Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat, Sigma, 1:30.000 in 1 % BSA, 0.1 % NP40, PBS).

6.3.10 FACS Analyse

Es wurden 1 x 10⁶ U937 Zellen für 2, 4, 6, 8 und 18 Stunden mit 200 ng/ml hTNF- α und 10 μ g/ml Cycloheximid inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min 320 x g) wurden die Zellen in in PBS mit 1 % BSA und 20 μ g/ml 7-Aminoactinomycin D (Sigma) resuspendiert und 20 min im Dunkeln auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 1 ml Annexin-Puffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) wurden die die Proben zentrifugiert und die Sedimente in Annexin Puffer mit 10 μ g/ml Annexin V-FITC (Alexis) sedimentiert und 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach Verdünnung mit einem gleichen Volumen Annexin-Puffer wurden die Zellen mit einem FACScan (Becton Dickinson) und der dazugehörigen CellQuest Software analysiert.

6.3.11 NF- κ B electrophoretic mobility shift assay

Die Extraktion von Kernproteinen aus mit 100 ng/ml TNF- α stimulierten EMFIs und die *band-shift* Analysen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt [236].

6.3.12 Aktivitätsmessungen der Proteinkinasen ERK1 und JUN2

Die Aktivitätsmessungen der Proteinkinasen erfolgte durch Immunpräzipitation der Kinasen und anschließende *in vitro* Phosphorylierung der Substrate MBP (ERK1), bzw. Gst-cJun

(JNK2) mit γ -[³²P]-ATP gemäß den Herstellerprotokollen (ERK1-CT, Upstate Biotechnology, JNK2-FI, Santa Cruz Biotechnology)

6.4 Zellkultur Methoden

6.4.1 Präparation von embryonalen Fibroblasten

Eine Maus wurde am 16. Tag der Schwangerschaft durch Genickbruch getötet, die Uteri mit den Embryonen steril entnommen und in eine Kulturschale mit PBS überführt. Der Kopf und die inneren Organe der Embryonen wurden entfernt und der restliche Körper zerkleinert, in 5 ml 37°C warmer Trypsinlösung (0,05% Trypsin/PBS/EDTA (200 µg/ml)) aufgenommen und mit Hilfe einer 10 ml Spritze durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. Die Zellen wurden dann durch Rühren mit Glaskugeln in 30ml warmer Trypsinlösung (0,05% Trypsin/PBS/EDTA (200 µg/ml)) für 30 min vereinzelt, in EF-Medium aufgenommen, bei 200 x g zentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und auf 150mm Kulturschalen ausgesät (Passage 1).

6.4.2 Kultivierung und Transfektion von embryonalen Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten wurden in DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin auf gelatinisierten Kulturschalen in 5 % CO₂ bei 37° C in einem Brutschrank kultiviert. 10⁷ exponentiell wachsende Zellen wurden mit 20-40 µg Plasmidvektor bei 500 V und 960 µF elektroporiert auf Kulturschalen oder Poly-L-Lysin beschichtete *chamber slides* ausplattiert und nach 12-48 Stunden analysiert.

6.4.3 Kultivierung und Transfektion von HEK Zellen

HEK293 Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat kultiviert. Für eine Transfektion wurden ca. 10⁶ bis 10⁷ Zellen mit dem DNA-Vektor in 0.8 ml Kulturmedium bei 450 V und 250 µF elektroporiert und anschließend auf Kulturschalen oder auf mit Poly-L-Lysin beschichtete *chamber slides* ausplattiert. Für eine transiente Expression wurden die Zellen mit ca. 20 µg Plasmid elektroporiert und nach 12-48 h verwendet.

6.4.4 Kultivierung und Transfektion von PC-12 Zellen, SH-SY5Y Zellen und COS Zellen

Cos-Zellen wurden in DMEM mit 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin kultiviert. Elektroporationen erfolgten mit 450 V und 250 µF

Adrenale Phäochromocytom Zellen der Ratte (PC12) wurden in RPMI 1640 mit 5 % FCS, 10 % Pferde Serum, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Elektroporationen erfolgten mit 250 V und 250 μ F

Humane Neuroblastom Zellen (SH-SY5Y) wurden in DMEM mit 20 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin kultiviert. Transfektion erfolgte mit 450 V und 250 μ F.

6.4.5 Kultivierung von U937-Zellen

U937 Zellen wurden in RPMI 1640 (Gibco-BRL) als Suspensionskultur mit 10% FCS, 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin, 0.03% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturflaschen auf einem Schwenktisch kultiviert.

6.4.6 Kultur und Konservierung von embryonalen Stammzellen

Die nicht näher beschriebenen Methoden wurden nach Hogan *et al.* durchgeführt [237].

Embryonalen Stammzellen wurden bei 37° C und ca. 5 % CO₂ auf teilungsinaktiven embryonalen Fibroblasten bzw. auf Gelatine in Zellkulturschalen (*Nunc, Costar*) verschiedener Größe (\varnothing : 1-90 cm) kultiviert. Das verwendete ES-Zell-Medium bestand aus DMEM, 20 % FCS (Fötale Kälberserum *ES-cell tested, Life Technologies*), 1000 U/ml LIF (Leukozyten-inhibierender-Faktor, ESGROTM, *Life Technologies*), 10⁻⁴ M 2-Mercaptoethanol, 1 % 100 x MEM-*nonessential amino acids*, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin. Während der Kultivierung wurden die ES-Zellen alle zwei bis drei Tage mit 0.05 % Trypsin/0.02 % EDTA in PBS (1.5 ml pro 90 cm Kulturschale) abgelöst, vereinzelt und je nach Konfluenz 1:5 bis 1:20 gesplittet.

Die Kryokonservierung von ES-Zellen in 24-Loch-Kulturschalen wurde nach der Methode von Chan und Evans durchgeführt [238]. Expandierte Zellen wurden nach Behandlung mit Trypsin und Zentrifugation in *Cryo-tubes* (*Nunc*) eingefroren und für eine längere Lagerung im flüssigen Stickstoff transferiert [176]. Das Einfriermedium enthielt neben den bereits beschriebenen Bestandteilen zusätzlich 10 % DMSO.

6.4.7 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Für eine Elektroporation wurden 1-2 x 10⁷ Zellen verwendet. Zusammen mit dem linearisierten DNA-Konstrukt (20-40 μ g) wurden die ES-Zellen in 0.8 ml ES-Zell Medium suspendiert und in eine Elektroporationsküvette (0.4 cm, *Bio-RAD*) überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT bzw. auf Eis wurden die Zellen mit 180-220 V und 500 μ F elektroporiert (*GenePulser, Bio-RAD*). Nach weiteren fünf Minuten bei RT oder auf Eis

wurden die elektroporierten Zellen in 10 ml ES-Zell-Medium suspendiert und auf fünf Fibroblasten-beschichteten 90 cm Kulturschalen verteilt. 24 Stunden nach der Elektroporation wurde das ES-Zell-Medium durch Selektionsmedium ersetzt: eine Schale mit nicht elektroporierten Zellen als Kontrolle für die Selektionseffizienz und vier Schalen mit elektroporierten Zellen wurden mit ES-Zell-Medium mit 400 µg/ml G418 (Geneticin (G-418 Sulfat) Sigma) und 2 µM Ganc (Cymenen, *Syntex GmbH*) überschichtet, während die fünfte Schale zur Berechnung des GanC-Anreicherungsfaktors nur mit Medium und 400 µg/ml G418 überschichtet wurde. Das Medium wurde im 24 Stunden-Rhythmus gewechselt, wobei die Ganc-Selektion nach fünf Tagen beendet wurde. Nach Absterben der Klone auf der Kontrollplatte wurden die G418/GanC-resistenten ES-Zell-Klone nach neun bis elf Tagen mit der Pipette unter mikroskopischer Kontrolle gepickt, trypsinisiert und zur weiteren Expansion auf Fibroblasten-beschichtete 24-Loch-Kulturplatten transferiert. Für die Analyse der genomischen ES-Zell-DNA wurde ein Aliquot der Klone auf gelatinierte 24-Loch-Kulturplatten ausgesät, während der Rest nach Kultivierung auf 24-Loch Platten bis zur abgeschlossenen Charakterisierung bei -70°C eingefroren wurde.

6.4.8 Karyotypisierung der ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden auf embryonalen Fibroblasten ausgesät, expandiert und für die Karyotypisierung auf Gelatine-beschichtete 90 mm Zellkulturplatten gesplittet. Die Zellen wurden mit 5 ml ES-Zellmedium und 33 µl Colchicinlösung (*Demecolcine solution*; Sigma) überschichtet und für 50 min bei 37° C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablösen der ES-Zellen mit Trypsin wurden sie 10 min bei 500 x g zentrifugiert und in 4 ml 0.56 %ige KCl, die sukzessiv zugegeben wurde, vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde ca. 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in einem möglichst kleinen Volumen wurden 2 ml eiskalter Fixierlösung, Methanol:Eisessig (3:1), tropfenweise zugegeben, 5 min bei RT inkubiert und 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Fixierung wurde zweimal wiederholt, bevor das Präzipitat in ca. 0.5 ml Fixierlösung resuspendiert wurde und mit einer Pasteurpipette aus 10-15 cm Höhe auf Objektträger getropft wurde. Zum Anfärben der Chromosomensätze wurden die Objektträger für 1 min in Giemsa-Färbelösung (*Giemsa stain-500*, Sigma) geschwenkt, zweimal mit H₂O gewaschen und nach dem Trocknen mit Entellan NEU (Merck) eingedeckelt. Für die Charakterisierung der ES-Zellklone wurden mindestens 30 Chromosomensätze ausgezählt.

6.5 Immunologische Methoden

6.5.1 Western Blot

Nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteinfractionen wurden diese durch Semi-Dry-Elektroblot (Sartoblot II S; Sartorius) auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) bei 1 mA/cm^2 über 2-3 h transferiert (Puffer A: 0.3 M Tris pH 10.4, 20 % MeOH; Puffer B: 25 mM Tris pH 10.4, 20% MeOH; Puffer C: 25 mM Tris pH 9.8, 20 % MeOH, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure) [239, 240]. Der Erfolg des Transfers wurde durch Ponceau-S Färbung überprüft (0.1 % Ponceau S in 1 % Essigsäure). Die Membran wurde mit 0.2 N NaOH entfärbt und nach gründlichem Waschen mit Wasser zur Absättigung freier Bindungsstellen ∞ in PBS / 3 % fettfreiem Milchpulver/ 0.2 % Tween-20 bei 4° C inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti mnSMase LT, 1 mg/ml, 1:500 verdünnt) in PBS / 3 % BSA bei RT wurde dreimal mit PBS / 0.1 % NP40 und dreimal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Anti Kaninchen-IgG Peroxidase-konjugiert, Sigma, Verdünnung 1:15.000) in PBS, 1 % BSA, 0.1 % NP40 für eine Stunde bei RT wurde erneut gewaschen (3 x PBS/ 0.1 % NP40, 3 x PBS). Nach 10-minütiger Inkubation mit SuperSignal Substrat (Roche) wurde die Chemilumineszenz durch Auflegen von Röntgenfilmen detektiert.

6.5.2 Immunfärbungen an Gefrierschnitten und Paraffinschnitten

Mäuse wurden anästhesiert und über den linken Herzventrikel mit 4% Paraformaldehyd in PBS perfundiert. Nach Präparation der Organe wurden diese drei Stunden in der gleichen Lösung nachfixiert und über Nacht in 0.5 M Sucrose bei 4°C inkubiert. Vor dem Schneiden wurden die Organe bei -20°C in O.C.T. (*Tissue Tek, Miles Scientific*) eingebettet. Bei einer Kammertemperatur von -20°C wurden 8-10 μm Schnitte mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Vogel, Typ AS 650) angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus) aufgezogen. Die beschichteten Objektträger wurden ca. 10 min in PBS/4 % Paraformaldehyd eingelegt, mit PBS gewaschen und getrocknet. Vor einer Lagerung bei -20°C wurden die Objektträger für jeweils fünf Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und reinem Alkohol dehydratisiert und vor Gebrauch mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert.

Die rehydratisierten Objektträger wurden mehrfach mit PBS gewaschen, mit 0.5 % Triton X-100/PBS lysiert und für 1 h mit 3 % BSA in PBS blockiert. Nach Inkubation des ersten Antikörpers in PBS/3 % BSA/ 0.1 % Triton x-100 für 1 h oder ∞ , dreimaligem Waschen in

PBS/0.5 % Triton X-100 und einstündiger Inkubation des zweiten Antikörpers in PBS/3 % BSA für 1 h wurde erneut dreimal gewaschen und die Objektträger mit Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt.

Für Paraffinschnitte wurden die wie oben behandelten Organe im Institut für Neuropathologie der Universität zu Köln vollautomatisch in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden mit einem Mikrotom (Vogel, AS300) angefertigt. Vor der Färbung der Schnitte wurden diese für 2 x 5 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Immunfärbung wurde wie für Kryoschnitte beschrieben durchgeführt.

