

Erzeugung und erste Charakterisierungen zweier Mausmutanten mit Defekten in der Ceramidsynthase 2 und 4

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Silke Imgrund
aus Euskirchen**

Bonn 2011

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Willecke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der Promotion: 20.10.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Bonn, Juni 2011

Silke Imgrund

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Herrn Prof. Dr. Klaus Willecke danke ich insbesondere für die Überlassung des interessanten Themas, die schnelle Veröffentlichung der CerS2^{gt} Mäuse, für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie die stete Unterstützung beim Aufbau von Kooperationen.

Herrn Prof. Dr. Walter Witke danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dr. Peter Dörmann und Herrn PD Dr. Matthias Eckhardt für ihre Teilnahme an der Promotionskommission als fachnaher Gutachter und fachangrenzender Gutachter.

Für die freundliche und erfolgreiche Kooperation sowie das Vermitteln neuer Techniken möchte ich mich bei den folgenden Mitgliedern auswärtiger Arbeitsgruppen bedanken: PD. Dr. Matthias Eckhardt, Prof. Dr. Dieter Hartmann, Prof. Dr. Konrad Sandhoff, Dr. Hany Farawanh (Bonn), Dr. Bernadette Breiden, Bonn, Prof. Dr. Carmen Birchmeier, Dr. Hagen Wende und Dr. Jochen Welcker (Berlin).

Bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Instituts für Genetik der Arbeitsgruppe Willecke, Scheidtmann und Witke, insbesondere Dr. Andrea Felten, Christiane Kremser, Julia Hecker, Dennis May, Dr. Melanie Schütz, Oliver Tress, Christine Siegmund, Marina Frank und Niko Dicke möchte ich mich für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und technischen Fragen sowie für die herzliche Atmosphäre bedanken. Anna-Lena Klemm danke ich für die Übernahme der weiteren Charakterisierung der CerS2^{gt/gt} Mäuse. Dr. Joachim Degen möchte ich für die Hilfe bei der Klonierungsstrategie zur CerS4KILacZ Maus sowie für seine Unterstützung bei unserem Berlin-Aufenthalt im Labor von Prof. Dr. Carmen Birchmeier bedanken.

Dr. Andrea Felten, Dr. Joachim Degen und Dr. Bernadette Breiden danke ich herzlich für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Schwester Iris, die mich durch alle Höhen und Tiefen der Doktorarbeit begleitet und mich immer unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

(A)/pA/PolyA	Polyadenylierungssignal	GlcCer	Glykosylceramid
BCI	Blastozysteninjektion	gt	Gene Trap
Abb.	Abbildung	h	Stunde(n)
Amp	Ampizillin(-Resistenzgen)	HR	homologe Region
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hs	Homo sapiens
ATP	Adenosintriphosphat	Hygro	Hygromyzin
bp	Basenpaare	In	Intron
bzw.	beziehungsweise	kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
°C	Grad Celcius	kDa	Kilodalton (1000 Da)
CMV	Cytomegalovirus	3-Keto	3-Ketosphinginin
cDNS	DNS-Kopie einer RNS	konz.	konzentriert
CDS	kodierende Region	L	Liter
Ce	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Lac1	Longevity assurance gene cognate 1
Cer	Ceramide	Lag1	Longevity assurance gene 1
CLN8	ein in der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose mutiertes Gen	LacCer	Laktosylceramid
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	Lass	Longevity assurance homologue of yeast Lag1
CoA	Coenzym A	LB-Medium	Luria-Bertani Medium
C-Terminus	carboxyterminales Ende eines Peptids	LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	loxP	Cre-Rekombinase Erkennungsstelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	Lsg.	Lösung
DNase	Desoxyribonuklease	LTR	Lange terminale Region
DNS	Desoxyribonukleinsäure	µg	Mikrogramm
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	µl	Mikroliter
dpc	Tage nach der Befruchtung (<i>dies post coitum</i>)	M	Molar
E	Exon	mA	Milliampere
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	mg	Milligramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	min	Minute(n)
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein	ml	Milliliter
ER	Endoplasmatisches Reticulum	mM	Millimolar
ES-Zellen	embryonale Stammzellen	Mm	<i>Mus musculus</i>
et al	et altera = und andere	Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
etc.	et cetera = und so weiter	mRNS	Boten-RNS
FB1	FumonisinB1	NCS	Neugeborenen-Kälberserum
FCS	fötale Kälberserum	Neo/neo	Neomycin-Resistenzgen
fg	Femtogramm	ng	Nanogramm
frt	Flp-Rekombinase Erkennungsstelle	NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
g	Gramm	³² P	Phosphorisotop 32
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Glc	Glukose	pBSK	pBlueskript SK (+/-)
		PCR	Polymerase-Kettenreaktion
		PGK	Phosphoglyzeratkinase
		pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription
S.	Schritt
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SA	Spleissakzeptor
SAP	Alkalische Phosphatase aus Krabben
SD	Spleissdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SSC	Trinatriumcitrat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TLC- Domäne	TRAM, CLN8, Lag1-Domäne
TRAM	translocating chain-associating protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) amino- methan
Tv	<i>Trichomonas vaginalis</i>
U	Enzymeinheit
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β - D-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel
∞	unendlich

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Überblick der Sphingolipidsynthese und der Phospholipid-/Triacylglycerinsynthese	2
1.1.1 De novo Biosynthese von Ceramid	4
1.1.2 Herstellung der komplexen Glykosphingolipide sowie Transport von Ceramid aus dem ER in den Golgi-Apparat	4
1.1.3 Synthese von Phospholipiden und Triacylglycerin	5
1.1.4 Abbau von Phospholipiden sowie Sphingolipiden und Wiederverwertung von Ceramid	6
1.2 Ceramidsynthasen	7
1.2.1 Entdeckung	7
1.2.2 Struktur der CerS Proteine aus der Maus sowie deren Gewebeexpressionsmuster und Fettsäureacyl-CoA Spezifität	8
1.2.3 Funktion von Ceramid	10
1.3 Aufbau des <i>CerS2</i> Gens und Proteins	11
1.4 Aufbau des <i>CerS4</i> Gens und Proteins	12
1.5 Nervensystem im Säugetier	13
1.5.1 Zelltypen des Nervensystems	14
1.5.2 Myelin	15
1.5.2.1 Struktureller Aufbau	15
1.5.2.2 Biochemische Zusammensetzung des Myelins	15
1.5.2.3 Entwicklung des Myelins	17
1.6 Leber	18
1.6.1 Aufbau der Leber	18
1.6.2 Hepatokarzinogenese	19
1.6.3 Ursachen des hepatozellulären Karzinoms	20
1.6.3.1 Nicht-alkoholische Lebererkrankung	21
1.7 Niere	22
1.7.1 Aufbau der Niere	22
1.7.2 Funktion von Ceramiden/Glykosphingolipiden in Nierenerkrankungen	23
1.8 Transgene Mäuse als Modellorganismen	23
1.8.1 Erzeugung transgener Mäuse	23
1.8.1.1 Gene targeting	24
1.8.1.2 „Gene Trap“	25
1.9 Zielsetzung	27
2. Material	28
2.1 PBS ⁻ (Phosphat gepufferte Salzlösung)	28
2.2 Lösungen für die Nukleinsäureanalyse	28
2.3 Lösungen für die Bakterienkultur	30
2.4 Lösungen für die Zellkultur	31
2.5 Lösungen für die LacZ-Färbung	32
2.6 Lösungen für die Immunoblot-Analyse	33
2.7 Lösungen für die Lipidanalytik	33
2.8 Anästhetikum	34
2.9 Kommerzielle Flüssigkeiten/Lösungen	34
2.10 Kommerzielle Reagenziensätze	34
2.11 Allgemeiner Laborbedarf	35

2.12	Geräte-Hersteller	35
2.13	Nukleinsäuren	36
2.13.1	Oligonukleotidstartermoleküle.....	36
2.13.2	Plasmide	38
2.13.3	Klonierungsvektoren	38
2.13.4	Hybridisierungssonden	39
2.14	Größenstandards.....	40
2.14.1	DNS, RNS und Protein	40
2.14.2	Lipidstandards.....	40
2.15	Bakterienstämme.....	41
2.16	Eukaryontische Zell-Linie	41
2.17	Mauslinien.....	41
2.18	Antikörper	42
3.	Methoden.....	43
3.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	43
3.1.1	Plasmid-Präparation aus Bakterien	43
3.1.1.1	Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation).....	43
3.1.1.2	Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation) aus Bakterien	43
3.1.1.3	Endotoxin-freie Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)	44
3.1.2	Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen	44
3.1.3	Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen.....	45
3.1.4	Isolierung der genomischen DNS aus der Leber.....	45
3.1.5	Isolierung der Gesamt-RNS aus Leber, Niere und Gehirn	45
3.1.6	Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen	46
3.1.6.1	Gelelution mit kommerziellen Reagenziensätzen.....	46
3.1.7	Natrium-Acetat-Fällung	46
3.1.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	47
3.1.8.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	47
3.1.8.2	Konzentrationsabschätzung im Gel.....	47
3.2	Nukleinsäure-Analysen.....	47
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.2.1.1	PCR zum Nachweis der Insertion der Rosafary Sequenz ins Genom von transgenen Mäusen (β geo PCR)	48
3.2.1.2	PCR zum Nachweis der Anwesenheit der Hygromycinresistenzkassette in der Rosafary Sequenz in transgenen Mäusen (Hygro PCR)	49
3.2.1.3	PCR zum Nachweis der Anwesenheit der Flp-Rekombinase in transgenen Mäusen (Flp PCR).....	49
3.2.1.4	PCR zur Erzeugung einer CerS2 Sonde für die CerS2 Southern-Blot Analyse (2_SB Sonde PCR)	50
3.2.1.5	PCR zur Erzeugung einer CerS6 Sonde zur Ermittlung der CerS6 Transkriptmenge in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen (CerS6 PCR).....	50
3.2.1.6	PCRs zur Erzeugung des Austauschvektors CerS4KILacZ	51
3.2.1.6.1	Fusions-PCR	51
3.2.1.6.2	PCR zur Erzeugung der 5' und 3' homologen Region des Retrievalvektors.....	51
3.2.1.6.3	PCR zur Erzeugung des Minitargetingvektors	52
3.2.1.6.3.1	PCR zur Amplifikation des Fusionsprodukts aus dem Spleissakzeptor und einer Teilsequenz des NLS-LacZ Gens	52
3.2.1.6.3.2	PCR für die Amplifikation der 3' homologen Region des Minitargetingvektors (3'HR Mini PCR)	53
3.2.1.6.3.3	PCR für die Amplifikation der verlängerten 3' homologen Region des Testvektors (3'HR Test PCR).....	54
3.2.1.7	PCR zum Nachweis der Insertion im Intron 1 des CerS4 Gens im Genom von HM1 (PCR I)	54
3.2.1.8	PCR zum Nachweis der homologen Rekombination von Lass4KILacZ in ES-Zellen (ES-Zell PCR)	55

3.2.1.9	PCR zur Erzeugung der 5´ Southern-Blot Sonde für die Charakterisierung der ES-Zell Klone (5´ Sonde PCR)	55
3.2.1.10	PCR zum Nachweis der Deletion der CerS4 kodierenden Region.....	56
3.3	Herstellung rekombinanter Plasmide	56
3.3.1	Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	56
3.3.2	Modifikationen und Ligation von DNS-Molekülen	57
3.3.2.1	Auffüllen klebriger Enden (Blunten)	57
3.3.2.2	Dephosphorylierung von Vektorrückgraten	57
3.3.2.3	Ligation von DNS-Fragmenten	57
3.3.2.4	Transformation	58
3.3.2.4.1	Herstellung von elektro-kompetenten Bakterien.....	58
3.3.2.4.2	Elektro-Transformation	59
3.3.3	Rekombineering	60
3.3.4	Anlegen von Glyzerinkulturen	63
3.3.5	Sequenzierung	63
3.4	Agarosegel-Elektrophorese	63
3.4.1	Native Agarosegel-Elektrophorese von DNS.....	63
3.4.2	Denaturierende Elektrophorese von RNS	64
3.5	Southern-Blot und Northern-Blot Analysen	64
3.5.1	Transfer von DNS (Southern-Blot Analyse)	65
3.5.2	Transfer von RNS (Northern-Blot Analyse)	65
3.5.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	66
3.6	Zellkultur	66
3.6.1	HM1 embryonale Stammzellen der Maus.....	66
3.6.1.1	Kultivierung der HM1 ES-Zellen.....	67
3.6.1.2	Einfrieren und Auftauen von HM1 ES-Zellen.....	67
3.6.2	Stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen mittels Elektroporation.....	68
3.6.3	Selektion von HM1 ES-Zellen auf stabile Integration und homologe Rekombination ...	68
3.6.4	Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone	69
3.6.5	Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion	69
3.7	Zucht- und Haltebedingungen von Versuchsmäusen	69
3.7.1	Blastozysteninjektion, Uterustransfer und Chimärismusgrad	70
3.8	Histologische Untersuchungen.....	70
3.8.1	Herstellung von Gefrierschnitten	70
3.8.2	X-Gal Färbung von unterschiedlichen Organen der CerS2 ^{+/-gt} und CerS2 ^{gt/gt} Mäuse	70
3.8.3	Histologische Analyse der Leber, Niere und Gehirn von CerS2 ^{+/-+} und CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	71
3.9	Proteinpräparation	72
3.9.1	Herstellung von Gehirnllysaten.....	72
3.9.2	Proteinbestimmung	72
3.9.3	Immunoblot Analyse	72
3.9.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	72
3.9.3.2	Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen.....	73
3.10	Lipidanalytik	74
3.10.1	Ceramidsynthase Aktivitätstest.....	74
3.10.2	Lipidanalyse über Dünnschichtchromatographie.....	74
3.10.2.1	Homogenisierung.....	75
3.10.2.2	Lipidextraktion	75
3.10.2.3	Lipidaufarbeitung	75
3.10.2.3.1	Alkalische Hydrolyse.....	75
3.10.2.3.2	DEAE-Anionenaustauschchromatographie	76
3.10.2.4	Entsalzung der Lipidextrakte.....	76
3.10.2.4.1	Entsalzung über RP-18.....	76
3.10.2.4.2	Folchextraktion.....	77
3.10.2.5	Dünnschichtchromatographie	77
3.10.2.6	Visualisierung.....	78