6.5.3 Immunfärbungen an HEK Zellen und embryonalen Fibroblasten

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasobjektträgern (0.75 cm² pro Kammer; FALCON *CultureSlide*) kultiviert. Nachdem die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht hatten, wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Die Zellen wurden mit 0.5 % Triton X-100/PBS für 15 min lysiert und für 30 min mit PBS/3 % BSA blockiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem ersten Antikörper in PBS/ 3 % BSA/ 0.1 % Triton X-100 für 1 h bei RT inkubiert und dreimal mit 0.5% Triton/PBS und dreimal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation des zweiten Antikörpers (Cy3- bzw. Cy2-gekoppeltes anti-Kaninchen- oder anti-Maus-IgG-Konjugat; *Jackson Immuno Research Inc.*) in PBS/3 % BSA/0.1 % Triton X-100 wurde erneut dreimal mit PBS /0.5 % Triton X-100 und zweimal mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt und mit einem Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskop analysiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics) und der entsprechenden Software C4742-95-Twain Interface Version 3.0 aufgenommen.

Für Doppelfärbungen wurden die jeweiligen ersten Antikörper gemeinsam für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurde zuerst mit Cy3-gekoppeltem anti-Kaninchen Antikörper (Jackson, 1:800) inkubiert, gewaschen und anschließend mit Cy2-gekoppeltem anti-Maus Antikörper (Jackson, 1:500) inkubiert. Die Bilder wurden an einem konfokalen Mikroskop (Leica DM Irbe/TCS SP) aufgenommen.

6.5.4 Analyse der EGFP-Fluoreszenz

Mit dem EGFP-nSMase Vektor transfizierte Zellen wurden 12-48 Stunden nach der Transfektion mit PBS gespült, unter PBS gehalten und mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40 x Zeiss) lebend dargestellt. Alternativ wurden die Zellen 15 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und mit *rubber cement* oder Glyceringelatine (Merck) unter einem Deckglas

eingedeckelt. Die Zellen wurden mit einem Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskop analysiert. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu Photonics) und der entsprechenden Software C4742-95-Twain Interface Version 3.0 aufgenommen. Für Doppelfärbungen wurden die Zellen nach der Fixierung mit 0.5 % Triton X-100 / PBS für 15 min lysiert. Die Inkubation mit den gegen die Organellen gerichteten Antikörpern erfolgte in PBS/ 3 % BSA/ 0.1 % Triton X-100 für 1 h bei RT. Nach dem Waschen (3 x PBS/ 0.1 % Triton X-100, 3 x PBS) wurden die Zellen mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus-Cy3, Sigma, 1:300) in PBS/ 3 % BSA für eine Stunde inkubiert und nach erneutem Waschen mit Glyceringelatine eingedeckelt.

6.6 Methoden zur *in-vivo*-Mutagenese

6.6.1 Isolation und Injektion der Blastozysten

Die Blastozysten für die Injektionsexperimente wurden aus fünf bis acht Wochen alten CD1 oder C57/Bl6 Mäusen 3.5 Tagen p.c. durch Auswaschen der Uteri isoliert. Um die Ausbeute der Blastozysten zu erhöhen, wurden die Mäuse 2.5 Tage vor der Verpaarung durch die intraperitoneale Applikation von 5-8 U Gonadotropin (GT, Sigma) und 46-48 Stunden später 5-8 U humanem Chorion-Gonadotropin (hcG, Sigma) superovuliert. Foster Weibchen wurden direkt vor der Verpaarung in Abhängigkeit ihrer Empfängnisbereitschaft durch optische Kontrolle des Östrus ausgewählt. Eine erfolgreiche Kopulation wurde 12 h später durch die Präsenz eines Vaginalplugs nachgewiesen. Vor der Injektion wurden die Blastozysten 1-2 h bei 37° C und ca. 5 % CO₂ in DMEM-Medium/10 % FCS inkubiert.

Zur Injektion wurden Blastozysten und frisch präparierter ES-Zellen in DMEM/10 % FCS/20 mM HEPES aufgenommen. Die Blastozystenmanipulation erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiovert 10), eines Mikromanipulators (Leitz), einem luftgefüllten Halte-System (Cell Tram Air, Eppendorf) zur Fixierung der Blastozysten und einem ölfüllten System (Cell Tram Oil, Eppendorf) zur Injektion der ES Zellen. Mit einer Injektionskapillare (Transfer Tips, (ES) Eppendorf) wurden ca. 10-20 ES-Zellen auf der inneren Zellmasse der Blastozysten, die vorher an der Seite der Zellmasse mit der Haltekapillare angesogen und fixiert wurden, abgelegt. Vor der Reimplantation wurden die Blastozysten nach erfolgter Injektion für mindestens 2 h bei 37°C und 5% CO₂ in M16-Medium inkubiert.

6.6.2 Blastozysten-Reimplantation

Jeweils 4-12 injizierte Blastozysten wurden in ein Uterushorn scheinchwangerer Mäuse reimplantiert. Als Leihmütter wurden 6-12 Wochen alte CD1-Weibchen nach erfolgreicher Verpaarung (2.5 Tage p.c.) mit vasktomierten Männchen verwendet.

6.6.3 Vasektomie

Vier bis sechs Wochen alte CD1-Männchen wurden nach der Methode von Hogan *et al* [237]. vasektomiert. Nach frühestens sieben Tagen der Rekonvaleszenz wurden die Männchen zur Gewinnung scheinchwangerer Mäuse verpaart.

6.6.4 Kryokonservierung der Embryonen

Zwei Tage nach erfolgter Kopulation wurden Acht-Zellstadien aus superovulierten Weibchen entnommen. Die Ovidukte wurden mit Teilen des Uterushorns in DMEM/10% FCS/20 mM HEPES ausgespült und danach zerkleinert. Vor dem Einfrieren wurden die Embryonen mehrfach in M16-Medium gewaschen und bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation in M16-Medium wurden die Acht-Zellstadien in 100 µl Einfriermedium (1 M DMSO/PBS) in *Cryo-Tubes* (20 Embryonen pro *Tube*) überführt. Die Embryonen wurden 30 min auf Eis gekühlt und anschließend in einen auf 0° C vorgekühlten Kryoautomaten (Planer/Messer-Griesheim GmbH) transferiert. Nach sukzessivem Abkühlen der Proben auf -12° C wurde bei dieser Temperatur die Kristallisation der Proben durch die Zugabe einiger Eiskristalle ausgelöst. Nach weiterer linearer Abkühlung auf -80° C (-0.5° C/min) wurden die kryokonservierten Embryonen direkt in flüssigem Stickstoff eingelagert.

7. Anhang

7.1 Sequenz des murinen nSMase Gens

(fett gedruckt Exons, grau Exon/Intron und Intron/Exon-Übergänge, * = Transkriptionsstart)

*

EI 361bp GTTCGTGGGCGGGGCTCGCATCAACTTCAAGCCTGTTGCTGGTGGAAAGCC
GAGCCGGGAACAAGGGAGGAACCTGTAGGCCGCGGTGCGGATAACCCACCGAAGGACCTA
AGAATCTGGAACAGTCCACCCGAGATTCTTCCAGGACTGCCGGCGGACTCTCGCATTCA
GCCCGGGATTTGCAGCCGACCTTCTTTCCGGGTGGAATGACGGCCTTTGTCCCAGTAACG
CAGGAGTCCCCCCCACCCCCAACCAGCTCGCGTTTCTGGGTGCGGGCAGCGCAGGATAGG

Start

EII 97bp GCAATAAGCCTGTGCGCGCAATCCGCTCGCCGCTTGGCTCCGAAGCACTCCAGCCATG
AAGCTCAACTTTTTCTCTACGGCTGAGAGTTTTCAATCTCAACTGCTGGTAAGTAAGTGCT
CCCAGGCGTGGGCTGCAGCCTCGGAGCCACCTTCCAGTCCCCTCTCGCACATGCCTAGGA
AGGAAGCAGGTCTTCTTCAGCCGAGCTAGACCCTGTCTTCCCGAACCACCAAAGTCCAC
ATCGCCTAAAGACCAGAGCTTGGGTGGTTGCAGCAATCACCAAAGTCCCTATCATCCAAA
GCTGAGGTGATGACAGCAGTAATCGTCCCAAACCTGGCCCATGTCTTTCTTTTAAATGA
TTTACTTTTTATTTTATGTACATTTGGTGTTTTGCCTGTATGTATGTCTGTGTGAAGGTGC
CAGATTCTCTGGAAGTGGAGTTACAGACAGTTGTAAGCTGTCTATGTGCTTGGTGGAAATT
GAACTGCTGACCCATCTCTTCTGCCCCCTGCGTCTCCACCCCTTTTGGGACATCCCCCT
ACCTGAGCAAACATAGGGCGGACCGCATGAAGCGCTTGGGAGACTTTCTGAACTTGGAAA

EIII 77bp ACTTTGATCTGGCTCTCCTGGAGGAGGTGAGGTTGTAGGGCAGGCTAGGTTGGAGGAGGG
CAGCAGGCGGCAGGCGGGCGGCAGGAAAACCTTGTCTGTCTTGGGATGAAATCCCAAGCAA
GTATCCTCACCTTCTTCTCCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTAAGGCAA

EIV 94bp AGGCTATCGCTCACCTATCCAGATGCACACTACTTTCAGAAGGTGAAAAGCCTGTGTTCTC
AGCCTGTTCTCAGACGAGGAAGCTCTCCAACATTTCTTGTCTTGCACCCTCGATCTTCTTCC
TCTGGGTGTGAGAAGAGCAGGCCGTACCCTCATCTTGCAGGGCTGCTGTCTTAGGCTT
TGTTCTGGGGTTGATCTTAGCAGTAGAGCTGGGAGACCGCGGAGGGGAAGAGGGCTGGCT
GGTACTCCCCTCCTTGTCTTCTGTTATTAAGCAAGAGTTGGTTTTTCAGCGGGATGAT

EIV 94bp AGGCGAGTGGCCTCTGTGTGTTCTCCAAACACCCAATCCAGGAAATCTTCCAGCATGTCTA
CAGTCTGAATGGTTACCCCTACATGGTAAGGATCTCTTCCCTATCCTTGGCTAACACAGAC
TGGACGCAGCCTTCTGGGGCCTTGGCAGGAGGGTGTGAGTACCCTGAGTTTTTTGTCTTC
TCTTGCCTGCAGTTCCATCATGGAGACTGGTTCTGTGGGAAGTCTGTGGGGCTGTGGTG

EV 90bp CTCCGTCTAAGTGGACTGGTGCTCAATGCCTACGTGACTCATGTGAGTGGGGCTAGCCAG
GCTTAGGCAGTGGGTCAAGCAGCCCAATGCTATGGTGGAGAAGAGACGCCACTAGTTAGT
TCTGCTGCCTGGGGATAAGGCATGGGATCAGAAGCTAGCATTGGGCAAGGTTACCCATT
CCCTGTACACTCTGCCATGTGACAGATGACAAGCTTGATTGAGACAGCCTTCTCTTTGA
TTTCACCTATTCCACTTTAGCTACATGCTGAGTACAGCCGACAGAAGGACATCTACTTTG

EVI 83bp CACACCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAACTGGCCAGTTCATCCAGTGTGTGAGCCTGGGCT
TGATGGGGGCTGTGGGGTGGGGACGGGGTTGAGGGATGNGNAANTTATCCTTGAAGAGGG
CACATAATAAGGGAAGAATTTCTCCTTGGCCGTCTTCCCCCAACTCAGCCACACATCCA

EVII 133bp AGAATGCAGATGTGGTTCTATTTGTGTGGAGACCTCAATATGCACCCCAAGACCTGGGCT
GCTGCCTGCTGAAAGAGTGGACAGGGCTCCATGATGCTTTTCGTTGAGACTGAGGACTTTA
AGGTGAGAGACTGTTTCCACCAACTCCACACTTGTTCAGTCTTCTGTCTCTTAGCAT
CCTAGCCACCTGTTTCCCTAGGGCTCTGATGATGGCTGTACCATGGTACCCAAGAAGTGC

EVIII 105bp TACGTACGCCAGCAGGACCTGGGACCGTTTTCCGTCTGGTATCCGGATTGATTACGTGCTT
TACAAGGTGAGGCTCTTATTCCCCTGTGCCTTCTCCAGTATCTTCTTCTCTGTCACT
AGCCCACGCTTTAGTTTACAGTACTTGGGCCACTGATGGCTAAAAGAATAGAATCCTG
TCGGCTGGTTCTCTGGGAGAATTTAAGCTTCTCCATGTTCTTGTCTTCTTCTTAGGCTCT
CTGAGTTCCACGTCTGCTGTGAGACTCTGAAAACCACTACAGGCTGTGACCCTCACAGTG

EIX 154bp ACAAGCCCTTCTCTGATCACGAGGCCCTCATGGCTACTTTGTATGTGAAGCACAGCCCCC
CTCAGGAAGACCCCTGTACTGCCTGTGGTAAGCAGCATTTCTTTTGGCCCTCTACTTTA
AGGCAGCCCCGCTCCATCCTGACCCCTCCCCTGCTCTACGTTCTCTTTTTTCCAGGCC
ACTGGAAGGTCCGATTTGATCAGCGTGCTAAGGGAGGCCAGGACAGAGCTGGGGCTAGG

EX 447bp CATAGCTAAAGCTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATGTGATCGTTTGGGGCTGTC
 CCTTCTGGTGTGCTGTGTGTCTGGCTGCAGGAGAAGAGGCCAGGGAAGTGGCCATCAT
 CCTCTGCATACCCAGTGTGGGTCTGGTGTGGTAGCAGGTGCAGTCTACCTCTCCACAA
 GCAGGAGGCCAAGGGCTTATGTCTGGGCCAGGCTGAGATGCTGCACGTTCTGACAAGGGA
 AACGGAGACCCAGGACCGAGGCTCAGAGCCTCACCTAGCCTACTGCTTGCAGCAGGAGG
 Stop poly A
 GGACAGAGCTTAAGAGCTTAACAATAAACTTGCTTGACACACTCTAGTGGCTCTACCTT

7.2 Sequenz des humanen nSMase-Gens

(fett gedruckt Exons, grau Exon/Intron und Intron/Exon-Übergänge)

Start

EI ACCGCGCCGTCGCTGGAGAGTTTCAGACCGCCTAGCGCCCCTGGAGCTCCCCAACCATGA
 AGCCCAACTTCTCCCTGCGACTGCGGATCTTCAACCTCAACTGCTGGT GAGTGCCTCTGC
 GGAGTGCGGTCTGGGGGCCACCTTCCGTTTCGCACCCATGCAGCCTTCCCTCCCCATCCC
 GCCCCACGATCTCAGGGTGTAGGAAAACCCGAACCTCCAAAGTCCACATCTGGCCCCAG
 CGCCGGTGGTCCCAGCAGTCGCCTCCCCTGCCCGCTCTTCCCTTCCCTTAGGGGCATTCC
EII GTACTTGAGCAAGCACCGGGCCGACCGCATGAGGCGCCTGGGAGACTTTCTGAACCAGGA
 GAGCTTCGACCTGGCTTTGCTGGAGGAGT GAGATTGTGCAGCACGGTGCGGAAACCCAGG
 CTGGGAGGAGGGACAGACCGTCCCCTGAGGAAAGACCAAGCAGGCATCCTCACCGCTTC
EIII CCTCAGGTGTGGAGTGAGCAGGACTTCCAGTACCTGAGACAGAAGCTGTCACCTACCTAC
 CCAGCTGCACACCACTTCCGGAGT GAGAAGCCCACTGGCCTGAAGCCTGTTGTCATCCC
 AGGAGGCTCTTGGCCCTGCCAGCCCTTCCCTATCCTGCCTGCCTCCTCCAGTCTCCTCCA
 GCCTCCTCTCCCTCTGGATGTGAGAGAAGGAGAAGGGTGAACCAAGAAGGCTCCTATGACT
 TCAGCCCATTTAGCTTTGTTTTCTGGCTGCCCTATACTCCTCCAAAGCCGTCGCTTG
 GTTCTAGGGCTAGTCCCAGCAGTAGAAAAAGAAAAAATAGCTGATCAGAGCTGGAAGAC
 AAGGGAGGGGAAGAAGGCTGGGTGTCTCTCCCTGTTTTTCTGGTTATTAAGCAGGGCTTG
 GCTTTCAGCGGAATCATTGGCAGTGGCCTCTGTGTCTTCTCCAAACATCCAATCCAGGAG
EIV CTTACCCAGCACATCTACACTCTCAATGGCTACCCCTACATGGT AAGGCAGACCTTTGAC
 CTCTTCCACCTCCCTTCCCCACCTCCAGTAATACAAGGTAGAGGAGGCAGCCCTCTGAGA
 GCTGCAGGGGATGGGCAGAAAGATGGTGGCGGTGCCCTGAGTTTCTATCTCCTCCTGCCT
 GCAGATCCATCATGGTGACTGGTTTCAGTGGGAAGGCTGTGGGGCTGCTGGTGCTCCATCT
EV AAGTGGCATGGTGCTCAACGCCTATGTGACCATGT GAGTGAAGCTGGCAGTGCCTAGGG
 CTGGGACATGCAGCCCAGTCCCTGGGACAGAGATGGTACTTCTCTAGCTCTCATACCTG
 GGGATGAGGTGTGGGGCAAGATCTTATAAGGAAGCAATGGGCAAGGCTTATCCATTGTA
 TACCAAACACCATGCCAAGTGACAGACACAGGCTTGATTTCAGACATAACCCTGGGACCT
 CAGTCTTATCTGCTGTGATCTCATCCATCTTGCTCAGCTCCATGCCGAATACAATCGACA
EVI GAAGGACATCTACCTAGCACATCGTGTGGCCCAAGCTTGGGAATTGGCCCAGTTTCATCCA
 GTGTGTGAGCCTGGGCTTGAAATGGGAAGTGGGATGGGACCCAGGGGCTGAGGGTGAACA
 AGGCCCCAGTCATGGGGAAGAGCTGGTGATGGAAGAAGTCCCCTCACCAACCTGGTTC
 CCCCAGCCACACATCCAAGAAGGCAGACGTGGTTCTGTTGTGTGGAGACCTCAACATGCA
EVII CCCAGAAGACTGGGCTGCTGCCTGCTGAAGGAGTGGACAGGGCTTCATGATGCCTATCTT
 GAAACTCGGGACTTCAAGGTGAGGACTTGCCTGTTACTTCCCCACCTATATCCCCAGCTT
 CTCTCCCTCCTTCTCCCCACATCCTAGCATGAGCCAATGATTCCCTTAGGGCTCTGAGG
 AAGGCAACACAATGGTACCCAAGAAGTGTACGTGAGCCAGCAGGAGCTGAAGCCATTTT
EVIII CCTTTGGTGTCCGCATTGACTACGTGCTTTACAAGGT CAGGCTCCTCCCTTCAACATGCT
 TTCATATGCTGTGTCTCTTTGTCTACTAACCTGTGTAGATCCTTTGCTCAGNTAGTCTAG
 TCTTGGACCACTGATGGGTGGAAGTGGGGTAGCCGGGAGCTGGTTCTCTGGGAAGAGGC
 CCTCATATATAAGCTTCTCTNTGGCCCTTACTTTTCTAGGCAGTTTCTGGGTTTTACAT

EIX CTCTGTAAAGAGTTTTGAAACCACTACAGGCTTTGACCCTNACAGGGGCACCCCCCTCTC
TTGATCATGAAGCCCTGATGGCTACTCTGTTTGTGAGGCACAGCCCCCACAGCAGAACC
CCAGCTCTACCCACGGT GAGTCACCCCCACCCTTTCCTTGGCCCTTGCCCCGCTTGAAGC
AGCCCTTCCACTCTTGACTCTCTCCTGCCCCACTGCCCTGCTCTGTTGTAGGACCAGCAG
AGAGGTCGCCGTTGATGTGTGTGCTAAAGGAGGCCTGGACGGAGCTGGGTCTGGGCATGG
CTCAGGCTCGCTGGTGGGCCACCTTCGCTAGCTATGTGATTGGCCTGGGGCTGCTTCTCC
TGGCACTGCTGTGTGTCCTGGCGGCTGGAGGAGGGGCCGGGAAGCTGCCATACTGCTCT
EX GGACCCCCAGTGTAGGGCTGGTGTGTGGGCAGGTGCATTCTACCTCTTCCACGTACAGG
AGGTCAATGGCTTATATAGGGCCCAGGCTGAGCTCCAGCATGTGCTAGGAAGGGCAAGGG
AGGCCAGGATCTGGGCCAGAGCCTCAGCCAGCCCTACTCCTGGGGCAGCAGGAGGGGG
Stop
ACAGAACTAAAGAACAATAAAGCTTGGCCCTT

7.3 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
notI-TM-antisense	5'-GTTGCGGCCGCAGCTCTGTCCCCCTCCTGCTG-3' mnSMase cDNA 1550-1570	Sequenzierung mnSMase Gen
ATG-ncolI-sense	5'-AGCACTCCAGCCATGGAGCTCAAC-3' mnSMase cDNA 302-325	Sequenzierung mnSMase Gen, RT-PCR
Pst-Stop	5'-CTCGCTGGTGGGCTGCATTCTCTGGCTATG-3' mnSMase cDNA 1272-1801	Sequenzierung mnSMase Gen, RTPCR
5'UTas	5'-TTAGGTCTTCGGTGGGTTCTCCGCACCGC-3' mnSMase cDNA 76-47	Primer-Extension mnSMase
5'Not-sense	5'-GCGGCCGCACAGCCTGAGATGCCCTGTCCT-3' 5'-Ende Phagenklon λNSM1-8 kb SstI	Klonierung <i>targeting</i> Vektor
3'Xho-asense	5'-CTCGAGTCCGCCGGCAGTCTGGAAGGAAT-3' mnSMase cDNA 130-100	Klonierung <i>targeting</i> Vektor
EII-Xhoas	5'-CTGGAGCTAGTTCAGAAAGTCTCCCAAGCGCTTCAT-3' mnSMase cDNA 403-401	Klonierung <i>targeting</i> Vektor, RT-PCR
3'-Intron as	5'-GGAGGGAGAGGGGAGACTGGACAATAAGTAG-3' 5'-Ende 0.9 kb HindIII/PstI Fragment (3'-Sonde)	Nachweis homologe Rekombination
HindIII-sense	5'-GCCCAAGCTTGGGAAGTGGCCAG-3' mnSMase cDNA 773-796	Nachweis homologe Rekombination
5'Xho-sense	5'-CTCGAGTTGCTCCGAAGCACTCCAGCCATG-3' mnSMase cDNA 290-314	Klonierung pNSM-GFP, RT-PCR
3'Sma-asense	5'-CCCGGGAGCTCTGTCCCCCTCCTGCTGCAA-3' mnSMase cDNA 1570-1544	Klonierung pNSM-GFP, RT-PCR
RT5'-sense	5'-GAAGGACGGCCTTTGTCCAGTAACGCAGG-3' mnSMase cDNA 170-200	RT-PCR
RT3'-as	5'-GTGTGTCAAGCAAGTTTTATTGTTAAGCTC-3' mnSMase cDNA 1603-1573	RT-PCR
notI-antisense	5'-CGTTGCGGCCGCCTTCACATACAAAGTAGCCAT-3' mnSMase cDNA 1139-1159	RT-PCR
neo3'-sense	5'-AGTG TAGCGCCTTCTATCGTTTTCTTGACG-3' 3'-Ende Neo-Box pPNT 1324-1352	Nachweis homologe Rekombination
neo5'-asense	5'-AATCCATCTTGTTCAATGGCCGATCCCAT-3' Neo-Box ATG pPNT 589-560	RT-PCR
hNSM-SacII	5'-CGTCCCCACCGCGGCCGTCGCTGG-3' hnSMase cDNA 289-312	Klonierung hnSMase Gen
hNSM-N180H	5'-GTGGAGACCTCCATATGCACCCAGA-3' hnSMase cDNA 878-901	Sequenzierung hnSMase Gen
hNSM-H272N	5'-CCCTCTCTGATAATGAAGCGCTGATG-3' hnSMase cDNA 1154-1179	Sequenzierung hnSMase Gen
hNSM-H272Nas	5'-CATCAGCGCTTCATTATCAGAGAGGG-3' hnSMase cDNA 1179-1154	Sequenzierung hnSMase Gen
HumI	5'-CATGAGGCGCCTGGGAGACTTTCTGAACCA-3' hnSMase cDNA 338-367	PCR hnSMase Gen
HumII	5'-ATGGGTCACATAGGCGTTGAGCACCATG-3' hnSMase cDNA 759-732	PCR hnSMase Gen
hNSM5'	5'-AGCTTGAGGAAAAGGAACCGGGAGCCGCC-3' hnSMase cDNA 14-44	PCR hnSMase Gen
hNSM3'as	5'-GGGCCAAGCTTTATTGTTCTTTAGTTCTGT-3' hnSMase cDNA 1633-1603	Klonierung hnSMase Gen Chromosomenlokalisierung
Intron-5'	5'-GGGAAGAGGCCCTCATATATAAGCTTCTCT-3' IntronVIII hnSMase Gen	Chromosomenlokalisierung hnSMase
β-Actin-sense	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAA-3'	RT-PCR
β-Actin-as	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'	RT-PCR
T7-(dT) ₂₄	5'GGCCAGTCAAATGTAATACGACTCACTATAGGGAGGC GG(T) ₂₄ -3'	DNA Array