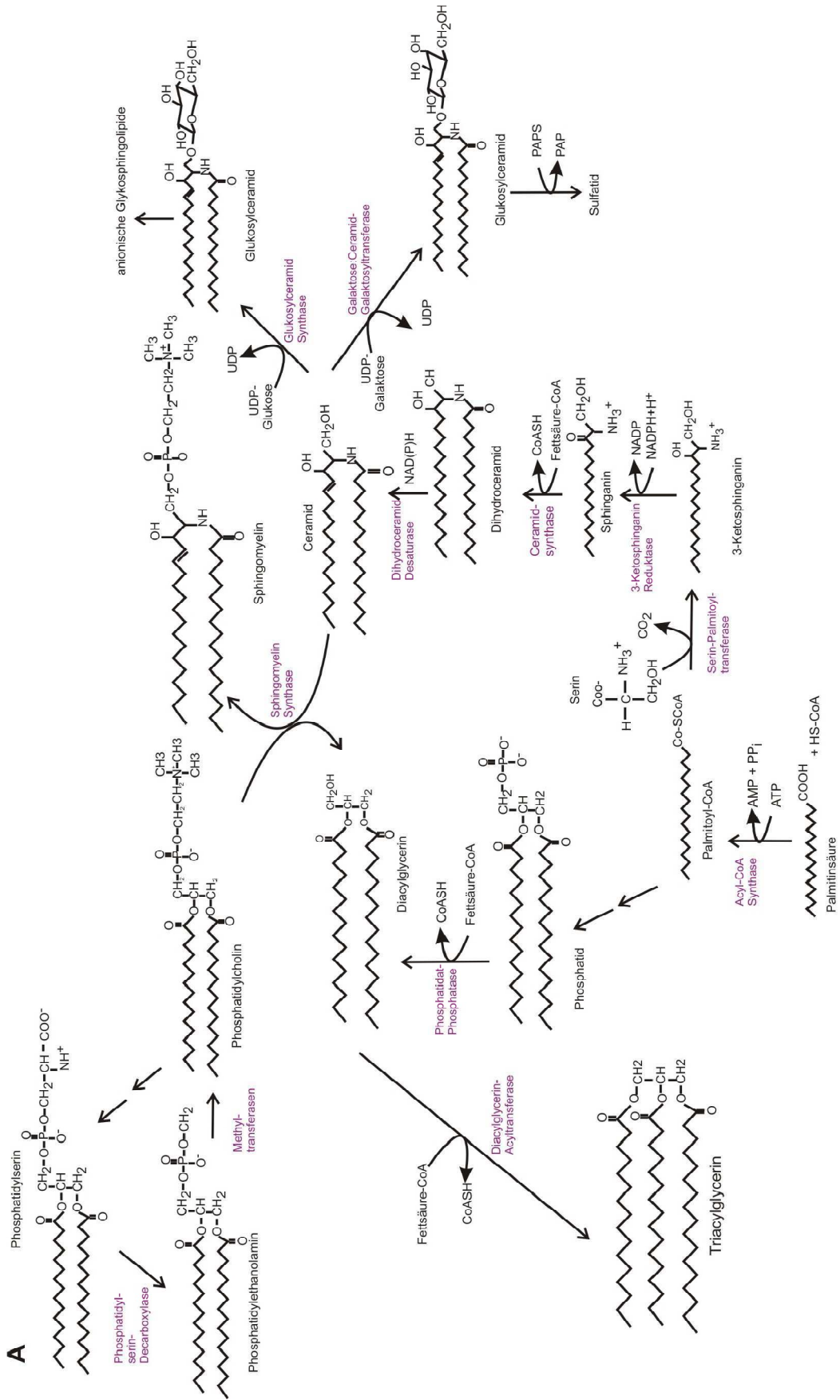
3.10.3	Myelin Präparation und Lipid Analyse von Sphingolipiden im Myelin und dem Ischias-Nerv über die Dünnschichtchromatographie	78
3.10.4	Lipidanalyse über Massenspektroskopie	79
4.	Ergebnisse	80
4.1	Charakterisierung von CerS2 „Gene Trap“ Mäusen.....	80
4.1.1	Charakterisierung der CerS2 „Gene Trap“ Mäuse mittels PCR, Southern-Blot und Northern-Blot Analyse	80
4.1.2	Transkriptmengen der <i>CerS1</i> , <i>CerS4</i> , <i>CerS5</i> und <i>CerS6</i> Gene im Gehirn von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	83
4.1.3	Vererbungsstatistik	84
4.1.4	β-Galaktosidase Reportergen Expression des Fusionsproteins βgeo in CerS2 ^{+/gt} und CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	84
4.1.5	Verhaltensphänotyp in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	88
4.1.6	Phänotypische Anomalien in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	89
4.1.6.1	Phänotypische Anomalien des Nervensystems in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	90
4.1.6.1.1	Morphologie und Anfärbbarkeit des Gehirns in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	90
4.1.6.1.2	Morphologie eines peripheren Nervs (Trigeminus) von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	91
4.1.6.2	Phänotypische Anomalien der Leber in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	92
4.1.6.3	Phänotypische Anomalien in der Niere von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	94
4.1.7	Ceramidsynthase Aktivitätstest.....	94
4.1.8	Analyse der Lipidzusammensetzung im Gehirn, in der Leber und in der Niere von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	96
4.1.8.1	Analyse der Sphingolipide im Gehirn, in der Leber und in der Niere von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen anhand der Massenspektroskopie.....	96
4.1.8.2	Analyse der komplexen Sphingolipide sowie der Phospholipide im Gehirn und in der Leber von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen anhand von Dünnschichtchromatographien.....	99
4.1.9	Expression des Myelin basischen Proteins in CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	108
4.2	Erzeugung einer nicht konditionalen CerS4 defizienten Mausmutante.....	110
4.2.1	Herstellung des CerS4KILacZ nicht konditionalen Vektors	110
4.2.2	Analyse der CerS4 BAC Klone	111
4.2.3	Klonierung des Retrievalvektors mit anschließendem „Rekombineering“	113
4.2.4	Klonierung des Minitargetingvektors mit anschließendem „Rekombineering“	115
4.2.5	Erzeugung des CerS4 Testvektors.....	120
4.2.6	Erzeugung und Charakterisierung von homolog rekombinierten CerS4KILacZ HM1 ES-Zellen	122
4.2.7	Blastozysteninjektion ausgewählter homolog rekombinierter ES-Zellklone, Verpaarungen resultierender Mauschimären sowie Genotypisierung der heterozygoten CerS4 ^{+/LacZ} Nachkommen.....	125
4.2.8	β-Galaktosidase Expression von Mäusen mit dem Genotyp CerS4 ^{LacZ/+} Maus in der Haut.....	126
5.	Diskussion.....	127
5.1	Charakterisierung von CerS2 deletierten Mäusen, die durch einen kommerziellen „Gene Trap“ ES-Zellklon erzeugt wurden.....	128
5.1.1	Biochemische Charakterisierung der CerS2 ^{gt/gt} Mäuse	129
5.1.2	Charakterisierung der Leber von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	131
5.1.3	Ursache des hepatozellulären Karzinoms	134
5.1.4	Vergleich von CerS2 „Gene Trap“ Mäusen aus den Laboren Futerman und Willecke	135
5.1.5	Charakterisierung der Niere von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen	136
5.1.6	Charakterisierung des Gehirns von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen... ..	137
5.1.7	Vergleich der CerS2 ^{gt/gt} Mäuse mit und ohne Hygromylinresistenz auf der Grundlage der neutralen Glykosphingolipide	142
5.2	Nicht konventioneller CerS4KILacZ Vektor	142
6.	Ausblick.....	145
6.1	Charakterisierung von CerS2 ^{gt/gt} Mäusen.....	145

6.2	Erzeugung von Ceramidsynthase 4 defizienten Mäusen.....	147
7.	Zusammenfassung	149
8.	Literaturverzeichnis	150
9.	Anhang	162

1. Einleitung

Eukaryontische Membranen bestehen aus einer durchgehenden Lipiddoppelschicht, in der Membranproteine eingebettet sind. Insgesamt gibt es vier Lipidarten, von denen jedoch nur drei Lipidarten in Plasmamembranen vorkommen (Cowart, 2009). 1.) Phospholipide bestehen aus Glycerin, an dem zwei Fettsäuren mit dem ersten und zweiten Kohlenstoffatom des Glycerins verestert sind und einer stark polaren oder geladenen Gruppe, die über eine Phosphodiesterbindung an das dritte Kohlenstoffatom gekoppelt ist. Sie befinden sich hauptsächlich in der inneren Membranschicht und sind die Hauptkomponenten der Plasmamembran. Eine Ausnahme bei den Phospholipiden ist Phosphatidylcholin; es befindet sich auf der äußeren und inneren Membranschicht der Plasmamembran. Neben der Funktion als Strukturkomponente können Phospholipide auch als sekundäre Botenstoffe an Signaltransduktionen beteiligt sein, wie z.B. Phosphoinositol (Farooqui et al., 2000). 2.) Cholesterol ist ein Steran mit einer 3 β -Hydroxygruppe und kann in beiden Schichten der Membran vorhanden sein. Es sorgt für die Membranstruktur und deren Fluidität und ist zusätzlich der Vorläufer von Hormonen (Ikonen, 2008). 3.) Die Sphingolipide besitzen als Grundgerüst Ceramid und unterscheiden sich nur durch ihre Kopfgruppen. Ceramid besteht aus einer Sphingoidbase und einer Fettsäure, die in ihrer Länge, im Sättigungsgrad und ihrem Hydroxylierungsgrad variieren kann. An die Fettsäure ist über eine Amidbindung das C2 der Sphingoidbase gebunden. Die Sphingolipide teilen sich in anionische und neutrale Sphingolipide ein. Die neutralen Sphingolipide können entweder als polare Kopfgruppe ein oder mehrere Zuckermoleküle enthalten und werden als neutrale Glykosphingolipide bezeichnet, oder sie besitzen als polare Kopfgruppe eine Phosphatidylethanolamin Kopfgruppe und bilden somit das Sphingomyelin, das am häufigsten in der Plasmamembran vertreten ist. Die anionischen Sphingolipide teilen sich in Ganglioside (anionische Glykosphingolipide) und Sulfoglykolipide auf. Die anionischen Glykosphingolipide besitzen als polare Kopfgruppe Oligosaccharide und einen oder mehrere Reste von N-Acetylneuraminsäuren (Lahiri und Futerman, 2007). Die Sulfoglykolipide enthalten als polare Gruppe neben einem oder mehreren Zuckermolekülen eine Sulfatgruppe. Das bekannteste Sulfoglykolipid ist Sulfatid, das als Kopfgruppe eine Sulfatgruppe und einen Galaktosylrest besitzt (Eckhardt, 2008). Sphingolipide befinden sich in der äußeren Plasmamembran und dienen als Strukturkomponente der Membranen, die die physikalischen Eigenschaften der Membranen sowie die Aktivität der Transmembranproteine beeinflussen können. Sie haben wichtige Funktionen als Signalmoleküle in einem weiten Bereich von biologischen Prozessen und können über ihre komplexe Kopfgruppe Lipid-Protein Interaktion ausbilden (Breslow und Weissman, 2010). 4.) Die neutralen Lipide, wie z.B. Triacylglycerin, werden als Energiespeicher in den Fetttropfen der Fettzellen, der Leber und im Muskel gespeichert. Triacylglycerin besteht aus Glycerin, an dem drei Fettsäuren an jeweils einem Kohlenstoff verestert sind (Athenstaedt und Daum, 2006).

1.1 Überblick der Sphingolipidsynthese und der Phospholipid-/Triacylglycerinsynthese



Synthese der Phospholipide

Synthese der Sphingolipide

B

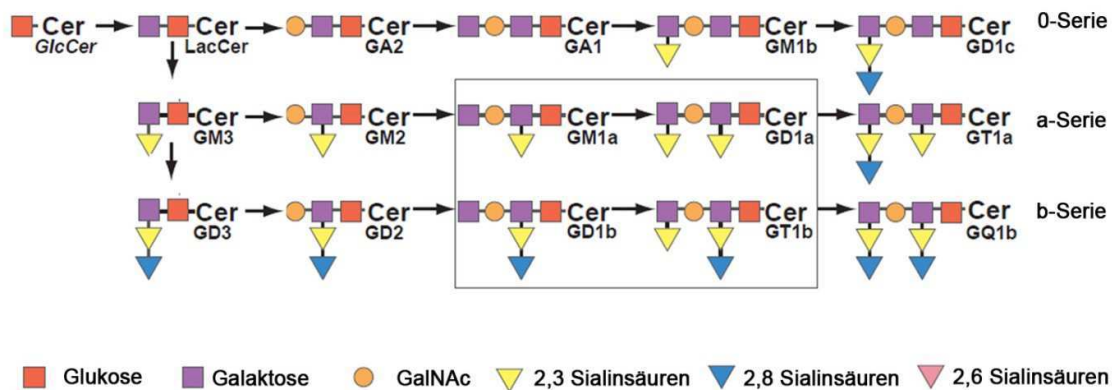


Abb 1.1: A Synthese der Phospholipide, der Sphingolipide und des Triacylglycerins. Eine Fettsäure z.B. Palmitinsäure kann in zwei Reaktionswege eingebaut werden. Im ersten Reaktionsweg kann über die *de novo* Biosynthese Ceramid erzeugt werden. Dieses ist der Vorläufer von Sphingolipiden. Ceramidsynthasen spielen eine Rolle in der *de novo* Biosynthese und in der Wiederverwertung der Sphingolipide, die sich im Endoplasmatischen Retikulum abspielt. Im zweiten Reaktionsweg können über die Diacylglycerin Biosynthese Phospholipide und Triacylglycerin synthetisiert werden. **B Synthese der anionischen Glykosphingolipide.** Die anionischen Glykosphingolipide entstehen durch den Transfer von einer oder mehreren Sialinsäuren sowie Galaktose auf Laktosylceramid und lassen sich in die 0-, a- und b-Serien einteilen. Die anionischen Sphingolipide GM1a, GD1a, GD1b und GT1b (im obigen Schema eingekastelt) werden hauptsächlich in Neuronen gebildet. UDP = Uridindiphosphat, PAPS = 3'Phosphoadenosin 5'Phosphosulfat, PAP = Adenosin-3'5-bis-Phosphat. (modifiziert nach Proia, 2004 und Breslow und Weissman, 2010).

Ceramidsynthasen spielen eine wichtige Rolle in der Synthese der Sphingolipide, die aus der *de novo* Biosynthese von Ceramid, Herstellung von Sphingolipiden (neutrale Glykosphingolipide und saure Sphingolipide), sowie dem Abbau bzw. der Wiederverwertung der Sphingolipide (*Salvage Pathway*) besteht. Die *de novo* Biosynthese von Ceramid sowie die Wiederverwertung der Sphingolipide ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Neben der Synthese für Sphingolipide kommt es zur Synthese von Phospholipiden und Triacylglycerin, die als gemeinsamen Vorläufer Diacylglycerin verwenden. Die Synthesewege für Ceramid und Diacylglycerin benötigen Fettsäureacyl-CoAs und sind durch die Sphingomyelinsynthase verbunden.

1.1.1. De novo Biosynthese von Ceramid

Die *de novo* Biosynthese von Ceramid beginnt an der zytoplasmatischen Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums mit der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA durch die Serin-Palmitoyltransferase zu 3-Ketosphinganin, welche wiederum durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase zu Sphinganin reduziert wird, die NADPH+H⁺ abhängig ist. Die Dihydroceramidsynthase acyliert Sphinganin zu Dihydroceramid. Dabei kann für diese Reaktion ein breites Spektrum von Fettsäureacyl-CoAs verwendet werden, das sich als Spezifität der Ceramidsynthasen (CerS) widerspiegelt. Durch Insertion einer trans 4,5 Doppelbindung in Dihydrosphinganin entsteht Ceramid. Diese Reaktion wird von der (Dihydro)ceramid-Desaturase katalysiert (Abb. 1.1A) (Gault et al., 2010).