7.4 DNA Array

in nSMase-defizienten Tieren negativ veränderte Gene

Probe	Experiment				Vergleich1		Vergleich2		Mittelwert	Genbeschreibung
	Wt1	Wt2	Mu1	Mu2	call	fold	call	fold		
98579_at	P	P	P	P	D	-32,1	D	-13,2	-22,65	M28845:Early growth response 1
104617_at	P	P	A	A	D	-6,9	D	-25,4	-16,15	AI042964:uc77g09.x1 Mus musculus cDNA, 3 end
102399_at	P	P	A	A	D	-5,5	D	-5,5	-5,5	AW123909:UI-M-BH2.1-app-h-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
92600_f_at	P	P	P	P	D	-5,5	D	-4,7	-5,1	AB018421:Mus musculus CYP4A10 mRNA for cytochrome P-450,
97531_at	P	P	A	A	D	-4,9	D	-4,7	-4,8	X95280:Mus musculus mRNA for GOS2-like protein
95016_at	P	P	P	P	D	-5,1	D	-4	-4,55	D50086:Mouse mRNA for neuropilin,
92773_at	P	P	P	P	D	-4,3	D	-4,4	-4,35	AF079528:Mus musculus IER5 (Ier5) gene,
102347_at	P	P	A	A	D	-4,5	D	-3,8	-4,15	AI838704:UI-M-AO0-aca-h-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
101883_s_at	P	P	A	A	D	-3,8	D	-4,5	-4,15	L22977:Mouse A12 mRNA,
100078_at	P	P	P	P	D	-4	D	-4	-4	M64248:Mouse apolipoprotein A-IV (apoa-A) mRNA,
93881_i_at	P	P	A	A	D	-3,7	D	-4,3	-4	D50032:Mouse mRNA for TGN38B,
93860_i_at	P	P	P	P	D	-4,4	D	-3,5	-3,95	M17327:Mouse endogenous murine leukemia virus modified polytropic provirus DNA,
95313_at	P	P	A	A	D	-3,9	D	-4	-3,95	AW046032:UI-M-BH1-akv-a-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
93882_f_at	P	P	M	P	D	-4,9	MD	-2,8	-3,85	D50032:Mouse mRNA for TGN38B,
98322_at	P	P	A	A	MD	-3,7	D	-3,5	-3,6	AB015800:Mus musculus mRNA for OCTN2,
93434_at	P	P	P	P	D	-4,1	D	-2,8	-3,45	AF026074:Mus musculus sulfotransferase-related protein (SULT-X1) mRNA,
97369_g_at	P	P	A	P	D	-3,4	D	-3,1	-3,25	U95145:Mus musculus S-AKAP84 mRNA,
93861_f_at	P	P	P	P	D	-3,3	D	-3	-3,15	M17327:Mouse endogenous murine leukemia virus modified polytropic provirus DNA,
103465_f_at	P	P	P	P	D	-3,4	D	-2,9	-3,15	U60438:Serum amyloid A 2
104206_at	P	P	A	A	D	-3,1	D	-3,1	-3,1	AA815845:vp71h06.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
101940_at	P	P	M	M	D	-3,8	D	-2,4	-3,1	AJ222800:Mus musculus mRNA for neutral sphingomyelinase
95588_at	P	P	P	P	D	-3,1	D	-2,9	-3	U89906:Mus musculus alpha-methylacyl-CoA racemase mRNA,
99475_at	P	P	P	P	D	-3,2	D	-2,5	-2,85	U88327:Mus musculus suppressor of cytokine signalling-2 (SOCS-2) mRNA,

104750_at	P	P	P	P	MD	-3,1	D	-2,3	-2,7	M63630:Mus musculus predicted GTP binding protein (IRG-47) mRNA,
102644_at	P	P	P	P	MD	-2,3	D	-3,1	-2,7	U13371:Mus musculus clone 1.5 novel mRNA from renin-expressing kidney tumor cell line
94297_at	P	P	P	P	D	-2,7	D	-2,6	-2,65	U16959:FK506 binding protein 5, 51 kDa
94821_at	P	P	P	P	D	-2,5	D	-2,7	-2,6	AW123880:UI-M-BH2.1-app-e-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
100333_at	P	P	P	P	MD	-2,8	MD	-2,3	-2,55	M13521:Murine serum amyloid A-1 (SAA-1) gene
102302_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-2,9	-2,55	L16992:Mus musculus branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase E1 beta-subunit mRNA
103581_at	P	P	P	P	D	-2,4	D	-2,5	-2,45	Y14004:Mus musculus mRNA for acyl-CoA thioesterase
103899_at	P	P	A	A	D	-2,4	MD	-2,5	-2,45	AA690863:vt32b05.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
98123_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-2,6	-2,4	AW226961:um64c06.y1 Mus musculus cDNA, 5 end
93055_at	P	P	A	P	D	-2,1	D	-2,4	-2,25	AW049376:UI-M-BH1-ane-c-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
100737_at	P	P	P	P	D	-2,7	D	-1,8	-2,25	U95945:Hepatic nuclear factor 6
95539_at	P	P	P	P	MD	-1,9	D	-2,6	-2,25	AA798971:vv95e03.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
97197_r_at	P	P	P	P	D	-2	D	-2,4	-2,2	C78850:C78850 Mus musculus cDNA, 3 end
98507_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-2,1	-2,15	AI834950:UI-M-AM1-afw-b-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
102328_at	P	P	P	P	MD	-1,9	D	-2,4	-2,15	AJ007749:Mus musculus mRNA for caspase-8
101840_at	P	P	P	P	D	-2,4	D	-1,9	-2,15	L06864:Mus musculus epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA, partial cds
103534_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-2	-2,1	V00722:Mouse gene for beta-1-globin
102649_s_at	P	P	A	M	MD	-2	D	-2,2	-2,1	D64162:Mouse clone Rae-123 mRNA for cell surface protein,
103562_f_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-1,9	-2,05	M26005:Mouse endogenous retrovirus truncated gag protein, , clone del env-1 3.1
96602_g_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-1,9	-2,05	AW045751:UI-M-BH1-akt-a-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
96771_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-2,2	-2	AI006228:ua88d09.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
104533_at	P	P	P	A	D	-2,4	D	-1,6	-2	AA764261:vv49f08.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
92242_at	P	P	P	P	D	-1,9	D	-2,1	-2	U65403:Serum amyloid A 4
94208_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-2,1	-1,95	AW045202:UI-M-BH1-alh-c-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
99109_at	P	P	P	P	D	-2,2	D	-1,7	-1,95	M59821:Mouse growth factor-inducible protein (pip92) mRNA,
95026_at	P	P	P	P	D	-1,9	D	-1,9	-1,9	AW047688:UI-M-BH1-alo-d-11-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
97420_at	P	P	P	P	D	-1,9	D	-1,9	-1,9	AW230891:uo69b04.y1 Mus musculus cDNA, 5 end
98923_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-1,9	-1,85	AI852608:UI-M-BH0-aiu-d-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
93907_f_at	P	P	P	P	D	-1,9	D	-1,8	-1,85	M17551:Mus musculus clone MIA14 full-length intracisternal A-particle gag protein gene,
99100_at	P	P	P	P	MD	-2	D	-1,7	-1,85	AI837104:UI-M-AK0-adc-d-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
94276_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-1,8	-1,8	AF064635:Mus musculus putative steroid dehydrogenase (KIK-I) mRNA,
97181_f_at	P	P	P	P	MD	-2	D	-1,6	-1,8	M10062:Mouse IgE-binding factor mRNA,
100596_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-1,7	-1,75	M32032:Selenium binding protein 1
101561_at	P	P	P	P	D	-1,8	D	-1,6	-1,7	K02236:Metallothionein 2

94507_at	P	P	P	P	D	-1,7	D	-1,7	-1,7	U15977:Mus musculus long chain fatty acyl CoA synthetase mRNA,
96606_at	P	P	P	P	D	-1,8	MD	-1,5	-1,65	AB025217:Mus musculus mRNA for Sid470p,
104249_g_at	P	P	P	P	D	-1,7	D	-1,5	-1,6	AW227650:up12b09.y1 Mus musculus cDNA, 5 end
104761_at	P	P	P	P	D	-1,6	D	-1,6	-1,6	AA612450:vo70h07.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
98589_at	P	P	P	P	D	-1,5	D	-1,6	-1,55	M93275:Adipose differentiation related protein
102475_f_at	P	P	P	P	D	-1,5	D	-1,3	-1,4	AV160244:AV160244 Mus musculus cDNA
104165_at	P	P	P	P	MD	-2,9	MD	1,1	-0,9	AJ132098:Mus musculus mRNA for Vanin-1
97368_at	P	P	P	P	MD	-1,5	D	1,2	-0,15	U95145:Mus musculus S-AKAP84 mRNA,

in nSMase-defizienten Tieren positiv veränderte Gene

Probe	Experiment				Vergleich1		Vergleich2		Mittelwert	Genbeschreibung
	Wt1	Wt2	Mu1	Mu2	call	fold	call	fold		
94418_at	P	P	P	P	I	10,7	I	6,1	8,4	AI839004:UI-M-AN0-acm-c-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
104343_f_at	A	A	P	P	I	8,2	I	5,7	6,95	AI845798:UI-M-AQ1-aeb-h-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
98107_at	A	A	P	P	I	5,9	I	6,3	6,1	AW123801:UI-M-BH2.1-apm-e-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
93264_at	P	P	P	P	I	5,7	I	5,4	5,55	AI843895:UI-M-AK1-aeu-f-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
101020_at	P	P	P	P	I	6	I	3,7	4,85	AI842667:UI-M-AO1-aeo-a-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
98575_at	P	P	P	P	I	5,3	I	4,4	4,85	X13135:Fatty acid synthase
100323_at	P	P	P	P	I	4,1	I	4	4,05	Z23077:S-adenosylmethionine decarboxylase 3
100324_g_at	A	P	P	P	I	4,7	I	3,3	4	Z23077:S-adenosylmethionine decarboxylase 3
92820_at	P	P	P	P	I	2,9	MI	5	3,95	AI846522:UI-M-AN1-aff-e-09-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
102922_at	A	P	P	P	I	5,4	MI	2,4	3,9	AI851387:UI-M-BH0-akh-g-12-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
104674_s_at	A	A	P	P	I	3	I	4,3	3,65	L21221:Mouse proprotein convertase 4 (PC4) gene
100946_at	P	P	P	P	I	3,8	I	3,5	3,65	AF109906:Mus musculus MHC class III region RD gene
99535_at	P	P	P	P	I	3,8	I	3,5	3,65	AW047630:UI-M-BH1-akm-g-06-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
103597_at	A	A	P	P	I	4	I	3,1	3,55	X63349:M.musculus tyrp2 mRNA for tyrosinase-related protein-2
97402_at	P	P	P	P	I	3,5	I	3,4	3,45	M88694:Mus musculus thioether S-methyltransferase mRNA,

96258_at	A	A	P	P	I	2,5	I	4,3	3,4	AI843448:UI-M-AQ1-aec-e-01-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
103665_at	P	P	P	P	I	3,1	I	3,4	3,25	AW122523:UI-M-BH2.2-aox-b-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
101489_at	P	P	P	P	I	3,7	I	2,7	3,2	D12780:Mouse mRNA for S-adenosylmethionine decarboxylase,
95134_at	A	A	P	P	I	3,1	MI	3,3	3,2	AW124483:UI-M-BH2.1-ape-h-06-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
102847_s_at	P	P	P	P	I	3,2	I	3,1	3,15	M19319:Cytochrome P450, 2a4
96041_at	P	P	P	P	I	3,5	MI	2,8	3,15	AB016424:Mus musculus rbm3 mRNA,
96104_at	A	A	P	P	I	3,4	I	2,7	3,05	AI047107:uh58b11.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
103896_f_at	P	P	P	P	I	3,1	I	2,7	2,9	X81579:Insulin-like growth factor binding protein 1
104588_at	P	P	P	P	I	2,8	I	2,7	2,75	AI255961:ui83h01.x1 Mus musculus cDNA, 3 end
101473_at	P	A	P	P	I	2,6	I	2,8	2,7	U86108:Nicotinamide N-methyltransferase
94514_s_at	P	P	P	P	MI	2,5	MI	2,8	2,65	AI853439:UI-M-BH0-ajv-d-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
98927_at	P	P	P	P	I	2,6	I	2,5	2,55	AI851048:UI-M-BH0-ajv-f-08-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
100555_at	P	P	P	P	I	2,1	I	2,7	2,4	AI846152:UI-M-AN1-afj-h-05-0-UI.s2 Mus musculus cDNA, 3 end
97468_at	A	A	P	P	MI	1,7	MI	2,9	2,3	AB025409:Mus musculus mRNA for sid1334p,
103635_at	P	P	P	P	I	2,9	I	1,7	2,3	AI648925:uk32h09.x1 Mus musculus cDNA, 3 end
101532_g_at	P	P	P	P	I	2,5	I	2,1	2,3	AI527354:uj51b11.x1 Mus musculus cDNA, 3 end
92821_at	P	P	P	P	I	2,6	I	2	2,3	AF079565:Mus musculus ubiquitin-specific protease UBP41 (Ubp41) mRNA,
98295_at	P	P	P	P	I	2,3	I	2,2	2,25	AF047726:Mus musculus CYP2C39 (Cyp2c39) mRNA,
93086_at	P	P	P	P	I	2,1	I	2,4	2,25	M18237:Mouse Ig kappa chain V-region mRNA, , clone 3H9
100343_f_at	A	P	P	P	I	2,3	MI	2,1	2,2	M28729:Tubulin alpha1
100877_at	P	P	P	P	I	2,1	I	2,2	2,15	AI194274:ui14c07.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
101539_f_at	P	P	P	P	I	2,4	I	1,9	2,15	AW226939:um64a07.y1 Mus musculus cDNA, 5 end
96167_at	P	P	P	P	MI	1,9	MI	2,4	2,15	AI643420:vv24h01.x1 Mus musculus cDNA, 3 end
103065_at	P	P	P	P	I	2	I	2,2	2,1	M73696:Murine Glvr-1 mRNA,
101638_s_at	P	P	P	P	I	2	I	2,1	2,05	D26137:Cytochrome P450, 3a16
101538_i_at	P	P	P	P	I	2,1	I	1,9	2	AW226939:um64a07.y1 Mus musculus cDNA, 5 end
104603_at	P	P	P	P	I	2,3	I	1,7	2	X98056:Glutathione S-transferase, theta 2
95135_at	P	P	P	P	I	1,8	I	2,2	2	AI844396:UI-M-AL1-ahp-e-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
97605_s_at	P	P	P	P	I	2	I	1,9	1,95	AV232292:AV232292 Mus musculus cDNA, 3 end
96731_at	P	P	P	P	I	2	I	1,9	1,95	AA615100:vo34f04.r1 Mus musculus cDNA, 5 end
104643_at	P	P	P	P	I	1,9	MI	2	1,95	AI850846:UI-M-BH0-ajt-b-11-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
97383_at	P	P	P	P	I	1,7	I	2	1,85	AI848623:UI-M-AH1-agv-d-05-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
95430_f_at	P	P	P	P	I	1,8	I	1,8	1,8	AI854154:UI-M-BH0-ajw-h-03-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
96886_at	P	P	P	P	I	1,8	MI	1,8	1,8	AW060556:UI-M-BH1-ann-h-02-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end
101007_at	P	P	P	P	I	1,9	I	1,7	1,8	AI845732:UI-M-AQ1-aeb-b-04-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3 end

103689_at	P	P	P	P	I	1,8	I	1,7	1,75	AA833514:uc91f12.r1 Mus musculus cDNA, 5' end
94378_at	P	P	P	P	I	1,8	I	1,7	1,75	U94828:Mus musculus retinally abundant regulator of G-protein signaling mRGS-r mRNA,
100959_at	P	P	P	P	I	1,7	I	1,8	1,75	X99921:M.musculus mRNA for S100 calcium-binding protein A13
93045_at	P	P	P	P	I	1,8	I	1,7	1,75	L28836:Peroxisomal membrane protein, 70 kDa
94057_g_at	P	P	P	P	I	1,7	I	1,7	1,7	M21285:Stearoyl-coenzyme A desaturase 1
101471_at	P	P	P	P	I	1,7	I	1,7	1,7	D63764:Mus musculus mRNA for pyruvate kinase,
96227_at	P	P	P	P	I	1,8	I	1,5	1,65	X70533:Corticosteroid binding globulin
101516_at	P	P	P	P	I	1,7	I	1,6	1,65	U60473:CD59 antigen
100112_at	P	P	P	P	I	1,5	I	1,5	1,5	L12030:Stromal cell derived factor 1
96728_at	P	P	P	P	I	1,3	I	1,6	1,45	AI844151:UI-M-AL1-ahj-f-07-0-UI.s1 Mus musculus cDNA, 3' end

7.5 Abkürzungen

AK	Antikörper
AS, aa	Aminosäure, <i>amino acid</i>
aSMase	<i>acid sphingomyelinase</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BFA	Brefeldin A
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
bSMase	bakterielle Sphingomyelinase
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Coenzym A
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
E. coli	Escherichia coli
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
EMFI	embryonale Fibroblasten
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GanC	Gancyclovir
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HEK	<i>human embryonic kidney (cells)</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IgG	ImmunglobulinG
i.p.	intraperitoneal
JNK	<i>c-Jun amino terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MeOH	Methanol
mut	Mutante
neo	Neomycin Phosphotransferase
neo-Box	Neomycin Phosphotransferase-Gen mit Promoter
NP-40	Nonidet P-40
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
NGF	<i>nerve growth factor</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SMase	Sphingomyelinase
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	<i>tris bufferd saline</i>
<i>tk</i>	Thymin Kinase
<i>tk-Box</i>	Thymin Kinase-Gen mit Promoter
TM-	Transmembran-
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Literatur

1. **Hakomori, S. and Kanfer, J.N.**, Sphingolipid Biochemistry, ed. S. Hakomori and J.N. Kanfer. 1983, New York: Plenum Publishing Corp.
2. **Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., and Sandhoff, K.**, (2000), Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta.*, **1485**(2-3): p. 63-99.
3. **Wiegand, H.**, Glycolipids, ed. H. Wiegand. 1985, New York: Elsevier. 199-259.
4. **Pascher, I.**, (1976), Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim Biophys Acta.*, **455**(2): p. 433-451.
5. **Slotte, J.P.**, (1999), Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes. *Chem Phys Lipids.*, **102**(1-2): p. 13-27.
6. **Hakomori, S.**, (1993), Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signalling and cell-cell interactions. *Biochem Soc Trans.*, **21**(Pt 3)(3): p. 583-595.
7. **Hakomori, S.**, (1981), Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem.*, **50**: p. 733-764.
8. **Bouhours, D. and Bouhours, J.F.**, (1981), Developmental changes of rats intestinal glycolipids. *Biochem Biophys Res Commun.*, **99**(4): p. 1384-1389.
9. **Bouhours, D. and Bouhours, J.F.**, (1985), Developmental changes of monohexosylceramide and free ceramide in the large intestine of the rat. *J Biochem (Tokyo).*, **98**(5): p. 1359-1366.
10. **Bouhours, J.F., Bouhours, D., and Hansson, G.C.**, (1993), Developmental changes of glycosphingolipid composition of epithelia of rat digestive tract. *Adv Lipid Res.*, **26**: p. 353-372.
11. **Hakomori, S.**, (1994), Role of gangliosides in tumor progression. *Prog Brain Res.*, **101**: p. 241-250.
12. **Hakomori, S.**, (1998), Cancer-associated glycosphingolipid antigens: their structure, organization, and function. *Acta Anat (Basel).*, **161**(1-4): p. 79-90.
13. **Hakomori, S.**, (1999), Antigen structure and genetic basis of histo-blood groups A, B and O: their changes associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta.*, **1473**(1): p. 247-266.
14. **Hannun, Y.A. and Bell, R.M.**, (1989), Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science.*, **243**(4890): p. 500-507.
15. **Hakomori, S. and Igarashi, Y.**, (1995), Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem (Tokyo).*, **118**(6): p. 1091-1103.
16. **Spiegel, S. and Merrill, A.H., Jr.**, (1996), Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *Faseb J.*, **10**(12): p. 1388-1397.
17. **Spiegel, S. and Milstien, S.**, (1995), Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers. *J Membr Biol.*, **146**(3): p. 225-237.
18. **Hannun, Y.A.**, (1996), Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science.*, **274**(5294): p. 1855-1859.
19. **Hannun, Y.A. and Luberto, C.**, (2000), Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.*, **10**(2): p. 73-80.
20. **Spiegel, S., Olivera, A., and Carlson, R.O.**, (1993), The role of sphingosine in cell growth regulation and transmembrane signaling. *Adv Lipid Res.*, **25**: p. 105-129.
21. **Spiegel, S., et al.**, (1998), Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann N Y Acad Sci.*, **845**: p. 11-18.
22. **Spiegel, S. and Milstien, S.**, (2000), Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta.*, **1484**(2-3): p. 107-116.
23. **Spiegel, S. and Milstien, S.**, (2000), Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.*, **476**(1-2): p. 55-57.
24. **Merrill, A.H., Jr. and Jones, D.D.**, (1990), An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, **1044**(1): p. 1-12.
25. **Stoffel, W.**, (1970), Studies on the biosynthesis and degradation of sphingosine bases. *Chem Phys Lipids.*, **5**(1): p. 139-158.
26. **Weiss, B. and Stoffel, W.**, (1997), Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem.*, **249**(1): p. 239-247.
27. **Stoffel, W., LeKim, D., and Sticht, G.**, (1968), Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **349**(5): p. 664-670.
28. **Merrill, A.H., Jr. and Wang, E.**, (1986), Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s). *J Biol Chem.*, **261**(8): p. 3764-3769.

29. **Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G., and Sandhoff, K.,** (1992), Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **189**(1): p. 14-20.
30. **Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., and Merrill, A.H., Jr.,** (1997), Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem.* **272**(36): p. 22432-22437.
31. **Schulze, H., Michel, C., and van Echten-Deckert, G.,** (2000), Dihydroceramide desaturase. *Methods Enzymol.* **311**: p. 22-30.
32. **Michel, C. and van Echten-Deckert, G.,** (1997), Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **416**(2): p. 153-155.
33. **Jeckel, D., Karrenbauer, A., Birk, R., Schmidt, R.R., and Wieland, F.,** (1990), Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett.* **261**(1): p. 155-157.
34. **Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K.N., van Meer, G., and Wieland, F.,** (1992), Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol.* **117**(2): p. 259-267.
35. **Lannert, H., Bunning, C., Jeckel, D., and Wieland, F.T.,** (1994), Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **342**(1): p. 91-96.
36. **Lannert, H., Gorgas, K., Meissner, I., Wieland, F.T., and Jeckel, D.,** (1998), Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J Biol Chem.* **273**(5): p. 2939-2946.
37. **Schwarzmann, G. and Sandhoff, K.,** (1990), Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry.* **29**(49): p. 10865-10871.
38. **van Echten, G. and Sandhoff, K.,** (1993), Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem.* **268**(8): p. 5341-5344.
39. **Colbeau, A., Nachbaur, J., and Vignais, P.M.,** (1971), Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochim Biophys Acta.* **249**(2): p. 462-492.
40. **Barenholz, Y. and Thompson, T.E.,** (1980), Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* **604**(2): p. 129-158.
41. **Cook, H.W., Palmer, F.B., Byers, D.M., and Spence, M.W.,** (1988), Isolation of plasma membranes from cultured glioma cells and application to evaluation of membrane sphingomyelin turnover. *Anal Biochem.* **174**(2): p. 552-560.
42. **Koval, M. and Pagano, R.E.,** (1991), Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta.* **1082**(2): p. 113-125.
43. **Ullman, M.D. and Radin, N.S.,** (1974), The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver. *J Biol Chem.* **249**(5): p. 1506-1512.
44. **Sillence, D.J. and Allan, D.,** (1998), Utilization of phosphatidylcholine and production of diradylglycerol as a consequence of sphingomyelin synthesis. *Biochem J.* **331**(Pt 1): p. 251-256.
45. **Stoffel, W. and Melzner, I.,** (1980), Studies in vitro on the biosynthesis of ceramide and sphingomyelin. A reevaluation of proposed pathways. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **361**(5): p. 755-771.
46. **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. *J Biol Chem.* **265**(15): p. 8650-8657.
47. **Golde, L.M.v., Raben, J., Batenburg, J.J., Fleischer, B., Zambrano, F., and Fleischer, S.,** (1974), Biosynthesis of lipids in Golgi complex and other subcellular fractions from rat liver. *Biochim Biophys Acta.* **360**(2): p. 179-192.
48. **Marggraf, W.D., Anderer, F.A., and Kanfer, J.N.,** (1981), The formation of sphingomyelin from phosphatidylcholine in plasma membrane preparations from mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* **664**(1): p. 61-73.
49. **Kallen, K.J., Allan, D., Whatmore, J., and Quinn, P.,** (1994), Synthesis of surface sphingomyelin in the plasma membrane recycling pathway of BHK cells. *Biochim Biophys Acta.* **1191**(1): p. 52-58.
50. **Miro Obradors, M.J., Sillence, D., Howitt, S., and Allan, D.,** (1997), The subcellular sites of sphingomyelin synthesis in BHK cells. *Biochim Biophys Acta.* **1359**(1): p. 1-12.
51. **Allan, D. and Obradors, M.J.,** (1999), Enzyme distributions in subcellular fractions of BHK cells infected with Semliki forest virus: evidence for a major fraction of sphingomyelin synthase in the trans-golgi network. *Biochim Biophys Acta.* **1450**(3): p. 277-287.
52. **Sadeghlar, F., Sandhoff, K., and van Echten-Deckert, G.,** (2000), Cell type specific localization of sphingomyelin biosynthesis. *FEBS Lett.* **478**(1-2): p. 9-12.
53. **van Meer, G. and Holthuis, J.C.,** (2000), Sphingolipid transport in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* **1486**(1): p. 145-170.
54. **Hoekstra, D. and van Ijzendoorn, S.C.,** (2000), Lipid trafficking and sorting: how cholesterol is filling gaps. *Curr Opin Cell Biol.* **12**(4): p. 496-502.