1.1.2. Herstellung der komplexen Glykosphingolipide sowie Transport von Ceramid aus dem ER in den Golgi-Apparat

Ceramid ist Vorläufer von Sphingomyelin und Glykosphingolipiden (neutrale Glykosphingolipide: z.B. Hexosylceramid, GA1, GA2 und anionische Glykosphingolipide: Ganglioside (z.B. GM1, GM3) und Sulfatid). Die Synthese der Sphingolipide beginnt im Lumen des Golgi-Apparats bis auf die Synthese von Sulfatid. Die Synthese von Sulfatid startet im ER Lumen durch den Transfer von UDP-Galaktose durch die UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) auf Ceramid, wodurch Galaktosylceramid entsteht. Galaktosylceramid wird zum Golgi-Apparat transportiert. Dort angekommen wird auf Galaktosylceramid eine Sulfatgruppe durch die 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfate:Cerebroside Sulfotransferase (CST) von den 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfaten übertragen, wodurch Sulfatid gebildet wird (Eckhardt, 2008).

Die Synthese von Sphingomyelin findet auf der zytosolischen Oberfläche des Golgi-Apparats statt. Der Transport von Ceramid für die Sphingomyelin Synthese erfolgt über einen nicht-vesikulären Transportmechanismus. Dabei ist das zytoplasmatische Ceramid Transferprotein beteiligt, das als CERT bezeichnet wird (Hanada et al., 2009). Die Sphingomyelin Synthase katalysiert den Transfer von Phosphocholin auf Ceramid, wobei Diacylglycerin freigesetzt wird. Insgesamt gibt es zwei Sphingomyelin Synthasen. Die Sphingomyelin Synthase 1 ist im Golgi-Apparat lokalisiert, die Sphingomyelin Synthase 2 hingegen an der Plasmamembran (Holthuis und Luberto, 2010).

Glukosylceramid, der Vorläufer der neutralen und anionischen Sphingolipide, wird an der zytosolischen Oberfläche des Golgi-Apparats durch die Bindung aktivierter Glukose über eine glykosidische Bindung an die Hydroxylgruppe des Ceramids synthetisiert. Für den Glukosylceramid-Transfer von der zytoplasmatischen auf die luminale Seite des Golgi-Apparats gibt es zwei Modelle: Beim ersten Modell wird Glukosylceramid über FAPP2 (Vier

Phosphat Adapterprotein 2) zum Endoplasmatischen Retikulum zurücktransportiert und von dort über einen vesikulären Transport zum Lumen des Golgi Apparats geleitet (Halter et al., 2007). Im zweiten Modell wird Glukosylceramid vom cis Golgi zum trans Golgi mittels FAPP2 transportiert, wo es über einen unbekanntem Mechanismus auf die luminalen Seite des Golgi-Apparats befördert wird (D'Angelo et al., 2007). Auf der luminalen Seite des Golgi-Apparats entsteht Laktosylceramid durch den Transfer eines Galaktosyl-Rests auf Glukosylceramid, das durch die Galaktosyltransferase I katalysiert wird. Laktosylceramid stellt den Vorläufer der anionischen Glykosphingolipide dar. Durch den Transfer von einer oder mehreren Sialinsäuren sowie Galaktose auf Laktosylceramid entstehen durch Glykosyltransferasen die anionischen Glykosphingolipide, die sich in die 0-, a- und b-Serien einteilen lassen (Yu et al., 2010). In den Neuronen von adulten Mäusen werden hauptsächlich vier anionische Glykosphingolipide (GM1, GD1a, GD1b und GT1b) gebildet (Yu et al., 2008) (Abb. 1.1B).

1.1.3. Synthese von Phospholipiden und Triacylglycerin

Neben den Sphingolipiden werden Phospholipide und Triacylglycerin im Endoplasmatischen Retikulum und der äußeren Mitochondrienmembran synthetisiert (Prentiki und Madiraju, 2008). Triacylglycerin und Phospholipide haben den gemeinsamen Vorläufer Diacylglycerin. Die Synthese von Diacylglycerin startet mit Glycerin-3-phosphat, das entweder aus der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat durch die Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase aus der Glykolyse oder von Glycerin stammt. Durch zwei hintereinander ablaufende Veresterungen von Glycerin-3-phosphat mit jeweils einer Fettsäure Acylgruppe entsteht durch die Glycerin-3-phosphat Acyltransferase Phosphatid, das durch die Phosphatidat-Phosphatase zu 1,2 Diacylglycerin hydrolysiert werden kann. Bei der Triacylglycerin Synthese wird Diacylglycerin durch Umesterung mit einem dritten Fettsäureacyl-CoA zu Triacylglycerin umgesetzt (Shi und Cheng, 2009).

Bei der Synthese von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol wird eine polare Kopfgruppe wie Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol über eine Phosphodiesterbindung mit dem Diacylglycerin verknüpft. Die Synthese dieser Phosphodiesterbindung kann über zwei Reaktionswege erfolgen. Beim ersten Reaktionsweg entsteht CDP-Diacylglycerin und Pyrophosphat, die durch die Kondensation von Phosphatid und Cytidintriphosphat gebildet werden. CDP-Diacylglycerin ist der Vorläufer von Phosphatidylinositol, Cardiolipin und Phosphatidylglycerin. Beim zweiten Reaktionsweg wird die Kopfgruppe mit Cytidindiphosphat aktiviert und reagiert mit Diacylglycerin. Aus diesem Reaktionsweg entstehen die Phospholipide: Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin. Phospholipide können nicht nur durch die *de novo* Biosynthese erzeugt werden, sondern können auch untereinander konvertiert werden. Zum

Beispiel kann Phosphatidylcholin in Phosphatidylserin umgewandelt werden und Phosphatidylserin in Phosphatidylethanolamin (Kent, 1995) (Abb 1.1A).

1.1.4. Abbau von Phospholipiden sowie Sphingolipiden und Wiederverwertung von Ceramid

Phospholipide und Sphingolipide können abgebaut oder zu Ceramid wiederverwertet werden (*Salvage Pathway*). Es gibt einen klassischen und einen nicht-klassischen Reaktionsweg zum Abbau von Sphingomyelin. Im nicht-klassischen Reaktionsweg kann Sphingomyelin durch eine neutrale Sphingomyelinase in der Plasmamembran zu Ceramid abgebaut werden, das in der Plasmamembran als Signalmolekül für z.B. Apoptose dient oder zu Sphingosin abgebaut werden kann (Hofmann et al., 2000).

Im klassischen Reaktionsweg werden die Sphingolipide (einschließlich Sphingomyelin) der Plasmamembran endozytiert. In den frühen Endosomen knospet sich die Perimetermembran nach innen ab und es bilden sich intraendosomale Vesikel. Das Endosom reift zum Lysosom, das eine begrenzende Membran besitzt, die aufgrund ihrer Glykokalix abbauresistent ist. An diesen intralysosomalen Membranen findet der Abbau der Lipide statt, der an bestimmte Voraussetzungen gebunden ist: eine hohe Konzentration von Bis(monoacylglycero)-Phosphaten (BMP) und ein geringer Cholesterolgehalt. BMP ist ein Phospholipid, das im Gegensatz zu normalen Phospholipiden eine hohe Resistenz gegen Phospholipasen besitzt. Die Anwesenheit von Exohydrolasen sowie kleinen Sphingolipid Aktivatoren (Saposine A-D, GM2 Aktivator Protein), die die Interaktion zwischen dem membrangebundenen Lipidsubstrat und dem wasserlöslichen Enzym vermitteln oder die das Enzym direkt aktivieren, sind für den Abbau notwendig (Kolter und Sandhoff, 2010). Phospholipasen sowie Lysophospholipasen hydrolysieren Phospholipide zu Fettsäuren und Glycerin (Prentki und Madiraju, 2008). Sphingomyelin wird durch saure Sphingomyelinasen zu Ceramid und Phosphocholin degradiert (Liu et al., 1997). Neben Sphingomyelin werden die anderen Sphingolipide hingegen durch mindestens zehn unterschiedliche, spezifische saure Exohydrolasen zu Ceramid abgebaut (Kolter und Sandhoff, 2010).

Ceramid kann durch die saure Ceramidase zu Sphingosin und freien Fettsäuren hydrolysiert werden. Neben der sauren Ceramidase gibt es noch 2 weitere Klassen von Ceramidasen: Neutrale und Alkalische Ceramidasen (Mao und Obeid, 2008). Die Sphingosin-1-Kinase phosphoryliert wiederum Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat, welches in das Zytoplasma freigesetzt wird.

Sphingosin-1-Phosphat wird weiter abgebaut, oder es wird wiederverwertet. Der weitere Abbau führt über die Hydrolyse von Sphingosin zu Palmitaldehyd und Ethanolaminphosphat

durch die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase, welche bei der Biosynthese von Phosphatidylethanolamin, einem Phospholipid, benötigt wird.







Bei der Wiederverwertung wird Sphingosin-1-Phosphat zu Sphingosin durch die Sphingosin-1-Phosphatase dephosphoryliert. Sphingosin wird im ER durch die Ceramidsynthase zu Ceramid acyliert (Spiegel et al., 2003).

1.2 Ceramidsynthasen

1.2.1 Entdeckung

Die erste biochemische Charakterisierung von CerS wurde in Mikrosomen aus Hühner-Leber (Sribney, 1966), Maus- oder Ratten-Gehirnen (Sribney, 1966; Morell et al., 1970) und in mitochondrien-reichen Fraktionen (Shimeno, 1998) gefunden, bevor das Gen für CerS in der Hefe identifiziert und als Longevity assurance gene 1 (Lag1) bezeichnet wurde (D'Amello et al., 1996). Paralog zu Lag1 wurde in der Hefe Lac1 (Longevity assurance gene 1 cognate) gefunden, das ebenfalls für CerS kodiert (Jiang et al., 1998). Defiziente Lag1/Lac1 Doppelmutanten waren lebensfähig, aber zeigten Wachstumsdefekte (Schorling et al., 2001). Zum Lag1 Gen der Hefe wurden homologe Gene in unterschiedlichen Organismen wie in einigen Prokaryonten sowie Eukaryonten gefunden. In Eukaryonten wurde mit Hilfe von Computeranalysen ein Gen in der Fliege *Drosophila melanogaster*, das als schlank Gen bezeichnet wird, drei Gene in dem Wurm *Caenorhabditis elegans*, ein Gen in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, sechs Gene in der Maus, sechs Gene in der Ratte und sechs Gene im Menschen entdeckt. Die sechs homologen Gene zu Lag1 der Maus werden als die Familie der Lass Gene (Lag1 longevity assurance homology gene) bezeichnet (Mizutani et al., 2005, 2006). Die Lass Gene wurden 2008 umbenannt in die CerS Gene (Ceramidsynthase Gene) (Pewzner-Jung et al., 2006). Neben der Homologie des Lag1 Gens in anderen Organismen besitzt das Lag1 Gen eine Homologie zu den humanen Genen TRAM (translocating chain-associating protein) und CLN8 (einem bei der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose mutierten Gen). Das Lag1 Protein besitzt ein ähnliches Transmembranprofil wie diese beiden Proteine, jedoch weisen beide nicht das Lag1 Motif auf und sind vermutlich auch nicht an der Ceramidsynthase-Reaktion beteiligt (Winter et al., 2002). Das TRAM-Protein wurde als Regulator der Polypeptid Translokation in das ER beschrieben (Hedge et al., 1998; Winter et al., 2002). CLN8 Proteine sind Membranproteine, deren genaue Funktion bislang nicht bekannt ist.

1.2.2 Struktur der CerS Proteine aus der Maus sowie deren Gewebeexpressionsmuster und Fettsäureacyl-CoA Spezifität

Mitglieder	Struktur	Transkriptionsmuster	Fettsäureacyl-CoA
CerS1		NB+RT: Gehirn, Muskel, Hoden	C18:0
CerS2		NB+RT: Leber, Niere	C22:0-C24:0
CerS3		NB+RT: Hoden, Haut	C18:0-C:26:0
CerS4		NB: Haut, Lunge RT: Haut, Lunge, Herz, Leber	C18:0-C20:0 oder C22:0-C24:0
CerS5		NB: Niere, Hoden RT: Niere, Hoden, Skelettmuskel	C14:0-C16:0
CerS6		NB: Darm, Niere RT: Niere, Thymus, Hoden, Gehirn	C14:0-C16:0

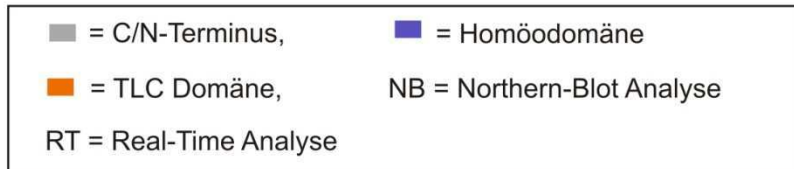


Abb. 1.2: Struktur der CerS Proteine aus der Maus sowie deren Transkriptionsmuster und Fettsäureacyl-CoA Spezifität. Es gibt 6 Mitglieder der Ceramidsynthase Familie, CerS1-CerS6, die ein unterschiedliches Gewebetranskriptionsmuster und eine Fettsäureacyl-CoA Spezifität aufweisen, die sich teilweise überlappen (Mizutani et al., 2005, 2006; Laviad et al., 2007).

Struktur der Ceramidsynthasen

Die CerS Proteine sind Transmembranproteine im Endoplasmatischen Retikulum, die aufgrund von Analysen in verschiedenen Laboratorien fünf bis acht Transmembrandomänen besitzen können (Kageyama-Yahara und Riezman, 2006; Mizutani et al., 2005; Pankova-Kholmyansky et al., 2006).

Alle CerS Proteine besitzen eine TRAM, CLN8, Lag1-Domäne, auch als TLC-Domäne bezeichnet, die sich über die letzten vier Transmembrandomänen erstreckt (Pankova-Kholmyansky et al., 2006; Winter et al., 2004). Das katalytische Lag1-Motif (**RKDxxxxxxHHxxTxxLxxxSYxxxxxxxGxxxxxLHDxSDxxLxxKxxxY**; die konservierten Aminosäuren sind fett markiert) innerhalb der TLC-Domäne besteht aus 52 Aminosäureresten und ist in allen Maus CerS Proteinen hoch konserviert (Spassieva et al., 2006) (Abb. 1.2).

Neben der TLC-Domäne besitzen CerS2 bis CerS6 Proteine eine weitere Domäne, eine Homöodomäne. Diese besteht aus 60 Aminosäureresten und könnte spezifisch an eine DNS

Sequenz binden (Gehring et al., 1993). NMR Strukturanalysen von Maus CerS5 und CerS6 Homöodomänen deuten daraufhin, dass deren Homöodomäne drei Helices ausbildet, die für eine DNS Sequenz Bindung notwendig sind (Voelzmann und Bauer, 2010). Zurzeit ist jedoch die Bindung der Homöodomäne von Ceramidsynthasen an DNS noch unbewiesen.