55. **Fukasawa, M., Nishijima, M., and Hanada, K.,** (1999), Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol.*, **144**(4): p. 673-685.
56. **Funakoshi, T., Yasuda, S., Fukasawa, M., Nishijima, M., and Hanada, K.,** (2000), Reconstitution of ATP- and cytosol-dependent transport of de novo synthesized ceramide to the site of sphingomyelin synthesis in semi-intact cells [In Process Citation]. *J Biol Chem.*, **275**(39): p. 29938-29945.
57. **Kok, J.W., Babia, T., Klappe, K., Egea, G., and Hoekstra, D.,** (1998), Ceramide transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus is not vesicle-mediated. *Biochem J.*, **333**(Pt 3): p. 779-786.
58. **Barenholz, Y., Roitman, A., and Gatt, S.,** (1966), Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem.*, **241**(16): p. 3731-3737.
59. **Gatt, S.,** (1966), Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. I. Hydrolysis and synthesis of ceramides by an enzyme from rat brain. *J Biol Chem.*, **241**(16): p. 3724-3730.
60. **Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R.J., Ferlinz, K., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K.,** (1995), Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem.*, **270**(19): p. 11098-11102.
61. **Koch, J., Gartner, S., Li, C.M., Quintern, L.E., Bernardo, K., Levrán, O., Schnabel, D., Desnick, R.J., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K.,** (1996), Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification Of the first molecular lesion causing Farber disease. *J Biol Chem.*, **271**(51): p. 33110-33115.
62. **Stoffel, W., Assmann, G., and Binczek, E.,** (1970), Metabolism of sphingosine bases. 13. Enzymatic synthesis of 1-phosphate esters of 4t-sphingenine (sphingosine), sphinganine (dihydrosphingosine), 4-hydroxysphinganine (phytosphingosine) and 3-dehydrosphinganine by erythrocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **351**(5): p. 635-642.
63. **Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., and Spiegel, S.,** (1998), Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J Biol Chem.*, **273**(20): p. 12576-12583.
64. **Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., and Spiegel, S.,** (1998), Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem.*, **273**(37): p. 23722-23728.
65. **Liu, H., Sugiura, M., Nava, V.E., Edsall, L.C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., and Spiegel, S.,** (2000), Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem.*, **275**(26): p. 19513-19520.
66. **Stoffel, W. and Assmann, G.,** (1970), Metabolism of sphingosine bases. XV. Enzymatic degradation of 4t-sphingenine 1-phosphate (sphingosine 1-phosphate) to 2t-hexadecen-1-al and ethanolamine phosphate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **351**(8): p. 1041-1049.
67. **Mandala, S.M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M.B., and Spiegel, S.,** (2000), Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**(14): p. 7859-7864.
68. **Kolter, T. and Sandhoff, K.,** (1998), Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses. *Brain Pathol.*, **8**(1): p. 79-100.
69. **Schuette, C.G., Doering, T., Kolter, T., and Sandhoff, K.,** (1999), The glycosphingolipidoses-from disease to basic principles of metabolism. *Biol Chem.*, **380**(7-8): p. 759-766.
70. **Rao, B.G. and Spence, M.W.,** (1976), Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J Lipid Res.*, **17**(5): p. 506-515.
71. **Gatt, S.,** (1976), Magnesium-dependent sphingomyelinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **68**(1): p. 235-241.
72. **Spence, M.W., Beed, S., and Cook, H.W.,** (1986), Acid and alkaline ceramidases of rat tissues. *Biochem Cell Biol.*, **64**(5): p. 400-404.
73. **El Bawab, S., Bielawska, A., and Hannun, Y.A.,** (1999), Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J Biol Chem.*, **274**(39): p. 27948-27955.
74. **El Bawab, S., Roddy, P., Qian, T., Bielawska, A., Lemasters, J.J., and Hannun, Y.A.,** (2000), Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem.*, **275**(28): p. 21508-21513.
75. **Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Segui, B., Auge, N., Chatelut, M., Jaffrezou, J.P., and Salvayre, R.,** (1999), Sphingomyelin-degrading pathways in human cells role in cell signalling. *Chem Phys Lipids.*, **102**(1-2): p. 167-178.
76. **Levade, T. and Jaffrezou, J.P.,** (1999), Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta.*, **1438**(1): p. 1-17.
77. **Liscum, L. and Munn, N.J.,** (1999), Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.*, **1438**(1): p. 19-37.
78. **Ridgway, N.D.,** (2000), Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta.*, **1484**(2-3): p. 129-141.

79. **Slotte, J.P. and Bierman, E.L.,** (1988), Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J.*, **250**(3): p. 653-658.
80. **Porn, M.I. and Slotte, J.P.,** (1990), Reversible effects of sphingomyelin degradation on cholesterol distribution and metabolism in fibroblasts and transformed neuroblastoma cells. *Biochem J.*, **271**(1): p. 121-126.
81. **Slotte, J.P., Harmala, A.S., Jansson, C., and Porn, M.I.,** (1990), Rapid turn-over of plasma membrane sphingomyelin and cholesterol in baby hamster kidney cells after exposure to sphingomyelinase. *Biochim Biophys Acta.*, **1030**(2): p. 251-257.
82. **Scheek, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L.,** (1997), Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**(21): p. 11179-11183.
83. **Simons, K. and Ikonen, E.,** (1997), Functional rafts in cell membranes. *Nature.*, **387**(6633): p. 569-572.
84. **Rietveld, A. and Simons, K.,** (1998), The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta.*, **1376**(3): p. 467-479.
85. **Simons, K. and Ikonen, E.,** (2000), How cells handle cholesterol. *Science.*, **290**(5497): p. 1721-1726.
86. **Nix, M. and Stoffel, W.,** (2000), Perturbation of membrane microdomains reduces mitogenic signaling and increases susceptibility to apoptosis after T cell receptor stimulation. *Cell Death Differ.*, **7**(5): p. 413-424.
87. **Simons, K. and Gruenberg, J.,** (2000), Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol.*, **10**(11): p. 459-462.
88. **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. *J Biol Chem.*, **241**(5): p. 1081-1084.
89. **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 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **55**(2): p. 366-369.
90. **Quintern, L.E., Weitz, G., Nehr Korn, H., Tager, J.M., Schram, A.W., and Sandhoff, K.,** (1987), Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta.*, **922**(3): p. 323-336.
91. **Quintern, L.E., Schuchman, E.H., Levran, O., Suchi, M., Ferlinz, K., Reinke, H., Sandhoff, K., and Desnick, R.J.,** (1989), Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *Embo J.*, **8**(9): p. 2469-2473.
92. **Newrzella, D. and Stoffel, W.,** (1992), Molecular cloning of the acid sphingomyelinase of the mouse and the organization and complete nucleotide sequence of the gene. *Biol Chem Hoppe Seyler.*, **373**(12): p. 1233-1238.
93. **Newrzella, D. and Stoffel, W.,** (1996), Functional analysis of the glycosylation of murine acid sphingomyelinase. *J Biol Chem.*, **271**(50): p. 32089-32095.
94. **Ferlinz, K., Hurwitz, R., Moczall, H., Lansmann, S., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K.,** (1997), Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *Eur J Biochem.*, **243**(1-2): p. 511-517.
95. **Bartelsen, O., Lansmann, S., Nettersheim, M., Lemm, T., Ferlinz, K., and Sandhoff, K.,** (1998), Expression of recombinant human acid sphingomyelinase in insect Sf21 cells: purification, processing and enzymatic characterization. *J Biotechnol.*, **63**(1): p. 29-40.
96. **Otterbach, B. and Stoffel, W.,** (1995), Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell.*, **81**(7): p. 1053-1061.
97. **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. *Nat Genet.*, **10**(3): p. 288-293.
98. **Spence, M.W., Byers, D.M., Palmer, F.B., and Cook, H.W.,** (1989), A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J Biol Chem.*, **264**(10): p. 5358-5363.
99. **Schissel, S.L., Schuchman, E.H., Williams, K.J., and Tabas, I.,** (1996), Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem.*, **271**(31): p. 18431-18436.
100. **Schissel, S.L., Keesler, G.A., Schuchman, E.H., Williams, K.J., and Tabas, I.,** (1998), The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem.*, **273**(29): p. 18250-18259.
101. **Tabas, I.,** (1999), Secretory sphingomyelinase. *Chem Phys Lipids.*, **102**(1-2): p. 123-130.
102. **Duan, R.D., Nyberg, L., and Nilsson, A.,** (1995), Alkaline sphingomyelinase activity in rat gastrointestinal tract: distribution and characteristics. *Biochim Biophys Acta.*, **1259**(1): p. 49-55.

103. **Duan, R.D. and Nilsson, A.**, (1997), Purification of a newly identified alkaline sphingomyelinase in human bile and effects of bile salts and phosphatidylcholine on enzyme activity. *Hepatology*, **26**(4): p. 823-830.
104. **Nyberg, L., Duan, R.D., Axelson, J., and Nilsson, A.**, (1996), Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile. *Biochim Biophys Acta*, **1300**(1): p. 42-48.
105. **Hertervig, E., Nilsson, A., Nyberg, L., and Duan, R.D.**, (1997), Alkaline sphingomyelinase activity is decreased in human colorectal carcinoma. *Cancer*, **79**(3): p. 448-453.
106. **Hertervig, E., Nilsson, A., Bjork, J., Hultkrantz, R., and Duan, R.D.**, (1999), Familial adenomatous polyposis is associated with a marked decrease in alkaline sphingomyelinase activity: a key factor to the unrestrained cell proliferation? *Br J Cancer*, **81**(2): p. 232-236.
107. **Yamaguchi, S. and Suzuki, K.**, (1978), A novel magnesium-independent neutral sphingomyelinase associated with rat central nervous system myelin. *J Biol Chem*, **253**(12): p. 4090-4092.
108. **Okazaki, T., Bielawska, A., Domae, N., Bell, R.M., and Hannun, Y.A.**, (1994), Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Jun 10;269(23):16518]. *J Biol Chem*, **269**(6): p. 4070-4077.
109. **Liu, B., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A.**, (1997), Sphingomyelinases in cell regulation. *Semin Cell Dev Biol*, **8**(3): p. 311-322.
110. **Hostetler, K.Y. and Yazaki, P.J.**, (1979), The subcellular localization of neutral sphingomyelinase in rat liver. *J Lipid Res*, **20**(4): p. 456-463.
111. **Spence, M.W., Wakkary, J., Clarke, J.T., and Cook, H.W.**, (1982), Localization of neutral magnesium-stimulated sphingomyelinase in plasma membrane of cultured neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, **719**(1): p. 162-164.
112. **Das, D.V., Cook, H.W., and Spence, M.W.**, (1984), Evidence that neutral sphingomyelinase of cultured murine neuroblastoma cells is oriented externally on the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, **777**(2): p. 339-342.
113. **Tamiya-Koizumi, K., Umekawa, H., Yoshida, S., and Kojima, K.**, (1989), Existence of Mg²⁺-dependent, neutral sphingomyelinase in nuclei of rat ascites hepatoma cells. *J Biochem (Tokyo)*, **106**(4): p. 593-598.
114. **Chatterjee, S. and Ghosh, N.**, (1989), Neutral sphingomyelinase from human urine. Purification and preparation of monospecific antibodies [published erratum appears in *J Biol Chem* 1990 Jan 15;265(2):1231]. *J Biol Chem*, **264**(21): p. 12554-12561.
115. **Ghosh, N., Sabbadini, R., and Chatterjee, S.**, (1998), Identification, partial purification, and localization of a neutral sphingomyelinase in rabbit skeletal muscle: neutral sphingomyelinase in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*, **189**(1-2): p. 161-168.
116. **Liu, B., Hassler, D.F., Smith, G.K., Weaver, K., and Hannun, Y.A.**, (1998), Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserine-stimulated sphingomyelinase from rat brain. *J Biol Chem*, **273**(51): p. 34472-34479.
117. **Bernardo, K., et al.**, (2000), Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. *J Biol Chem*, **275**(11): p. 7641-7647.
118. **Tomiuk, S.**, (1999), Neutrale Mg²⁺-abhängige Sphingomyelinase. Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung des Enzyms aus Säugern. Dissertation, Universität zu Köln.
119. **Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N., and Hofmann, K.**, (1996), A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput Chem*, **20**(1): p. 3-23.
120. **Suck, D. and Oefner, C.**, (1986), Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature*, **321**(6070): p. 620-625.
121. **Weston, S.A., Lahm, A., and Suck, D.**, (1992), X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, **226**(4): p. 1237-1256.
122. **Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P., and Tainer, J.A.**, (1995), Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. *Nature*, **374**(6520): p. 381-386.
123. **Matsuo, Y., Yamada, A., Tsukamoto, K., Tamura, H., Ikezawa, H., Nakamura, H., and Nishikawa, K.**, (1996), A distant evolutionary relationship between bacterial sphingomyelinase and mammalian DNase I. *Protein Sci*, **5**(12): p. 2459-2467.
124. **Fujii, S., Inoue, B., Yamamoto, H., Ogata, K., Shinki, T., Inoue, S., Tomita, M., Tamura, H., Tsukamoto, K., Ikezawa, H., and Ikeda, K.**, (1998), Mg²⁺ binding and catalytic function of sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *J Biochem (Tokyo)*, **124**(6): p. 1178-1187.
125. **Liu, B. and Hannun, Y.A.**, (1997), Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem*, **272**(26): p. 16281-16287.

126. **Mizutani, Y., Tamiya-Koizumi, K., Irie, F., Hirabayashi, Y., Miwa, M., and Yoshida, S.,** (2000), Cloning and expression of rat neutral sphingomyelinase: enzymological characterization and identification of essential histidine residues. *Biochim Biophys Acta.*, **1485**(2-3): p. 236-246.
127. **Sawai, H., Okamoto, Y., Luberto, C., Mao, C., Bielawska, A., Domae, N., and Hannun, Y.A.,** (2000), Identification of ISC1 (YER019w) as inositol phosphosphingolipid phospholipase C in *saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]. *J Biol Chem.*, **275**(50): p. 39793-39798.
128. **Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W.,** (2000), Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**(11): p. 5895-5900.
129. **Chatterjee, S., Han, H., Rollins, S., and Cleveland, T.,** (1999), Molecular cloning, characterization, and expression of a novel human neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.*, **274**(52): p. 37407-37412.
130. **Rodrigues-Lima, F., Fensome, A.C., Josephs, M., Evans, J., Veldman, R.J., and Katan, M.,** (2000), Structural requirements for catalysis and membrane targeting of mammalian enzymes with neutral sphingomyelinase and lysophospholipid phospholipase C activities. Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.*, **275**(36): p. 28316-28325.
131. **Hardouin, S.N. and Nagy, A.,** (2000), Mouse models for human disease. *Clin Genet.*, **57**(4): p. 237-244.
132. **DePamphilis, M.L., Herman, S.A., Martinez-Salas, E., Chalifour, L.E., Wirak, D.O., Cupo, D.Y., and Miranda, M.,** (1988), Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *Biotechniques.*, **6**(7): p. 662-680.
133. **Jaenisch, R., Jahner, D., Nobis, P., Simon, I., Lohler, J., Harbers, K., and Grotkopp, D.,** (1981), Chromosomal position and activation of retroviral genomes inserted into the germ line of mice. *Cell.*, **24**(2): p. 519-529.
134. **Capecchi, M.R.,** (1989), Altering the genome by homologous recombination. *Science.*, **244**(4910): p. 1288-1292.
135. **Thomas, K.R. and Capecchi, M.R.,** (1986), Introduction of homologous DNA sequences into mammalian cells induces mutations in the cognate gene. *Nature.*, **324**(6092): p. 34-38.
136. **Evans, M.J. and Kaufman, M.H.,** (1981), Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.*, **292**(5819): p. 154-156.
137. **Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D.,** (1988), Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.*, **336**(6200): p. 688-690.
138. **Brown, D.G., Willington, M.A., Findlay, I., and Muggleton-Harris, A.L.,** (1992), Criteria that optimize the potential of murine embryonic stem cells for in vitro and in vivo developmental studies. *In Vitro Cell Dev Biol.*, **28A**(11-12): p. 773-778.
139. **Fedorov, L.M., Haegel-Kronenberger, H., and Hirchenhain, J.,** (1997), A comparison of the germline potential of differently aged ES cell lines and their transfected descendants. *Transgenic Res.*, **6**(3): p. 223-231.
140. **Mansour, S.L., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R.,** (1988), Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature.*, **336**(6197): p. 348-352.
141. **Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E.,** (1984), Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.*, **309**(5965): p. 255-256.
142. **Wood, S.A., Pascoe, W.S., Schmidt, C., Kemler, R., Evans, M.J., and Allen, N.D.,** (1993), Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**(10): p. 4582-4585.
143. **Wood, S.A., Allen, N.D., Rossant, J., Auerbach, A., and Nagy, A.,** (1993), Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras. *Nature.*, **365**: p. 87-89.
144. **Sternberg, N. and Hamilton, D.,** (1981), Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.*, **150**(4): p. 467-486.
145. **Sauer, B. and Henderson, N.,** (1988), Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **85**(14): p. 5166-5170.
146. **Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W., and Baltimore, D.,** (1996), Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity.*, **4**(4): p. 377-385.
147. **Pham, C.T., MacIvor, D.M., Hug, B.A., Heusel, J.W., and Ley, T.J.,** (1996), Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**(23): p. 13090-13095.
148. **Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., and Rajewsky, K.,** (1994), Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting [see comments]. *Science.*, **265**(5168): p. 103-106.
149. **Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K.,** (1995), Inducible gene targeting in mice. *Science.*, **269**(5229): p. 1427-1429.

150. **Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F.,** (1996), Conditional gene targeting. *J Clin Invest.* **98**(3): p. 600-603.
151. **Sauer, B.,** (1998), Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods.* **14**(4): p. 381-392.
152. **Hofmann, K. and Dixit, V.M.,** (1998), Ceramide in apoptosis--does it really matter? *Trends Biochem Sci.* **23**(10): p. 374-377.
153. **Krönke, M.,** (1999), Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways. *Chem Phys Lipids.* **102**(1-2): p. 157-166.
154. **Mathias, S., Pena, L.A., and Kolesnick, R.N.,** (1998), Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J.* **335**(Pt 3): p. 465-480.
155. **Jarvis, W.D., Fornari, F.A., Jr., Auer, K.L., Freermerman, A.J., Szabo, E., Birrer, M.J., Johnson, C.R., Barbour, S.E., Dent, P., and Grant, S.,** (1997), Coordinate regulation of stress- and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Mol Pharmacol.* **52**(6): p. 935-947.
156. **Westwick, J.K., Bielawska, A.E., Dbaibo, G., Hannun, Y.A., and Brenner, D.A.,** (1995), Ceramide activates the stress-activated protein kinases. *J Biol Chem.* **270**(39): p. 22689-22692.
157. **Baichwal, V.R. and Baeuerle, P.A.,** (1997), Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol.* **7**(2): p. R94-96.
158. **Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M.,** (1996), Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* **274**(5288): p. 787-789.
159. **Wang, C.Y., Mayo, M.W., and Baldwin, A.S., Jr.,** (1996), TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* **274**(5288): p. 784-787.
160. **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**(6): p. 1005-1015.
161. **Watts, J.D., Gu, M., Polverino, A.J., Patterson, S.D., and Aebersold, R.,** (1997), Fas-induced apoptosis of T cells occurs independently of ceramide generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(14): p. 7292-7296.
162. **Cahill, M.A., Janknecht, R., and Nordheim, A.,** (1996), Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr Biol.* **6**(1): p. 16-19.
163. **Hofmann, K.,** (1999), The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol Life Sci.* **55**(8-9): p. 1113-1128.
164. **Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M.,** (2000), Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* **69**: p. 217-245.
165. **Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y.,** (1998), Caspases: enemies within. *Science.* **281**(5381): p. 1312-1316.
166. **Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D.K., Thornberry, N.A., Yamin, T.T., and Nicholson, D.W.,** (1996), CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* **271**(4): p. 1841-1844.
167. **Verhoven, B., Schlegel, R.A., and Williamson, P.,** (1995), Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med.* **182**(5): p. 1597-1601.
168. **Jayadev, S., Linardic, C.M., and Hannun, Y.A.,** (1994), Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* **269**(8): p. 5757-5763.
169. **Jayadev, S., Hayter, H.L., Andrieu, N., Gamard, C.J., Liu, B., Balu, R., Hayakawa, M., Ito, F., and Hannun, Y.A.,** (1997), Phospholipase A2 is necessary for tumor necrosis factor alpha-induced ceramide generation in L929 cells. *J Biol Chem.* **272**(27): p. 17196-17203.
170. **Botitsi, E., Mavri-Vavayanni, M., and Sifaka-Kapadai, A.,** (1998), Metabolic fate of platelet-activating factor (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and lyso-PAF (1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine) in FRTL5 cells. *J Lipid Res.* **39**(6): p. 1295-1304.
171. **Newrzella, D.,** (1997), Die murine saure Sphingomyelinase. Untersuchungen zur Struktur und Funktion durch in vitro Mutagenese und Expression. Dissertation, Universität zu Köln.
172. **Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R.D.,** (1991), Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell.* **67**(3): p. 601-616.
173. **Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., and Ikehara, Y.,** (1986), Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* **261**(24): p. 11398-11403.
174. **Hofmann, K.,** persönliche Mitteilung.
175. **Hasty, P., Rivera-Perez, J., and Bradley, A.,** (1991), The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* **11**(11): p. 5586-5591.
176. **Mansouri, A.,** *Homologous recombination in embryonic stem cells*, in *Dept. of Molecular Cell Biology*. 1989, MPI for Biophysical Chemistry: Göttingen.

177. **Okada, K., Lijnen, H.R., Dewerchin, M., Belayew, A., Matsuo, O., Collen, D., and Bernaerts, R.,** (1997), Characterization and targeting of the murine alpha2-antiplasmin gene. *Thromb Haemost.* **78**(3): p. 1104-1110.
178. **Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J.C.,** (1993), Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(18): p. 8424-8428.
179. **Swiatek, P.J. and Gridley, T.,** (1993), Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*. *Genes Dev.* **7**(11): p. 2071-2084.
180. **Voss, A.K., Thomas, T., and Gruss, P.,** (1997), Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res.* **230**(1): p. 45-49.
181. **Liu, X., Wu, H., Loring, J., Hormuzdi, S., Disteche, C.M., Bornstein, P., and Jaenisch, R.,** (1997), Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev Dyn.* **209**(1): p. 85-91.
182. **Boison, D. and Stoffel, W.,** (1994), Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(24): p. 11709-11713.
183. **Janßen, U.,** (1997), Die mitochondrialen β -Oxidationsenzyme 3,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase und Enoyl-CoA Hydratase. Erstellung einer Isomerase defizienten Mauslinie. Dissertation Universität zu Köln.
184. **Uschkureit, T.,** (2000), Struktur Funktionsanalyse der Myelinmembran von Axonen des zentralen Nervensystems durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination. Dissertation, Universität zu Köln.
185. **Tomiuk, S., Zumbansen, M., and Stoffel, W.,** (2000), Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* **275**(8): p. 5710-5717.
186. **Green, C.B. and Besharse, J.C.,** (1996), Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(25): p. 14884-14888.
187. **Whittingham, D.G., Leibo, S.P., and Mazur, P.,** (1972), Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* **178**(59): p. 411-414.
188. **Wood, M.J. and Farrant, J.,** (1980), Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology.* **17**(2): p. 178-180.
189. **Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M., and Stoffel, W.,** (1998), Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(7): p. 3638-3643.
190. **Dressler, K.A., Mathias, S., and Kolesnick, R.N.,** (1992), Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science.* **255**(5052): p. 1715-1718.
191. **Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N.,** (1994), Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med.* **180**(2): p. 525-535.
192. **Smith, E.R. and Merrill, A.H., Jr.,** (1995), Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the "burst" of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. *J Biol Chem.* **270**(32): p. 18749-18758.
193. **Smith, E.R., Jones, P.L., Boss, J.M., and Merrill, A.H., Jr.,** (1997), Changing J774A.1 cells to new medium perturbs multiple signaling pathways, including the modulation of protein kinase C by endogenous sphingoid bases. *J Biol Chem.* **272**(9): p. 5640-5646.
194. **Linardic, C.M. and Hannun, Y.A.,** (1994), Identification of a distinct pool of sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle. *J Biol Chem.* **269**(38): p. 23530-23537.
195. **Fensome, A.C., Rodrigues-Lima, F., Josefs, M., Paterson, H.F., and Katan, M.,** (2000), A neutral magnesium-dependent sphingomyelinase isoform associated with intracellular membranes and reversibly inhibited by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* **275**(2): p. 1128-1136.
196. **Neuberger, Y., Shogomori, H., Levy, Z., Fainzilber, M., and Futerman, A.H.,** (2000), A lysosomal platelet activating factor phospholipase C, originally suggested to be a neutral-sphingomyelinase, is located in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **469**(1): p. 44-46.
197. **Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D.,** (2000), Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* **287**(5453): p. 664-666.
198. **Urano, F., Bertolotti, A., and Ron, D.,** (2000), IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum [In Process Citation]. *J Cell Sci.* **113**(Pt 21): p. 3697-3702.
199. **Serres-Guillaumond, M., Broquet, P., and Louisot, P.,** (1985), Involvement of phospholipids in the modulation of a membrane-bound brain fucosyltransferase. *Can J Biochem Cell Biol.* **63**(4): p. 296-304.