Zwischen der Homöodomäne und der TLC-Domäne befindet sich ein Motif (K/R)-P-x-x-x-x-K/R-F, das konserviert vorliegt. Deletionen sowie Mutationen von Lysin- oder Arginin-Resten in diesem Motif führen zur Abnahme der Ceramidsynthase Aktivität (Mesika et al., 2007).

Gewebespezifität der Ceramidsynthasen

Die CerS Gene unterscheiden sich in ihrem spezifischen Transkriptionsmuster. Anhand von Northern-Blot Analysen und Real-Time PCR Analysen wurde die Transkription der CerS Gene in verschiedenen Geweben untersucht. Teilweise unterscheiden sie sich in der Transkriptmenge abhängig von der Nachweismethode. *CerS1* wird hauptsächlich im Gehirn, im Muskel und im Hoden transkribiert, wohingegen *CerS3* mRNA hoch im Hoden sowie relativ niedrig in der Haut gefunden wurde. Die Transkripte für *CerS2*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6* werden schwach fast ubiquitär gebildet, jedoch nicht im Muskel. *CerS2* besitzt das höchste Transkriptionsniveau von allen Ceramidsynthasen. Seine stärkste Transkription ist in der Leber und der Niere vorhanden. Die Northern-Blot Analysen von *CerS4* deuten darauf hin, dass seine höchste Transkriptmenge in der Haut und der Lunge vorliegt, wohingegen die Real-Time PCR Analyse zusätzlich eine hohe Transkriptmenge in der Leber und im Herz aufweisen. Das Gen *CerS5* weist eine starke Transkription in der Niere und im Hoden auf und zusätzlich im Skelettmuskel in der Real-Time PCR Analyse. Die höchsten Transkriptmengen des *CerS6* Gens wurden im Darm und in der Niere aufgrund von Real-Time PCR Analysen gefunden, wohingegen in der Northern-Blot Analyse die höchsten Transkriptmengen des *CerS6* Gens in der Niere, im Thymus, im Hoden und im Gehirn nachgewiesen wurden (Mizutani et al., 2005, 2006; Laviad et al., 2007) (Abb. 1.2).

Fettsäureacyl-CoA Spezifität der Ceramidsynthasen

Jede CerS besitzt eine Fettsäureacyl-CoA Spezifität. Zur Bestimmung dieser Fettsäure Spezifität wurden die einzelnen Maus *CerS1*, *CerS2*, *CerS3*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6* cDNS in HEK 293 T-Zellen überexprimiert oder für die *CerS2*, *CerS4* und *CerS6* Gene durch die Transfektion von siRNS in HEK Zellen bzw. MCF-7 Zellen herunter reguliert. Daraus resultiert, dass das Maus *CerS1* die Synthese von C18:0 enthaltenem Ceramid katalysiert, *CerS2* zeigt eine C22:0 und C24:0 Acyl-CoA, *CerS3* exprimierende Zellen zeigen hauptsächlich eine C18:0 bis C24:0 Acyl-CoA abhängige Ceramidsynthase-Aktivität

(Mizutani et al., 2006). *CerS4* zeigt eine Substratspezifität für C18:0 und C20:0 Acyl-CoA oder C22:0 und C24:0 Acyl-CoA in Zellen (Riebeling et al., 2003; Mizutani et al., 2005; Mullen et al., 2010). Der Unterschied der Substratspezifität der Fettsäureacyl-CoA in *CerS4* exprimierenden Zellen lässt sich wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Bedingungen des Dihydroceramidsynthese Aktivitätstests zurückführen. *CerS5* und *CerS6* zeigen eine Substratspezifität für C14:0 und C16:0 Acyl-CoA (Mizutani et al., 2005) (Abb. 1.2).

1.2.3 Funktion von Ceramid

Diverse Stress Stimulatoren (z.B. UV-Licht, Hitzestress, ionisierende Strahlung) erhöhen die Ceramid-Menge in Zellen, wobei Ceramid als sekundärer Botenstoff in den Signaltransduktionswegen der Apoptose eine Rolle spielt (Bose et al., 1995; Jenkins et al., 2002; Rotolo et al., 2005; Trumann et al., 2005). Die Funktion als sekundärer Botenstoff könnte Ceramid durch Bindung an Proteine herbeiführen, indem es die Aktivität der Proteine reguliert. Beispiele für diese Proteine sind die Ceramid aktivierte Phosphatase, die Proteinkinase C ζ , die Phospholipase A und Cathepsin D (Dobrowsky und Hannun, 1993; Muller et al., 1995; Huwiler et al., 2001; Gulbins und Grassme, 2002). Neben der Funktion in der Apoptose ist Ceramid in der Differenzierung und Zellalterung involviert (Saddoughi et al., 2009).

Den unterschiedlichen Kettenlängen von Ceramiden könnten unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden, jedoch ist davon noch wenig bekannt.

C16:0 Ceramid ist ein potentieller Auslöser der Apoptose im Vergleich zu Ceramiden mit anderer Kettenlänge (Osawa et al., 2005). In Adenokarzinom Zellen nimmt die Apoptose zu, wenn diese zeit- und konzentrationsabhängig mit C16:0 Ceramid behandelt wurden (Renert et al., 2009). Ebenso kommt es in SW480 Darmkrebszellen, bei einer Herunterregulierung des *CerS6* Gens und somit des C16:0 Ceramids, zu einer Hemmung der TRAIL (Tumor Nekrose verwandter Faktor, das als Ligand an den TNF α Rezeptor binden kann und Apoptose einleitet) eingeleiteten Apoptose. In SW620 Zellen, die eine erniedrigte Transkriptmenge des *CerS6* Gens besitzen, kommt es bei Überexpression des *CerS6* Gens in Begleitung von TRAIL zur Apoptose (White-Gilbertson et al., 2009). Im Gegensatz dazu wurde bei der Herunterregulation des *CerS6* Gens sowie einer Abnahme des C16:0 Ceramids ER Stress eingeleitete Apoptose in Plattenepithelkarzinomzellen beobachtet, wobei das C16:0 Ceramid eine pro-apoptotische Funktion besitzt (Senkal et al., 2009).

Neben der pro-apoptotischen Funktion kann Ceramid auch einen Wachstumsstopp hervorrufen. Die *CerS2* Expression bewirkt einen Zellwachstumsstopp im hepatozellulären Karzinom (Pan et al., 2001). Zusätzlich wurde das *CerS2* Gen durch siRNA in SMS-KCNR

Neuroblastoma Zellen herunter reguliert, wobei es ebenfalls zu einem Zellwachstumsstopp, zur Einleitung von Autophagie und zu einer ER Stressantwort kommt (Mecicek et al., 2010). Ein weiteres Beispiel für einen Wachstumsstopp könnte die Überexpression des *CerS1* Gens und somit die Erhöhung des C18:0 Ceramids in den herunterregulierten C18:0 Ceramidhaltigen Plattenepithelkarzinomzellen sein (Koybasi et al., 2004).

1.3 Aufbau des *CerS2* Gens und Proteins

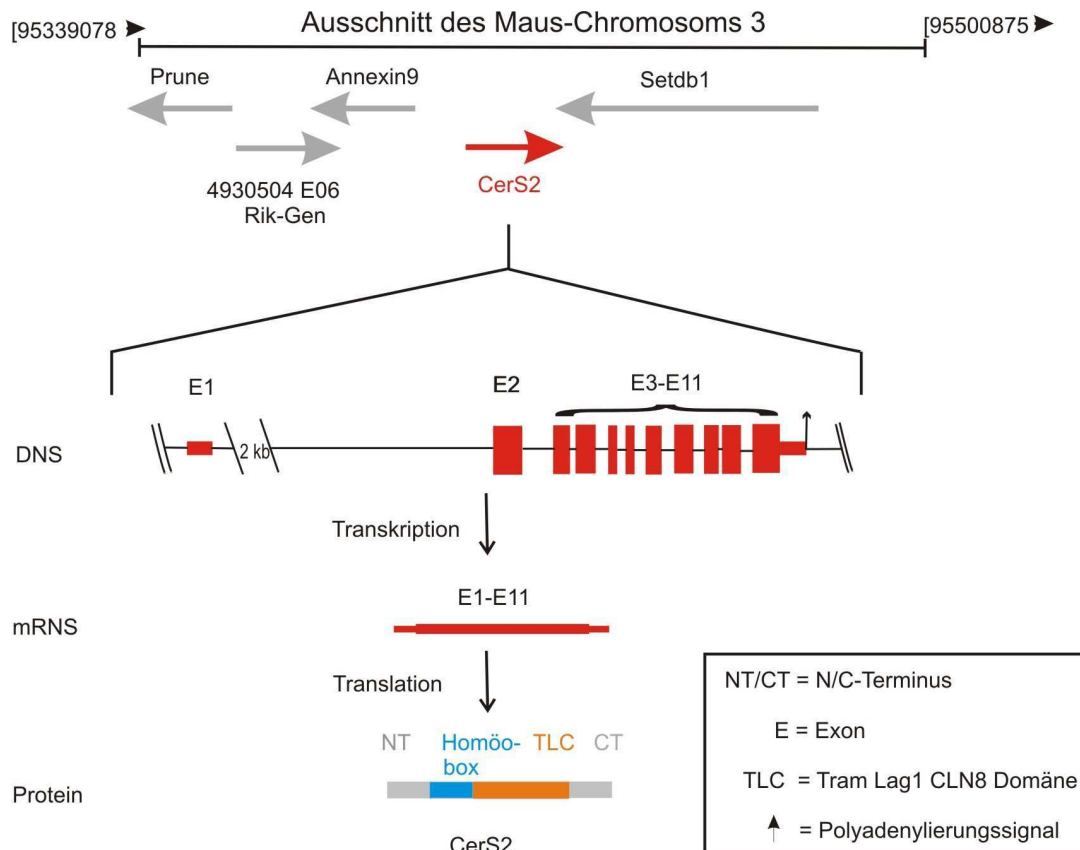


Abb. 1.3: Genomischer Aufbau, Transkription und Translation von *CerS2*

In der Maus wurde das *CerS2* Gen mittels Datenbank-Recherche auf dem Chromosom 3 im Chromosomenabschnitt 3F2 kartiert. Es wird flankiert auf dem Gegensinnstrang vom *Annexin A9*-Gen und dem *Setdb1* (SET domain, bifurcated)-Gen. Auf dem Sinnstrang stromabwärts von *CerS2* befindet sich das *4930504 E06 Rik*-Gen (NF-E2 inducible protein). Das *CerS2* Gen umfasst 8319 bp und enthält insgesamt elf Exons, wovon das erste Exon sowie ein Teil des zweiten Exons eine nicht-kodierende Region (5'UTR) enthalten. Exon2 bis Exon11 hingegen enthalten die kodierende Region von *CerS2*. Ebenfalls befindet sich auf Exon11 eine unkodierende Region von 740 bp (3'UTR), die mit einem Polyadenylierungssignal endet. Der kurze 5'UTR- und 3'UTR-Bereich sowie das häufige Auftreten von CpG Sequenzen und Alu Elementen vor und hinter dem *CerS2* Gen deuten

darauf hin, dass das *CerS2* Gen ein Haushaltsgen sein könnte (Laviad et al., 2008). Nach Transkription und Spleissen entsteht eine mRNA von 2048 bp. Das *CerS2* Protein hat eine Größe von 380 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 45 kDa. Es besitzt zwei konservierte Regionen, die Homöodomäne, die sich vom Aminosäurerest 71 bis 128 ausdehnt, und die LAG1-Domäne, die sich vom Aminosäurerest 153 bis 332 erstreckt (Futerman et al., 2005).

Ein zum Maus homologen *CerS2* Gen (*hCERS2*) kommt im humanen Genom auf Chromosom1 vor. Durch Transkription und Spleissen des *hCERS2s* entsteht ein 2,4 kb langes Transkript, das hauptsächlich in der menschlichen Niere und Leber nachzuweisen ist. Es wird schwach in der Lunge, Herz, Gehirn und Placenta exprimiert (Pan et al., 2001). Die Länge der mRNA kann durch alternatives Spleissen variiert werden, wobei Exon2 herausgespleisst wird. Exon1 wird somit direkt an Exon3 gespleisst, wodurch eine 2178 bp lange mRNA entsteht. Die Translation dieses 2,4 kb langen Transkripts wurde im *in-vitro*-Translationssystem und Baculo Virus Expressionssystem nachgewiesen. Durch die alternative Spleissform entsteht eine Isoform von *hCERS2*, die keine Homöodomäne besitzt und eine theoretische molekulare Masse von 23 kDa aufweist (Pewzner- Jung et al., 2006).