200. **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. *J Biol Chem.* **274**(53): p. 38131-38139.
201. **Lee, T.C. and Snyder, F.,** (1973), Phospholipid metabolism in rat liver endoplasmic reticulum. Structural analyses, turnover studies and enzymic activities. *Biochim Biophys Acta.* **291**(1): p. 71-82.
202. **Snyder, F.,** (1995), Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J.* **305**(Pt 3): p. 689-705.
203. **Strum, J.C. and Daniel, L.W.,** (1993), Identification of a lysophospholipase C that may be responsible for the biosynthesis of choline plasmalogens by Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* **268**(34): p. 25500-25508.
204. **Deng, C. and Capecchi, M.R.,** (1992), Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol.* **12**(8): p. 3365-3371.
205. **te Riele, H., Maandag, E.R., and Berns, A.,** (1992), Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**(11): p. 5128-5132.
206. **Hasty, P., Crist, M., Grompe, M., and Bradley, A.,** (1994), Efficiency of insertion versus replacement vector targeting varies at different chromosomal loci. *Mol Cell Biol.* **14**(12): p. 8385-8390.
207. **Korenbaum, E.,** persönliche Mitteilung. .
208. **Threadgill, D.W., Yee, D., Matin, A., Nadeau, J.H., and Magnuson, T.,** (1997), Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm Genome.* **8**(6): p. 390-393.
209. **Bosio, A.,** (1997), Dissertation, Universität zu Köln. .
210. **Taguchi, R., Hayakawa, J., Takeuchi, Y., and Ishida, M.,** (2000), Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **35**(8): p. 953-966.
211. **Schneiter, R., et al.,** (1999), Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J Cell Biol.* **146**(4): p. 741-754.
212. **Brugger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J.B., Lehmann, W.D., Nickel, W., and Wieland, F.T.,** (2000), Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles [In Process Citation]. *J Cell Biol.* **151**(3): p. 507-518.
213. **Ramstedt, B. and Slotte, J.P.,** (2000), Separation and purification of sphingomyelin diastereomers by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* **282**(2): p. 245-249.
214. **Grizard, G., Sion, B., Bauchart, D., and Boucher, D.,** (2000), Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **740**(1): p. 101-107.
215. **Brown, M.S. and Goldstein, J.L.,** (1999), A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(20): p. 11041-11048.
216. **Alessenko, A. and Chatterjee, S.,** (1995), Neutral sphingomyelinase: localization in rat liver nuclei and involvement in regeneration/proliferation. *Mol Cell Biochem.* **143**(2): p. 169-174.
217. **McNeish, J., et al.,** (2000), High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(8): p. 4245-4250.
218. **Callow, M.J., Dudoit, S., Gong, E.L., Speed, T.P., and Rubin, E.M.,** (2000), Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice [In Process Citation]. *Genome Res.* **10**(12): p. 2022-2029.
219. **Kasai, K., Takahashi, S., Murakami, K., and Nakayama, K.,** (1995), Strain-specific presence of two TGN38 isoforms and absence of TGN41 in mouse. *J Biol Chem.* **270**(24): p. 14471-14476.
220. **Sankaram, M.B. and Thompson, T.E.,** (1990), Interaction of cholesterol with various glycerophospholipids and sphingomyelin. *Biochemistry.* **29**(47): p. 10670-10675.
221. **Ruiz-Arguello, M.B., Basanez, G., Goni, F.M., and Alonso, A.,** (1996), Different effects of enzyme-generated ceramides and diacylglycerols in phospholipid membrane fusion and leakage. *J Biol Chem.* **271**(43): p. 26616-26621.
222. **Ruiz-Arguello, M.B., Goni, F.M., and Alonso, A.,** (1998), Vesicle membrane fusion induced by the concerted activities of sphingomyelinase and phospholipase C. *J Biol Chem.* **273**(36): p. 22977-22982.
223. **Chen, C.S., Rosenwald, A.G., and Pagano, R.E.,** (1995), Ceramide as a modulator of endocytosis. *J Biol Chem.* **270**(22): p. 13291-13297.
224. **Zha, X., Pierini, L.M., Leopold, P.L., Skiba, P.J., Tabas, I., and Maxfield, F.R.,** (1998), Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J Cell Biol.* **140**(1): p. 39-47.
225. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.,** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory,.

226. **Birnboim, H.C.**, (1983), A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **100**: p. 243-255.
227. **Hanahan, D.**, (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.*, **166**(4): p. 557-580.
228. **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.**, (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **74**(12): p. 5463-5467.
229. **Stoffel, W., LeKim, D., and Tschung, T.S.**, (1971), A simple chemical method for labelling phosphatidylcholine and sphingomyelin in the choline moiety. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, **352**(8): p. 1058-1064.
230. **Bradford, M.M.**, (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**: p. 248-254.
231. **Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.**, (1985), Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279]. *Anal Biochem.*, **150**(1): p. 76-85.
232. **Laemmli, U.K.**, (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**(259): p. 680-685.
233. **Bligh, E., Dyer, W.**, (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*, **37**: p. 911-917.
234. **Dittmer, J. and Lester, R.**, (1964), A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatography. *J Lipid Res.*, **5**: p. 126-127.
235. **Ledeen, R.W., Yu, R. K.**, (1982), Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol.*, **83**: p. 139-191.
236. **Zumbansen, M. and Stoffel, W.**, (1997), Tumor necrosis factor alpha activates NF-kappaB in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.*, **272**(16): p. 10904-10909.
237. **Hogan, E., Costantini, F., and Lacy, E.**, *Manipulating the Mouse Embryo*. 1986, New York: Cold Spring Harbour Laboratory.
238. **Chan, S.Y. and Evans, M.J.**, (1991), In situ freezing of embryonic stem cells in multiwell plates. *Trends Genet.*, **7**(3): p. 76.
239. **Kyhse-Andersen, J.**, (1984), Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.*, **10**(3-4): p. 203-209.
240. **Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J.**, (1979), Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **76**: p. 4350-4357.

Kurzzusammenfassung

Sphingomyelin ist eine Hauptkomponente zellulärer Membranen. Sphingomyelinasen (SMasen) katalysieren den ersten Schritt im Katabolismus des Sphingomyelin und sind seit den 60er Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Mindestens fünf verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierung und unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften sind bis jetzt beschrieben worden. Nur die lysosomale saure Sphingomyelinase (aSMase) wurde bis jetzt kloniert und biochemisch und molekularbiologisch gut charakterisiert. Die molekulare Struktur und die *in vivo* Funktion(en) der neutralen, Mg^{2+} -abhängigen Isoformen (nSMasen) sind jedoch noch weitestgehend unbekannt. Kürzlich wurde mit bioinformatischen Methoden die erste Säuger-nSMase identifiziert, kloniert und ihre enzymatischen Eigenschaften aufgeklärt.

Das Mausezym (mnSMase) wurde im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* und durch Erstellung eines nullallelischen Mausmodelles *in vivo* charakterisiert.

Eine Beteiligung der mnSMase an TNF- α -induzierten, intrazellulären Signalketten konnte an überexprimierenden U937-Zellen nicht festgestellt werden. Charakterisierungen der Enzymspezifität der nSMase zeigten, daß das rekombinante Enzym neben Sphingomyelin auch die strukturell ähnlichen Phospholipide lyso-Phosphatidylcholin und lyso-platelet activating factor hydolysiert. Durch immunocytochemische Studien wurde die Lokalisation der mnSMase im endoplasmatischen Retikulum aufgeklärt.

Nach Klonierung des Maus-nSMase-Gens wurde durch *gene-targeting* in embryonalen Stammzellen ein nullallelisches Mausmodell erstellt.

Die Genablation wurde auf DNA, RNA und Proteinebene nachgewiesen. In den nSMase-defizienten Tieren wurden chimäre Transkripte mit dem eingeführten Selektionsmarker beobachtet, die jedoch zu keinem Protein translatiert werden. Die nullallelischen Tiere sind fertil und verhalten sich phänotypisch unauffällig. In nSMase-defizient Tieren waren die spezifischen neutralen Sphingomyelinase Aktivitäten in einigen Organen unverändert, in anderen reduziert oder nicht mehr detektierbar. Es ist daher anzunehmen, daß noch weitere Isoenzyme existieren. Die Lipidzusammensetzung verschiedener Organe nSMase-defizienter Tiere war nicht verändert. Studien zum Lipidmetabolismus durch radioaktive Markierungsexperimente an nSMase-defizienten Zellen *in vitro* zeigten keine Unterschiede zu Wildtyp-Zellen. Eine DNA-Array Analyse zeigte einige in nSMase-defizienten Tieren differentiell regulierte Gene. Diese Ergebnisse werden in weiterführenden Experimenten überprüft.

Abstract

Sphingomyelin is a major constituent of all cellular membranes. Sphingomyelinases (SMases) catalyze the first step in the degradation of sphingomyelin and have been studied intensively during the last 40 years. In mammalian cells at least five different isoforms of sphingomyelinases have been described, but only the acidic isoform (aSMase) has been cloned and characterized biochemically. Very little is known about the molecular structure and the *in vivo* function(s) of the neutral, Mg^{2+} -dependent isoenzymes. Recently, using a bioinformatical approach, the first mammalian neutral sphingomyelinase has been identified, cloned and characterized enzymatically.

During this work the murine enzyme (mnSMase) has been characterized *in vitro* and *in vivo* through generation of a knock out mouse model.

A contribution of mnSMase to TNF- α -induced signaling cascades could not be found in overexpressing U937 cells. Characterizations of the enzymatic specificity of nSMase revealed that the structurally related phospholipids lyso-phosphatidylcholine and lyso-platelet-activating-factor are additional substrates for the enzyme. The subcellular localization of nSMase in the endoplasmic reticulum could be resolved immunohistochemically.

A nSMase deficient mouse model has been generated by gene targeting in embryonic stem cells. The nSMase deficiency has been proven on DNA, RNA and protein level. Chimeric transcripts with the neo-selection marker have been detected and characterized. These transcripts are not translated into functional polypeptides.

nSMase knock out animals are fertile and show no obvious phenotype. In organs of nSMase deficient animals, specific enzymatic activities either remain unaltered, are reduced or are not detectable. This suggests the existence of at least one additional neutral sphingomyelinase.

The lipid composition of different organs remained unchanged in nSMase-deficient animals and the lipid metabolism, as studied by metabolic labeling experiments in nSMase-deficient cells, was not altered by nSMase gene disruption. By use of a DNA-Array several genes were identified as differently expressed between nSMase-deficient and wildtype animals.

Further experiments will be necessary to unravel the so far unknown physiological function of the enzyme.

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 Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel betreut worden.



Markus Zumbansen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Tomiuk, S., Hofmann, K., Nix, M., Zumbansen, M. and Stoffel, W.
Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, (1998) 3638-3643.

Tomiuk, S., Zumbansen, M. and Stoffel, W.
Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase.
J. Biol. Chem. **275**, (2000) 5710-5717

Lebenslauf

Name: Markus Zumbansen

Geburtsdatum: 4.10.1971

Geburtsort: Rheda-Wiedenbrück

Eltern: Dr. med Hans Zumbansen,
Beate Zumbansen geb. Schäpermeyer

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet seit dem 27.8.1999

Schulbildung:

August 1977 - Juli 1978	Eichendorfgrundschule Rheda-Wiedenbrück
August 1978 - Juli 1981	Städtische Grundschule Lippstadt Benninghausen
August 1981- Mai 1990	Ostendorfgymnasium Lippstadt
Mai 1990	Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

Juli 1990 – Juni 1991	Grundwehrdienst in Arolsen
-----------------------	----------------------------

Hochschulausbildung:

Oktober 1991	Beginn des Biologiestudiums an der Universität zu Köln
Oktober 1993	Diplom-Biologen-Vorprüfung
September 1995 – September 1996	Diplom-Biologen-Hauptprüfung und Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln. Thema: Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Aktivierung von NF- κ B durch Tumor-Nekrose-Faktor- α in Wildtyp und saurer Sphingomyelinase-defizienter Maus.
September 1996 – Mai 2001	Anfertigung der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. W. Stoffel am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln. Thema: Biochemische und molekularbiologische Studien zur Charakterisierung der murinen neutralen Sphingomyelinase <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .
seit September 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.

Köln, den 15. Februar 2001