1.4 Aufbau des *CerS4* Gens und Proteins

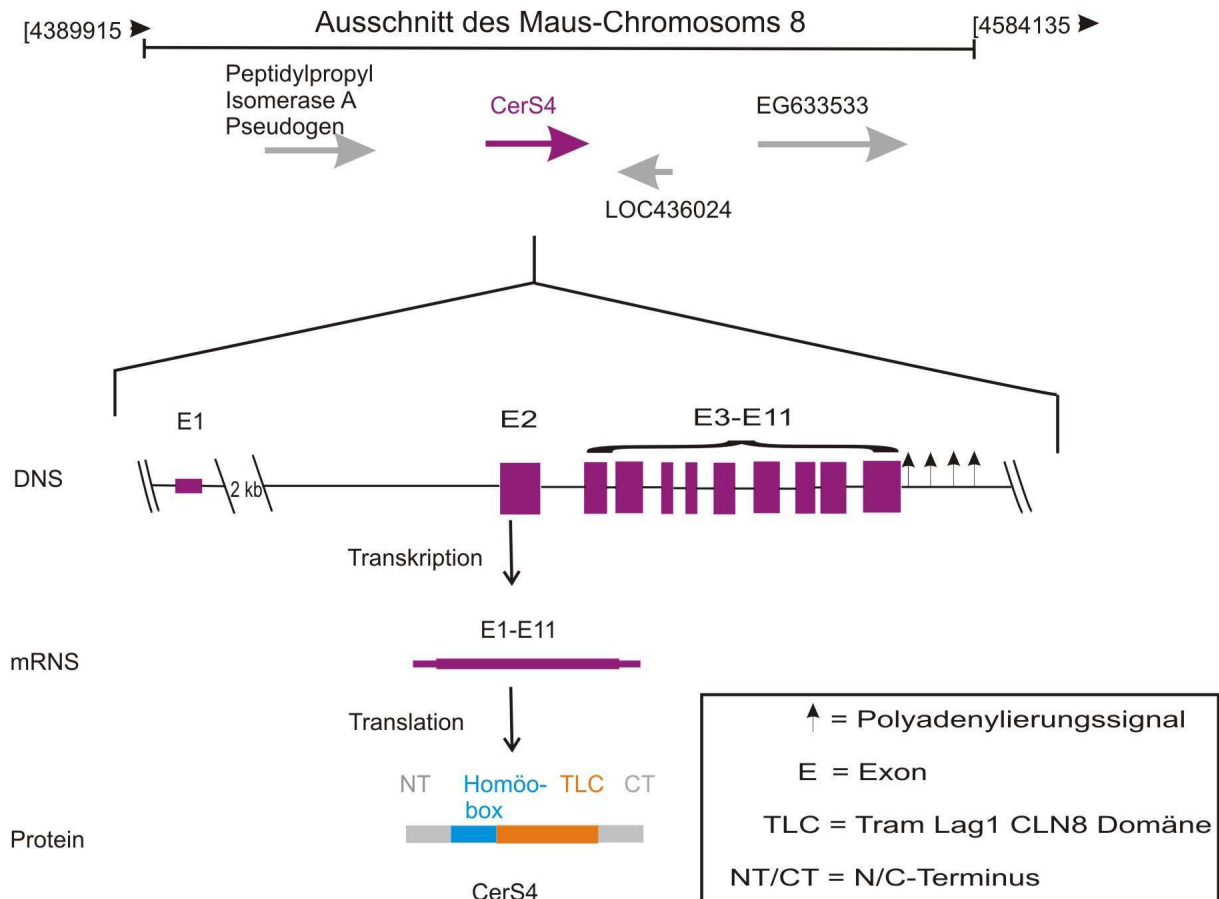


Abb 1.4: Genomischer Aufbau, Transkription und Translation von *CerS4*

In der Maus wurde das *CerS4* Gen durch Datenbank-Recherche auf dem Chromosom 8 im Chromosomenabschnitt 8 A1.2 kartiert. Es wird flankiert vom *Peptidylpropyl Isomerase A Pseudogen 8_36.1* und dem *EG633533* –Gen, die beide auf dem Sinnstrang angeordnet sind. Auf dem Gegensinnstrang stromabwärts von *CerS4* befindet sich ebenfalls ein Pseudogen, welches als *LOC436024* bezeichnet wird. *CerS4* ist ein 32254 bp langes Gen und enthält insgesamt elf Exons, wovon Exon1 eine nicht-kodierende Region (5'UTR) enthält. Die kodierende Region schließt Exon2 bis Exon11 ein. An die kodierende Region schließen sich vier Polyadenylierungssignale an. Je nach Verwendung des Polyadenylierungssignals entstehen durch die Transkription nach dem Spleissen mRNS von 1557 bp, 2081 bp und 32051 bp Länge. Alternatives Spleissen wurde für *CerS4* bislang nicht beschrieben. Das Protein *CerS4* hat eine Länge von 393 Aminosäuren und eine theoretische molekulare Masse von 39,3 kDa. Es besitzt zwei konservierte Regionen, die Homöodomäne, die sich vom Aminosäurerest 74 bis 132 ausdehnt, und die TLC-Domäne, die sich vom Aminosäurerest 151 bis 341 erstreckt (Futerman et al., 2005). Über die Expression von den *CerS4* Proteinen sowie deren Funktion wurde bislang nichts veröffentlicht. Die *CerS4* Expression wird in Mäusen mit einer Presenilin1 M146V Mutation (PS1M146V), die als Modell für Alzheimer Erkrankungen stehen, hochreguliert. Eine Zunahme von C20:0 und C24:0 Ceramid konnte jedoch schon vor den ersten Symptomen der Erkrankung festgestellt werden (Cutler et al., 2004; Wang et al., 2008).

1.5 Nervensystem im Säugetier

Das Nervensystem ist für die Aufnahme und Weiterleitung von Reizen, für die Erregungsverarbeitung, für die Aktivierung von Muskeln sowie für die Koordination und Aufrechterhaltung von Organfunktionen zuständig.

Es gliedert sich bei Säugetieren in das zentrale Nervensystem, das aus dem Gehirn und dem Rückenmark besteht und in das periphere Nervensystem. Das zentrale Nervensystem wird aus grauer und weißer Substanz aufgebaut. In der grauen Substanz sammeln sich die Perikaryen der Neurone an. Die Fortsätze bilden zusammen mit dem Gliagewebe die weiße Substanz, in der keine Zellkörper zu finden sind.

1.5.1 Zelltypen des Nervensystems

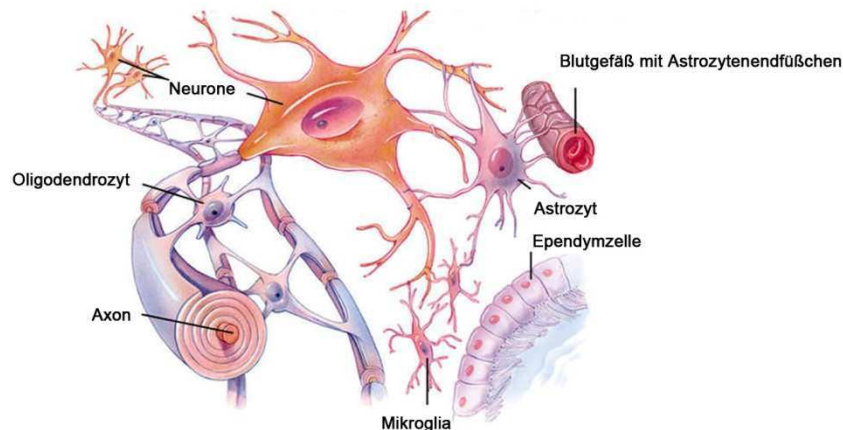


Abb.1.5: Zelltypen des Nervensystems (Neuron, Ependymzelle, Oligodendrozyt, Astrozyt und Mikroglia). Modifiziert nach www.faculty.southwest.tn.edu/rburkett/A&P1_nervous_system_lab.htm.

Das zentrale Nervensystem besteht aus fünf Zelltypen: Neurone, Ependymzellen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia. Die letzten drei Zelltypen gehören zur Gruppe der Gliazellen (Abb. 1.3).

Neurone bestehen aus einem Zellkörper, dem Perikaryon, und einem oder mehreren Fortsätzen, die unterteilt werden in ein langes Axon und in Dendriten. Die Neurone können Information in Form von elektrischen Signalen (Aktionspotentialen) über die Dendriten aufnehmen und über das Axon eines Neurons Signale weiterleiten. Ein Aktionspotential bewirkt eine Veränderung im Membranpotential (Depolarisierung) durch spannungskontrollierte Kanäle. Die Aufnahme bzw. Übertragung der Aktionspotentiale erfolgt über chemische und elektrische Synapsen.

Ependymzellen sind hochprismatische Epithelzellen mit Mikrovilli und Kinozilien, die die inneren Liquorräume (Ventrikel) als Einzelschicht auskleiden. Es deutet darauf hin, dass sie eine Sekretions- oder Resorptionsfunktion besitzen (Del Bigio, 2010).

Oligodendrozyten besitzen ein kleines Soma mit wenigen Fortsätzen, die nur kurz und kaum verzweigt sind. Die Hauptfunktion der Oligodendrozyten ist die Myelinisierung. Die Oligodendrozyten umhüllen die Axone der Neurone mit ihren Fortsätzen. Zusätzlich fungieren sie als Neuroprotektoren, ohne die es zur Degeneration der Axone kommt (Yin et al., 2007). Es gibt zwei Arten von Oligodendrozyten: Oligodendrozyten-Vorläufer und reife Oligodendrozyten, letztere bilden 90 % der gesamten Oligodendrozyten im Gehirn.

1.5.2 Myelin

1.5.2.1 Struktureller Aufbau

Myelin besteht aus Lipid-angereicherten Membranen, die von Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem und Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem sezerniert werden. Myelin gilt als Insulator und erleichtert die dreidimensionale Kommunikation zwischen den Neuronen, den myelinisierenden Zellen und der Umgebung (Nave und Trapp, 2008). Myelinisierte Axone haben zwei bestimmte strukturelle und funktionelle Domänen: Internode und Node. Die Internode, die auch als Myelinscheide bezeichnet wird, ist eine mehrschichtige Hülle aus Gliazellmembranen, die die axonalen Fortsätze einer Nervenzelle umgeben. Diese kann die Fortleitung der neuronalen Impulse aufgrund ihrer elektrischen Isolierung beschleunigen. In den Internoden befinden sich Schmidt-Lantermann Einkerbungen, die Kanäle im dicht-gepackten Myelin darstellen. Hauptsächlich befinden sich diese im peripheren Nervensystem; im zentralen Nervensystem sind sie kaum vorhanden (Baumann und Phamdi, 2001).

Die Ranvier-Schnürringe (Node) sind kleine Lücken in der Myelinscheide, die im zentralen Nervensystem mit Astrozyten in Kontakt stehen. Die Ranvier-Schnürringe sind durch eine hohe Dichte von spannungskontrollierten Natrium- sowie Kaliumkanälen charakterisiert. Die spannungskontrollierten Natriumkanäle sind die für die Erzeugung von Aktionspotentialen während der Weiterleitung zuständig (Waxmann et al., 1993), wohingegen die spannungskontrollierten Kaliumkanäle für eine schnellere Wiederherstellung des Membranpotentials notwendig sind (Devaux et al., 2003).

1.5.2.2 Biochemische Zusammensetzung des Myelins

Der Funktion des Insulators hat das Myelin seine biochemische Zusammensetzung zu verdanken. Die biochemische Zusammensetzung des Myelins besteht auf das Trockengewicht bezogen zu 70 % aus Lipiden und zu 30 % aus Proteinen.

Die Myelinproteine sind eine spezifische Komponente von Myelin und Oligodendrozyten. Die Hauptmyelin Proteine sind das basische Myelinprotein (MBP) und das Proteolipid Protein (PLP), das insgesamt 80 % der gesamten Proteine darstellt. Weitere Beispiele für Myelinproteine sind Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin-Oligodendrozyten spezifisches Glykoprotein (MOG), 2'-3'-zyklische-Nukleotid-Phosphatase (CNP) und Oligodendrozyten-Myelin Glykoprotein (OMgp) (Bauman und Pham-Dinh, 2001).

Das basische Myelinprotein (MBP) ist ein peripheres Protein, das eine Komponente der kompakten Schicht des Myelins (wie auch das Protein 0, Proteolipid Protein) darstellt. In shiverer Mäusen, d.h. MBP defizienten Mäusen, kommt es zum Verlust von kompaktem Myelin im zentralen Nervensystem, jedoch gibt es keine Anzeichen für eine Oligodendrozyten Degeneration (Rosenbluth et al., 1980; Inoue et al., 1981; Shine et al., 1992). Im peripheren Nervensystem kommt es ebenfalls zu morphologischen Anomalitäten. Die Myelin-Schichtdicke ist reduziert, es kommt es zu einem aberranten Schwann Zell-Axon Kontakt sowie einer Verdopplung der Schmidt-Lantermann Einkerbungen (Gould et al., 1995).

Aufgrund dieser Resultate kann MBP zur Aufrechterhaltung der Kompaktierung von Myelinscheiden fungieren (Martini et al., 1995).

Das basische Myelinprotein besitzt vier Isoformen, die 21,5 kDa, 18,5 kDa, 17,2 kDa und 14 kDa groß sind. Sie entstehen durch alternatives Spleissen eines einzigen Transkripts (de Ferra et al., 1985). Die Expression dieser Isoformen wird entwicklungsabhängig gesteuert, und die Proteine besitzen eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle, womit jede Isoform eine unterschiedliche Funktion erfüllen könnte (Boggs, 2006). Das 18,5 kDa MBP kann an Phosphatidylinositol-(4,5)-bis-phosphat (PI(4,5)P₂) durch nichtspezifische elektrostatische Interaktionen binden. Diese Interaktion ist teilweise Cholesterol abhängig (Musse et al., 2008).

	Myelin- membran	Plasmamembran der Leberzelle
Lipidinhalt	71%	34%
Lipidklassen		
Cholesterol	26%	17%
Phosphatidylethanolamin	16%	7%
Phosphatidylserin	6%	4%
Phosphatidylcholin	12%	24%
Phosphatidylinositol	1%	4%
Sphingomyelin	3%	20%
Glykosphingolipide	31%	7%
Andere Lipide	5%	17%

Tab. 1.1: Lipidzusammensetzung der Myelinmembranen von 60 Tage alten Ratten und der Plasmamembranen von Leberzellen in adulten Ratten. Die Kategorie „andere Lipide“ könnte die Kontamination von anderen Lipidmembranen anzeigen (Norton und Poduslo, 1973 a; Dod und Gray, 1968).

In Tabelle 1.1 wird die Lipidzusammensetzung der Myelin Membranen im Gegensatz zu der Lipidzusammensetzung der Plasmamembranen der Leberzellen dargestellt. Cholesterol und Glykosphingolipide sind mit 26 % und 31 % am stärksten im Myelin vertreten (Norton und

Poduslo, 1973 a). Cholesterol und Glykosphingolipide können die Membranfluidität regulieren und dementsprechend die Membranpermeabilität variieren (Saher et al., 2010). Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) defiziente Mäuse, die eine Defizienz in der UDP-Galaktose:Ceramid-Galaktosyltransferase besitzen, haben eine erhöhte Myelin Membranfluidität und erhöhen damit die Ionenpermeabilität, die die saltatorische Weiterleitung zerstören (Bosia et al., 1998). Auf der Innenseite der Membran wird die Membranfluidität durch die gesättigten und die ungesättigten langkettigen Phospholipide reguliert. Gesättigte Phospholipide erniedrigen die Membranfluidität (Chrast et al., 2011). Die spezifische Lipidzusammensetzung des Myelins ermöglicht die richtigen Packeigenschaften der Myelin Membranen. Ein Wechsel der Lipidzusammensetzung verändert die Lipid-Protein Interaktionen und somit auch die Packeigenschaften der Myelin Membran (Lee, 2003). In konditionalen Spalt-Aktivierungsproteinen von Sterol regulatorischen Elementbindende Proteinen (SCAP) mutierten Mäusen wird der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren erhöht, wodurch Defekte in der Packung der Myelin Membranen auftreten (Verheijen et al., 2009).

1.5.2.3 Entwicklung des Myelins

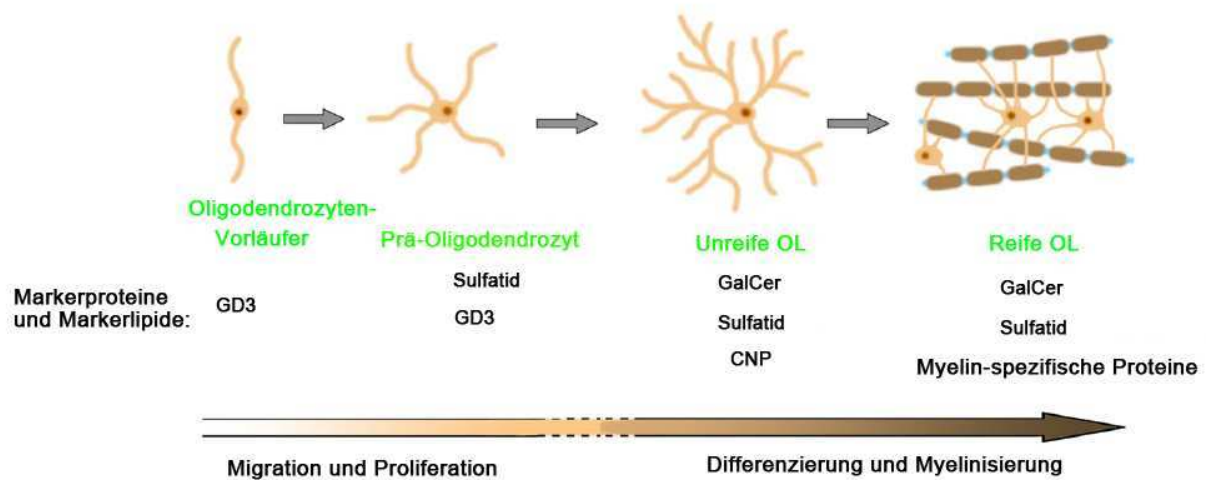


Abb.1.6: Schematische Darstellung der Myelinentwicklung aus Oligodendrozyten-Vorläufern.

Während der Myelinentwicklung verändern sich die Markermoleküle sowie die Oligodendrozytenmorphologie. OL = Oligodendrozyten; CNP = 2'-3'-zyklische-Nukleotid-Phosphatase, GD3 = 2,8 Sialinsäure-2,3 Sialinsäure-Laktosylceramid, GalCer = Galaktosylceramid (modifiziert nach Jackman et al., 2009).

Während der Embryonalentwicklung migrieren die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aus der ventrikulären Zone aufgrund eines Gradienten von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. Sonic Hedgehog) in die Regionen der weissen Substanz (Small et al., 1987) (Abb. 1.4). Oligodendrozyten-Vorläufer sind bipolare und proliferierende Zellen, die insbesondere GD3 als Marker auf der Oberfläche besitzen. In der weissen Substanz angekommen, kommt es zur Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläufer zu reifen Oligodendrozyten. Während der Differenzierung durchlaufen die Zellen mehrere Phasen, die durch die Expression spezifischer Marker und eine bestimmte Morphologie gekennzeichnet sind (Pfeiffer et al., 1993). Während der ersten Differenzierungsphase reifen die Oligodendrozyten-Vorläufer zu Prä-Oligodendrozyten. Diese besitzen mehrere Ausläufer und synthetisieren Sulfatid als Markermolekül. Sulfatid dient dabei als negativer Regulator der Oligodendrozyten Differenzierung (Bansal et al., 1999). Anschließend differenzieren sie in unreife Oligodendrozyten, die neben Sulfatid auch Galaktosylceramid bilden (Ranscht et al., 1982). Die letzte Differenzierungsphase ist die Reifung von unreifen zu reifen Oligodendrozyten, die unterteilt werden können in nicht-myelinisierende und myelinisierende Oligodendrozyten. Letztere benötigen den Kontakt zum Axon. Die reifen Oligodendrozyten besitzen neben Sulfatid und Galaktosylceramid die spezifischen Myelinproteine wie das Oligodendrozyten spezifische Glykoprotein (MOG), die 2'-3'-zyklische-Nukleotid-Phosphatase usw. (Pfeiffer et al., 1993).

1.6 Leber

1.6.1 Aufbau der Leber

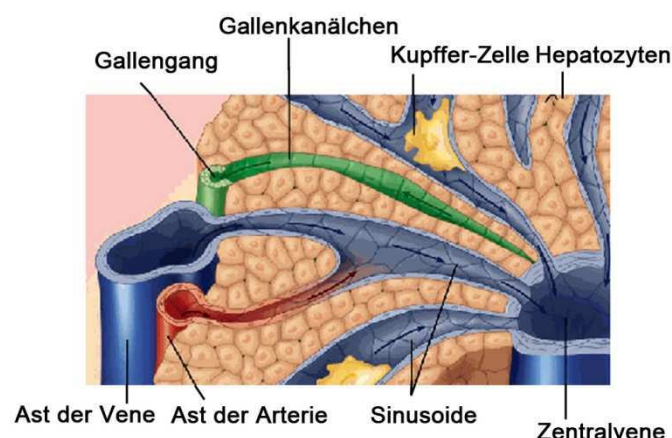


Abb.1.7: Schematische Darstellung der Anatomie eines Periportalfeldes und eines Abschnittes eines Leberläppchens. Das Periportalfeld besteht aus einem Ast der Pfortader, einem Ast der Arterie, einem Gallengang und einem Lymphgefäß (das Lymphgefäß ist nicht gezeigt) (modifiziert nach www.daviddarling.info/encylopedia/L/Liver).

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan. Zu ihrer Funktion zählen Gallenbildung, Entgiftung, Ausscheidung von endo- und exogenen toxischen Substanzen, Bildung von Proteinen und Lipoproteinen des Blutplasmas, Speicherung und Freisetzung von Glukose. Die Leber besteht aus kleinen Leberläppchen (Zentralvenenläppchen), die aus Leberepithelzellen, vaskulären Elementen, Bindegewebe und Anteilen des Gallengangsystems bestehen. Zwischen drei Läppchen befindet sich ein Bindegewebsraum, das sogenannten Periportalfeld, mit einem Ast der Pfortader, einem Ast der Arterie, einem Gallengang und einem Lymphgefäß. Vene, Arterie und Gallengang bilden das Glisson-Trias. Von den Seitenästen der Blutgefäße gehen zahlreiche terminale Zweige ab und treten in ein Läppchen ein, das radiär angeordnete Platten aus Leberepithelzellen (Hepatozyten) enthält. Die Endverzweigungen der Pfortader und Arterie verschmelzen schon in der Peripherie des Läppchens und bilden weitlumige Kapillaren (Sinusoide) zur Zentralvene, wodurch jeder Hepatozyt einerseits an die Sinusoide grenzt, andererseits an die Gallenkanälchen (Abb. 1.5).

Zwischen dem Endothel der Sinusoide und den Hepatozyten befindet sich ein schmaler Bindegewebsraum, der Disse-Raum, der dem Stoffaustausch zwischen Blut und Leberzellen dient. Dem Endothel der Sinusoide liegen luminal die Kupffer-Zellen an, Makrophagen, die partikuläre Substanzen aus dem Blut aufnehmen und abbauen.

1.6.2 Hepatokarzinogenese

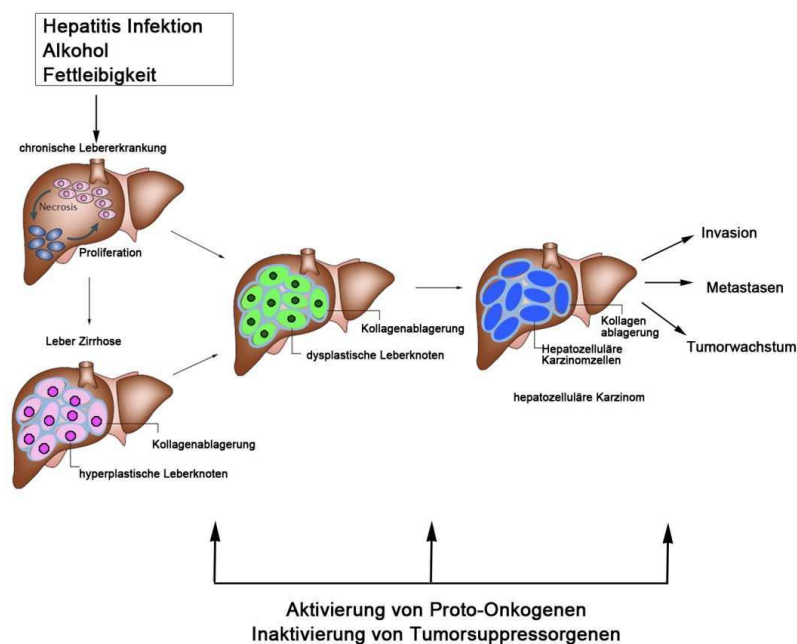


Abb. 1.8: Entwicklung eines Lebertumors aufgrund von Faktoren und Mutationen in Tumorsuppressorgenen und zellulären Onkogenen, die Leberschäden verursachen (modifiziert nach Farazi und DePinho, 2006; Whittaker et al., 2010).

Die Hepatozelluläre Karzinom Pathogenese (HCC) besteht aus einem vielstufigen Prozess, der mit einem Wechsel von genetischen und epigenetischen Anhäufungen verbunden ist, die während des Beginns sowie bei Fortschreiten der Krankheit vorkommen (Wong und Ng, 2007) (Abb. 1.6). Leberschädigungen leiten die Veränderungen von reifen Hepatozyten oder Stammzellen ein. Dies führt zur Nekrose, gefolgt von Zellproliferation (Leberregeneration). Die Leberregeneration wird von Entzündungsprozessen begleitet. Kontinuierliche Zyklen von Zerstörungs- und Regenerations-Prozessen führen zur chronischen Lebererkrankung.

Zirrhosen sind durch die Entstehung von hyperplastischen, knotenförmigen Arealen regenerierender Leberepithelzellen charakterisiert, die mit Kollagenablagerungen und Narbengewebe umgeben werden (Thorgeirsson und Grisham, 2002). Die Kollagenablagerungen sowie das Narbengewebe entstehen durch die Sternzellen in den Disse-Räumen, die sich in Myofibroblasten umgewandelt haben (Knittel et al., 2007; Magness et al., 2004). Die dysplastischen Leberknoten können sich aus den hyperplastischen, knotenförmigen Arealen der Zirrhose oder/und aus der chronischen Lebererkrankung, oder aus beiden, entwickeln. Die Hepatozyten der dysplastischen Leberknoten sind durch ein klares Zytoplasma, das durch Glykogen- und Lipid-Anhäufung zustande kommt, eine erhöhte Anzahl an Kernen und einer Verdickung der Hepatozytenplatten, gekennzeichnet (Sornmayura et al., 2007). Die dysplastischen Leberknoten können sich zum hepatozellulären Krebs durch Gefäßinvasionen, trabekuläre Strukturen und gelegentlich die Ausbildung von Metastasen weiterentwickeln (Whittaker et al., 2010).

Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von zellulären Onkogenen tragen zur Tumorgenese bei. Die für die Leberschädigungen zugrunde liegenden Mechanismen wie Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen haben weitreichende Auswirkungen auf wichtige Signaltransduktionswege. Diese Signaltransduktionswege können beeinträchtigt sein, wie der vaskuläre Endothel-, der Blutplättchen-, der epidermale-, der insulin-ähnliche-, der Hepatozyten-Wachstumsfaktor, der Wingless (WNT), die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP) und der Phosphatidylinositol-3-Kinase Reaktionsweg (Schirmacher et al., 1992; Shimamura et al., 2000; Hu et al., 2003; Lund et al., 2004; Watanabe et al., 2005; Leicht et al., 2007; Schmidt et al., 2008; Whittaker et al., 2010)

1.6.3 Ursachen des hepatozellulären Karzinoms

Faktoren, die eine Leberschädigung hervorrufen, sind genetische Faktoren (z.B. Hämochromatose), Toxine/Umweltfaktoren (übermäßiger, chronischer Alkoholkonsum und Aflatoxine), Infektionen von Hepatitis-Viren und metabolische Einflüsse wie Fettleibigkeit

oder Diabetes Typ II (nicht alkoholische Steatohepatitis) (Anzola et al., 2004; Henry et al., 1993; Van Rensburg et al., 1985; Wittaker et al., 2010, Wallace et al., 2008). In dieser Arbeit wird nur die nicht-alkoholische Lebererkrankung näher erläutert.

1.6.3.1 Nicht-alkoholische Lebererkrankung

Nicht-alkoholische Lebererkrankungen (NAFLD) werden durch Fettablagerungen in der Leber (Fettleber) charakterisiert, hauptsächlich in Form von Triacylglycerin und Fettsäure Metaboliten (Fettsäureacyl-CoA, Diacylglycerin, Ceramid und Glykosphingolipide), die durch fetthaltige Nahrung und Unsportlichkeit ausgelöst werden (Mendez-Sanchez et al., 2007). Die Entwicklung von NAFLD wird mit der Insulin Resistenz der Leber verbunden, jedoch ist der Auslöser der Insulin Resistenz noch nicht geklärt (Nagle et al., 2008). Die Anhäufungen der freien Fettsäuren können durch vier verschiedene metabolische Störungen hervorgerufen werden: Die erste Störung kann durch eine erhöhte Lieferung an Fettsäuren (Lipotoxizität) z.B. das von den Fettzellen hydrolysierte Triacylglycerin, an die Hepatozyten entstehen. Die Fettsäure Synthase kann die Fettsäuren in der Leber um zwei Kohlenstoffatome verlängern, die durch die langkettige Acyl-CoA Synthetase aktiviert, durch die Elongase (ELOV6) verlängert und durch die Desaturase (SCD) desaturiert wird. Die verlängerten, desaturierten, aktivierten Fettsäuren können als Substrate für die Ceramidsynthesen verwendet werden. Eine andere Möglichkeit der Verwendung der freien Fettsäuren ist der Einsatz zur Synthese von Phospholipiden oder Cholesterolestern (Trauner et al., 2010).

Die zweite Störung erhöht die Triacylglycerin Synthese durch die *de novo* lipogenetische Synthese. Diese stammt aus der erhöhten Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren: das Sterol regulierende Element bindende Protein 1c (SREBP1c), das Kohlenhydrat-Antwort Element bindende Protein (ChREBP) und den Peroxisom Proliferator aktivierenden Rezeptor (PPAR γ) (George et al., 2008; Donnelly et al., 2005; Tamura et al., 2005). Der dritte und vierte Reaktionsweg ist die Erhöhung der Fettsäureoxidation oder die Synthese oder Sekretion von low density Lipoprotein (VLDL) (Bertolani et al., 2008; Sanyal et al., 2001; Gibbons et al., 2004; Trauner et al., 2010).

1.7 Niere

1.7.1 Aufbau der Niere

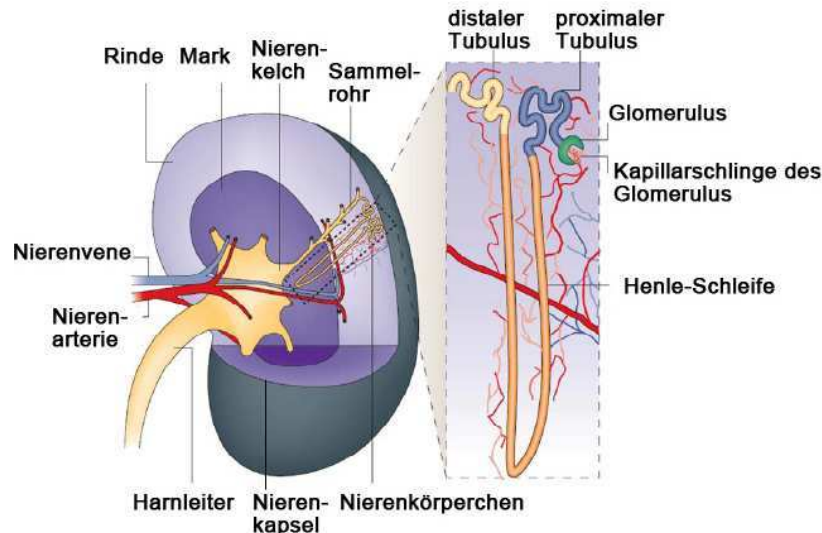


Abb. 1.9: Schematischer Aufbau einer multipapillären Niere. Die Niere besteht aus einem äußeren Kortex und einer inneren Region, die sich in Mark und Nierenkelch einteilt. Die Nierenkörperchen sind die funktionelle Einheit der Niere und enthalten die Glomeruli, die für die Ultrafiltration des Bluts zuständig sind (Schedl, 2007).

Die wichtigsten Funktionen der Nieren sind die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen, die Kontrolle des Elektrolyt- und Wasserhaushalts sowie des Säure-Basen-Gleichgewichts. Ferner ist sie an der Bildung von Hormonen und Gewebefaktoren (Angiotensin II, Prostaglandine) beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks.

Die Niere besteht aus der Nierenrinde (Cortex renalis) und dem Nierenkelch (Medulla renalis) und ist von einer Nierenkapsel (Capsula fibrosa) umgeben (Abb. 1.7). Das Nierenmark hat die Form einer Pyramide, die papillenförmig ausgezogen ist und damit in das Nierenbecken hineinragt, von dem sie allseitig umschlossen wird (einpapilläre Niere).

In der Nierenrinde befinden sich die Nierenkörperchen, die aus dem Glomerulus (Blutkapillarknäuel) und der BOWMAN-Kapsel bestehen, sowie Teilabschnitte der gewundenen Tubuli (proximaler und distaler Tubuli). Im Nierenmark sind die Tubuli (proximaler-, intermediärer- und distaler Tubulus) sowie die Sammelrohre enthalten.

Die Nierenkörperchen filtern einen konstanten Anteil des Blutplasmas als Ultrafiltrat, das in den proximalen Tubulus über den intermediären und distalen Tubulus geleitet wird, wo es zur Rückresorption und Sekretion des Filtrats kommt und anschließend über die Sammelrohre ausgeschieden wird, die für die Feinregulation der Ausscheidung des Wassers verantwortlich sind.

1.7.2 Funktion von Ceramiden/Glykosphingolipiden in Nierenerkrankungen

Die Funktion der Sphingolipide, insbesondere von Ceramid, sowie deren Rolle in Nierenerkrankungen, wie z.B. die entzündliche Erkrankung der Glomeruli (verbunden mit Proteinurie, Ödemen usw.) und der Tubuli (Nekrosen der Tubuli, interstitiellen Ödemen usw.), ist weitgehend ungeklärt. Nierenerkrankungen können durch oxidativen Stress und Ischämie/Reperfusion bzw. Hypoxia/Reoxygenation hervorgerufen werden (Hao und Breyer, 2007).

Bei der Hypoxia/Reoxygenation wird Ceramid durch CerS in Nierenepithelzellen (NRK-52E) vermehrt gebildet, wodurch ein Endonuklease vermittelter Zelltod der tubulären Epithelzellen ausgelöst wird (Banahian et al., 2005).

Zusätzlich konnte bei einer Ischämie/Reperfusion in CD1 Mäusen ein Anstieg von Ceramid bestimmt werden, wobei insbesondere die gesättigten zu den ungesättigten langkettigen Ceramiden verschoben worden sind (Kalshorn und Zager, 1999).

Eine weitere Nierenerkrankung ist die zystische Nierenerkrankung, die durch Zysten im Tubulus und Sammelrohrsystem der Niere entstehen (Wilson, 2002). Ein Mausmodell für die zystische Nierenerkrankung ist durch eine spontane Mutation im Cystin Gen entstanden. Diese Mäuse zeigen eine Erhöhung von Glukosylceramid, Laktosylceramid und GM3 sowie eine Abnahme von Ceramid und Sulfatid (Deshniukh et al., 1994). Erhöhtes Glukosylceramid in polyzystischen Nieren fördert die Proliferation und die Apoptose. Ein Inhibitor, Genz 123346, hemmt die Glukosylceramid Synthese sowie das Fortschreiten der mehrfachen Zystenbildung (Takiar und Captan; 2010; Natoli et al., 2010).

1.8 Transgene Mäuse als Modellorganismen

Gezielt genetisch veränderte Mäuse, die auch als transgene Mäuse bezeichnet werden, werden zur Funktionsanalyse von Genen und zur Erforschung von Erbkrankheiten herangezogen (Bradley et al., 1998). Die Maus erweist sich als besonders geeigneter Modellorganismus, da die Embryonalentwicklung, Anatomie, Physiologie und das Verhalten von Mensch und Maus hochkonserviert sind. Auch haben 99 % des menschlichen Genoms direkte Sequenzidentitäten in der Maus (Seisenberger et al., 2006).

1.8.1 Erzeugung transgener Mäuse

Die Hauptmethoden zur Herstellung transgener Mäuse ist die Erzeugung von genetisch veränderten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit anschließender Blastozysteninjektion. Bei dieser Methode werden manipulierte ES-Zellen in das Blastozoele 3,5 Tage alter

Mausembryonen injiziert und diese Embryonen anschließend in scheinchwangere Empfängertiere übertragen. Die Blastozysten werden von den Empfängertieren ausgetragen. Bei den Nachkommen handelt es sich um Chimären, die aus Wildtyp und manipulierten ES-Zellen bestehen. Diese Chimären werden bei Keimbahntransmission der transgenen Zellen zur Erzeugung von entsprechenden Mauslinien verwendet. Diese Methode ermöglicht die gezielte Deletion eines Gens, weshalb sie zur Erzeugung von Knockout-Mäusen benutzt wird. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten: Gene targeting und „Gene Trap“.

1.8.1.1 Gene targeting

Als Gene targeting wird eine zielgerichtete Veränderung eines endogenen Gens mittels homologer Rekombination bezeichnet, die in den ES-Zellen stattfindet (Nagy et al., 2003). Für diese gezielte Veränderung wird ein Austauschvektor benötigt, der zu dem nativen Genlocus zwei homologe Bereiche besitzt, welche ein entsprechendes Mutationskonstrukt bzw. KO-Konstrukt flankieren. Häufig wird neben einer Selektionskassette (wie z.B. das Neomycinresistenzgen) ein Reportergen in die Austauschvektoren eingefügt, um den Expressionsort des ausgeschalteten Gens festzustellen. Durch die Rekombination (doppeltes Überkreuzen, engl.: crossing over) der homologen Bereiche erfolgt die Insertion der veränderten Sequenzen ins Genom. Die Häufigkeit dieses Vorgangs ist sehr gering und schwankt zwischen 10^{-6} und 10^{-7} . Deshalb schließt sich eine Selektion der rekombinierten ES-Zellen mit einem entsprechenden Antibiotikum (Neomycin) und anschließender Expansion der rekombinierten ES-Zellen an. Durch PCR und Southern-Blot Analysen werden die ES-Klone analysiert. Für das gezielte Ausschalten durch homologe Rekombination sollte das Gen sowie seine Struktur am besten schon bekannt sein, damit der Austauschvektor entsprechend konzipiert werden kann. Die Selektionskassette steht unter der Kontrolle eines starken Promotors und kann eine verstärkte Expression des Reportergens hervorrufen. Aus diesem Grund wird das Flp-/frt-System aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Es besteht aus 2 Komponenten: Flp-Rekombinase und einer 34 bp langen frt-Sequenz, welche die gewünschte Sequenz flankieren. Die Erkennungssequenz frt besteht aus zwei 13 bp langen invertierten Sequenzwiederholungen, welche jeweils eine 8 bp Kernsequenz umgeben. Diese Kernsequenzen bestimmen die Orientierung der Erkennungssequenzen und sind der Ort der Rekombination, während die invertierten Sequenzwiederholungen die Bindungsstellen der Rekombinase darstellen. Die Flp-Rekombinase agiert als Dimer, welche die frt-Stellen erkennen, binden und die resultierende, ortsspezifische Rekombination durchführen. Dabei wird der durch die Erkennungssequenz flankierte Bereich als zirkuläre DNS-Sequenz aus dem genomischen DNS-Strang ausgeschnitten, wobei auf dem verbleibenden DNS-Strang eine rekombinante

Erkennungssequenz zurückbleibt. Diese Deletion der Zielsequenz kommt nur zustande, wenn die beiden Erkennungssequenzen in gleicher Orientierung positioniert sind (Lewandoski, 2001).

1.8.1.2 „Gene Trap“

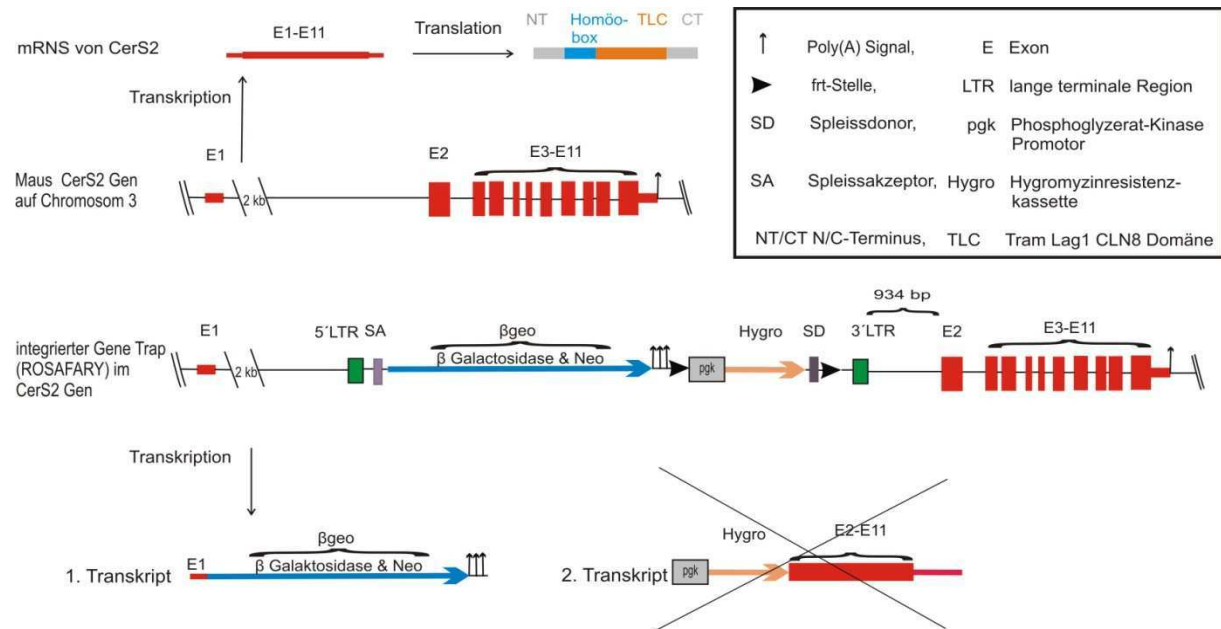


Abb. 1.10: Schema des einen Allels der kommerziellen CerS2 „Gene Trap“ ES-Zellen

„Gene Trapping“ basiert auf einer willkürlichen Insertion eines retroviralen Vektors in ein Gen, das zur Ausschaltung von Proteinen führen kann.

Zur Erzeugung einer *CerS2* transgenen Mauslinie wurde ein kommerzieller ES-Zellklon verwendet, der in Intron1, 934 bp vor dem Startcodon in Exon2 des *CerS2* Gens, eine „Gene Trap“ Sequenz (Rosafary) insertiert hat (Abb 1.8). Die „Gene Trap“ Sequenz besteht aus einer Spleissakzeptor-Sequenz, der Sequenz des Fusionsproteins β geo sowie einem Polyadenylierungssignal. An das Polyadenylierungssignal der Intron Trap Sequenz schließt eine Hygromycinresistenzkassette (PGK mit Hygromycinresistenzgen) an, die von 2 frt-Stellen flankiert wird. Es folgt eine Spleissdonor-Sequenz. Aus der retroviralen Infektion der ES-Zellen stammen die beiden LTRs (lange terminale Regionen), welche die Rosafary Sequenz flankieren.

Durch die Insertion der Rosafary Sequenz kommt es in den ES-Zellen zu einer heterozygoten *CerS2* Transkription. Neben dem Wildtyptranskript sollten zwei Fusionstranskripte des transgenen Locus (β geo und Hygro) gebildet werden. Durch Northern-Blot Analysen konnte jedoch nur die Anwesenheit des *CerS2*- Wildtyptranskriptes sowie des ersten Fusionstranskriptes β geo gezeigt werden. Das Fusionstranskript besteht aus Exon1 des *CerS2* Gens und der Sequenz des Fusionsproteins β geo. Weder in Northern-

Blot Analysen noch durch RT-PCR Analysen konnte die mRNS des Fusionsproteins Hygro (Hygromylin und Exon2-Exon11) nachgewiesen werden (Diplomarbeit Imgrund, 2007).

1.9 Zielsetzung

Die Familie der Ceramidsynthasen besteht bei der Maus aus 6 Mitgliedern, CerS1-CerS6, die ein unterschiedliches Transkriptionsmuster im Gewebe aufweisen sowie eine unterschiedliche Fettsäureacyl-CoA Spezifität besitzen.

Zur Analyse der Funktion des *CerS2*- und *CerS4* Gens in der Maus sollten transgene Mäuse mit einer Deletion im *CerS2* Gen charakterisiert sowie die Erzeugung von transgenen Mäusen mit einer Deletion im *CerS4* Gen durchgeführt werden.

Die erzeugten transgenen Mäuse mit einer Deletion im *CerS2* Gen wurden mit Hilfe eines kommerziellen „Gene Trap“ ES-Zellklons erzeugt (Diplomarbeit Imgrund, 2007). Das Vorhandensein des *CerS2* Transkripts in unterschiedlichen Organen konnte bislang nur durch Northern-Blot Hybridisierungen (Mizutani et al., 2005), Real-Time PCRs (Lavaid et al., 2007) und *in-situ* Experimenten im Gehirn (Becker et al., 2007) nachgewiesen werden. Durch das β -Galaktosidase Reporter gen, das sich in der Sequenz des Fusionsproteins β geo befindet und Teil des „Gene Traps“ darstellt, sollte die Expression des β -Galaktosidase Proteins, das unter der Kontrolle des *CerS2* Promotors exprimiert wird, in unterschiedlichen Organen überprüft werden. Die Deletion des *CerS2* Gens sollte Aufschluss über mögliche Phänotypen oder Anomalien in den Gehirnen, Lebern und Nieren adulter Mäuse geben, da in den beiden letzteren das *CerS2* Transkript stark nachgewiesen werden konnte sowie die Expression des *CerS2* Gens in Oligodendrozyten bekannt war. Zusätzlich sollte die Deletion des *CerS2* Gens Aufschluss über die Fettsäureacyl-CoA Spezifität in der Maus sowie die Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzungen in *CerS2*^{gt/gt} Mäusen geben.

Zur Erzeugung eines Mausmodells für das *CerS4* Gen sollte die Klonierung eines nicht konditionalen Austauschvektors erfolgen mit anschließender homologen Rekombination in ES-Zellen sowie der Injektion von ES-Zellklonen in Blastozysten. Der nicht konditionale Austauschvektor sollte die kodierende Region gegen ein Reporter gen NLS-LacZ ersetzen, gefolgt von einer Neomycinresistenzkassette. Durch das Einbringen des Reporter gens NLS-LacZ sollte in den später erzeugten transgenen Mäusen das *CerS4* Expressionsmuster anhand der β -Galaktosidase Reporter gen exprimierenden Zellen identifiziert werden können. Der Spleissakzeptor sollte ein korrektes Spleissen von Exon1 des *CerS4* Gens an das Reporter gen *NLS-LacZ* ermöglichen.

2. Material

Die hier aufgeführten Chemikalien werden in Analysequalität von den Firmen Gibco BRL, Merck, Sigma, Invitrogen, Difco, ICN Biomedicals, Renner, Roth und Serva bezogen. Enzyme und Nukleotide sind Produkte der Firmen New England BioLabs, Promega, Amersham Biosciences, MWG-Biotech und Roche. Nitrozellulosemembranen und Radiochemikalien werden bei Amersham Biosciences erworben.

2.1 PBS⁻ (Phosphat gepufferte Salzlösung)

PBS ⁻	137 mM	8 g NaCl
	2,7 mM	0,2 g KCl
	8,1 mM	1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O
	1,5 mM	0,2 g KH ₂ PO ₄
		ad 1 L ddH ₂ O

2.2 Lösungen für die Nukleinsäureanalyse

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Lösungen mit ddH₂O angesetzt und bei RT gelagert.

Alkali-Lsg. 1	50 mM 25 mM 10 mM	4,5 g Glukose 1,51 g Tris 1,86 g EDTA ad 500 ml, vor Gebrauch Zugabe von 1 µl/ml RNase 2000
Alkali-Lsg. 2	0,2 M 1 %	4 g NaOH 50 ml SDS-Lösung, 10% ad 500 ml
Alkali-Lsg. 3	3 M 5 M	147,3 g Kaliumacetat 57,5 ml Essigsäure ad 500 ml
deion. Formamid	Zu 100 ml Formamid werden 5 g Ionenaustauscherharz zugegeben, 30 min bei RT unter dem Abzug gerührt und anschließend die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert, Lagerung bei -20 °C	
DNS-Ladepuffer (6x)	0,25 % 0,25 % 30 %	125 mg Bromphenolblau 125 mg Xylenzyanol 15 ml Glyzerin ad 50 ml
Depurinierungs-Lsg.	0,25 M	29 ml Salzsäure, 32 % ad 1 L

Denaturierungs-Lsg.	1,5 M	175,3 g NaCl 40 g NaOH ad 2 L
ES-Lysis-Puffer	50 mM 20 mM 100 mM 0,5 % 2 mM	0,3 g NaCl 0,24 g Tris 3,72 g EDTA 500 µl SDS-Lösung, 10 % 29 mg CaCl ₂ ad 100 ml, pH 8,0, sterilfiltrieren, vor Gebrauch Zugabe von 50 µl Proteinase K-Lösung und 100 µl RNase 2000 pro ml
Ethidiumbromid		10 mg/ml Stammlösung
Mops-Puffer (10x)	200 mM 50 mM 10 mM	Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat EDTA; in A.bidest pH 7,0, autoklavieren, lichtgeschützt lagern
Natriumacetat	3 M	24,6 g Natriumacetat ad 100 ml, pH 4,8, 1 h autoklavieren
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml	1 g Proteinase K ad 50 ml; Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
RNase 2000	0,2 % 2000 U/ml	20mg RNase A 20.000 U RNase T1 ad 10 ml ddH ₂ O, Aliquots à 1 ml bei -20°C lagern
RNS-ddH ₂ O		ddH ₂ O, 1 h autoklavieren
RNS Ladepuffer (10x)	1 mM 0,4 % 0,4 % 50 %	18,6 mg EDTA 200 mg Bromphenolblau 200 mg Xylencyanol 25 ml Glycerin Ad 50 ml mit ddh ₂ O, Aliquotiert à 2 ml, Lagerung bei -20°C
Sephadex G50		Zu 30 g Sephadex G50 werden 300 ml TE-Puffer gegeben, ü.N. bei RT quellen gelassen und schließlich überschüssige TE-Puffer durch frischen ersetzt (1:1), 1 h autoklavieren
20x SSC	3 M 0,3 M	175,3 g NaCl 107,15 g Trinatriumcitrat x 5,5 H ₂ O
TE-Puffer	10 mM 1 mM	121 mg Tris 37,2 mg EDTA ad 100 ml

TBE-Puffer (0,75x)	67,5 mM 67,5 mM 1,9 mM	181,65 g Tris-HCl 77,03 g Borsäure 5,6 g EDTA ad 20 L
--------------------	------------------------------	--

2.3 Lösungen für die Bakterienkultur

Ampizillin-Stammlsg.	50 mg/ml	0,5 g Ampizillin in 10 ml Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern
Kanamycin-Stammlsg.	25 mg/ml	0,5 g Kanamycin in 50 ml Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern
Tetrazyklin-Stammlsg.	10 mg/ml	0,1 g Tetrazyklin in 10 ml Wasser lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern
Chloramphenicol-Stammlsg.	20 mg/ml	0,2 g Chloramphenicol in 20 ml 97 % Ethanol lösen, sterilfiltrieren und bei -20°C lagern
LB-Medium	1 % 1 % 0,5 %	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt ad 1 L; mit 300 µl 10 N NaOH auf pH 7,4, 20 min autoklavieren
LB-Agar	1,5 %	1 L LB-Medium 15 g Dunkel-Agar 20 min autoklavieren; ggf. Zugabe von Antibiotika bei 55°C
TFB I	30 mM 50 mM 100 mM 100 mM 15 %	295 mg Kaliumacetat 809 mg MnCl ₂ x 2 H ₂ O 1,47 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 1,21 g RbCl 15 ml Glycerin ad 100 ml, sterilfiltrieren.
TFB II	10 mM 75 mM 10 mM 15 %	209 mg Na-MOPS 1,1 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 121 mg RbCl 15 ml Glycerin ad 100 ml, pH 7,0; sterilfiltrieren. Lagerung bei 4°C
YT ⁺⁺ -Medium	0,5 % 0,5 % 0,8 %	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 8 g Trypton ad 1 L, pH 7,5, autoklavieren; anschließend Zugabe von 20 ml MgSO ₄ (1 M, autoklaviert) und 10 ml KCl (1M, autoklaviert)

Glycerin-Lsg.	10 %	100 ml Glycerin, ad 1 L, autoklaviert
	50 %	25ml Glycerin, ad 50 ml, autoklaviert

2.4 Lösungen für die Zellkultur

ES-EDTA-Lösung	5 mM	0,925 g EDTA Zu 500 ml ES-PBS ⁻ , pH 7-8 durch Zugabe von 200 µl 10 N NaOH, 1 h autoklavieren
ES-Medium	5 % 5 % 1 mM 1 x 2 mM 1 x 0,1 % 0,007 %	500 ml Glasgow-MEM 28 ml FCS, ES-Zellkultur-getestet 28 ml NCS, ES-Zellkultur-getestet 5,4 ml Na-Pyruvat Pen/Strep, 100x Glutamin Aminosäuren, 100x LIF β-ME-Stock Aliquotierte Zutaten unter einer Sterilbank zugeben, Lagerung bei 4°C ca. 4 Wochen, vor Gebrauch erwärmen
ES-Einfriermedium	20 % 20 %	17,5 ml ES-Medium 2,5 ml FCS, ES-Zellkultur getestet 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) Aliquot bei – 20°C ca. 1 Jahr lagerbar
ES-Trypsin-Lösung	1 mM 1 % 0,025 %	400 ml ES-PBS ⁻ 100 ml ES-EDTA-Lösung 5 ml Chicken-Serum 5 ml Trypsin, 0,25 % Aliquots à 50 ml bei – 20°C lagern
G418-Lösung	50 mg/ml 100 mM	aktiv G418 Sulfat PIPES lösen von 10 g G418 und ausgerechneter Menge PIPES, so dass eine Lösung entsteht mit 100 mM PIPES und aktivem G418 von 50 mg/ ml, sterilfiltrieren; Aliquots à 10 ml bei –20°C lagern
Gelatine-Stock	1 %	5 g Gelatine Zugabe von 500 ml Zellkultur-Wasser, 1x autoklavieren, die Lösung mischen und nochmals autoklavieren; Lösung ist bei 4°C ca. ein Jahr lagerbar
Gelatine (zur Beschichtung der Kulturflaschen)	0,1 %	50 ml 1 % Gelatine ad 500 ml Zellkultur-Wasser
β-ME-Stock	0,7 %	0,3 ml β-Mercaptoethanol Ad 42,6 ml mit Zellkultur-Wasser, sterilfiltrieren, Aliquots à 1 ml bei -20°C

HPS	20mM 2,5 M	100 ml ES-PBS ⁻ 2 ml HEPES, 1 M 240 µl Glucose, 100 x Aliquots à 10 ml bei -20°C lagerbar
-----	---------------	---

2.5 Lösungen für die LacZ-Färbung

EGTA-Lösung	100 mM	7,6 g EGTA Zugabe von 170 ml ddH ₂ O; Zugabe von 1-2 Tropfen 10 N NaOH bis Lsg. klar wird, pH 8,0, ad 200 ml
Deoxycholat-Lösung	10 %	10 g Natriumdeoxycholat ad 100 ml
K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung	0,5 M	8,23 g Kaliumhexacyanoferrat (III) ad 50 ml, dunkel bei 4°C lagern
K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung	0,5 M	10,56 g Kaliumhexacyanoferrat (II) ad 50 ml, dunkel bei 4°C lagern
Na ₂ HPO ₄ -Lösung	0,5 M	44,5 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 500 ml, pH 9
NaH ₂ PO ₄ -Lösung	0,5 M	34,5 g Natriumdihydrogenphosphat ad 500 ml, pH 4,7
MgCl ₂ -Lösung	50 mM	2,03 g Magnesiumchlorid ad 200 ml
X-Gal-Lösung	4 %	2 g X-Gal ad 50 ml mit N,N'-Dimethyl-formamid, lichtgeschützt bei -20°C lagern
LacZ-Basislösung	100 mM 1,25 mM 2 mM	170 ml Na ₂ HPO ₄ -Lösung; 0,5 M ~ 30 ml NaH ₂ PO ₄ -Lösung; 0,5 M 25 ml MgCl ₂ -Lösung, 50 mM 20 ml EGTA-Lösung, 100 mM Nur Phosphatpuffer mit pH 7,4; anschließend Zugabe der anderen Lösungen; ad 1 L
LacZ-Waschlösung	0,01 % 0,2 %	1 ml Deoxycholat-Lösung, 10 % 2 ml Nonidet P 40 ad 1 L mit LacZ-Basislösung
LacZ-Färbelösung	5 mM 5 mM 80 mg/ml	5 ml K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung, 0,5 M 5 ml K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung, 0,5 M 10 ml X-Gal-Lösung, 4 % ad 500 ml mit LacZ-Waschlösung; Lösung ohne X-Gal lagerbar bei RT; nach Zugabe dunkel bei 4°C lagern

2.6 Lösungen für die Immunoblot Analyse

APS-Stammlösung	10 %	1 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml; bei 4°C lagern
complete	25 x	1 Tablette complete ad 2 ml; bei -20°C lagern
Homogenisierungspuffer	60 mM 3 %	2,03 g Magnesiumchlorid 30 ml SDS-Lösung, 10 % ad 100 ml
Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4 %	30,29 g Tris 20ml SDS-Lösung, 10 % ad 500 ml; pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M 0,4 %	91 g Tris-Base 20 ml SDS-Lösung, 10 % ad 500 ml; pH 8,8
Laemmli-Probenpuffer	62,5 mM 0,2 % 3 % 10 % 0,01 % 5 %	0,8 g Tris 3 g SDS (Pulver) 10 ml Glyzerin 10 mg Bromphenolblau 5 ml β-Mercaptoethanol ad 100 ml; pH 6,8; Aliquots bei -20°C
SDS-Elektrophorese-Puffer	0,25 M 1,92 M 1 %	15 g Tris-Base 72 g Glycin 50 ml SDS-Lösung, 10 % ad 5 L; pH 8,3
Ponceau-Färbelösung	0,2% 3 %	1 g Ponceau S 15 ml Trichloressigsäure ad 500 ml
5xTransferpuffer	50 mM 0,1 M 0,8 M	15,4 g Tris-HCl 18,5 g Tris-Base 144,2 g Glycin ad 2 L

2.7 Lösungen für die Lipidanalytik

RP-18 Material		Beads in 2 Volumen Chloroform/ Methanol 2:1 resuspendieren, 30 min Rühren, 4 x je 2 Volumen Methanol waschen, Beads jeweils 20 min auf Eis absetzen lassen und Überstand verwerfen
DEAE Material		DEAE in Wasser und Methanol im Büchner-Trichter waschen, 1 M Natriumacetat solange waschen bis Silbernitrat-Nachweis positiv ist, DEAE in Wasser und Methanol

Kupfersulfat/	8 %	15,6 g Kupfersulfat-Pentahydrat
Phosphorsäure-Färbelösung	10 %	9,4 ml Phosphorsäure (85 %) ad 100 ml

2.8 Anästhetikum

Xylazin-Ketamin	2 %	4,25 ml isotonische NaCl-Lösung
	100 mg/ml	0,5 ml Rompun
		0,25 ml Ketavet
		zum Narkotisieren 100 µl/g Körpergewicht

2.9 Kommerzielle Flüssigkeiten/Lösungen

Name	Hersteller
Arcylamid-Lösung	Roth
Chloroform	Merck
Chloroform für Dünnschichtchromatographien	Merck
Diethylether	Merck
Dimethylsulfoxid	Merck
Eisessig	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol	Serva
Ethidiumbromid	Roth
Formaldehyd, 37 %	Merck
Glutaraldehyd, 25 %	Sigma
Glycerin	Sigma
n-Hexan	Merck
Isopropanol	Merck
Methanol	Merck
Roti-Phenol/Chloroform	Roth
Phosphorsäure	Merck
PFA	Roth
Salpetersäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
SDS, 20%	Fluka
TRIZOL	Gibco BRL
QuickHyb	Stratagene

2.10 Kommerzielle Reagenziensätze

Name	Hersteller
Jetstar Plasmid Midi Kit 50	Genomed
Multiprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen
Perfectpret Gel Cleanup Kit	Eppendorf
PCR Reaction Mix mit MgCl ₂	Sigma
Phusion High Fidelity PCR Kit	New England BioLabs

2.11 Allgemeiner Laborbedarf

Material	Hersteller
MF TM -Membran Filter, Filter Typ 0,025 µm VSWP	Millipore
Glaswolle	Roth
HPTLC-Platten	Merck
Hybond TM -N Nylonmembran	Amersham Biosciences
Hybond TM -N ⁺ Nylonmembran	
Parafilm M	American National Can
Pipettenspitzen, Reagenzgefäße	Sarstedt, Falcon
Precellyskit	Peqlab
Rotrandfilter (0,2 µm, steril), 3MM-Papier	Schleicher und Schuell
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak
Schraubdeckelgefäße	CS-Chromatographie
Sterile Zellkulturartikel Falcon	Falcon, Sarstedt, Nunc, Becton Dickinson

2.12 Geräte-Hersteller

Axiophot: Durchlicht-/Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener AxioCam Color HR, Zeiss
 Reacti-Vap TM Evaporator, Thermofisher
 Blotting-Chamber Mighty-Small II, Bio-Rad
 Chef-DRTM II Electrophoresis Cell, Bio-Rad
 Elektrophoresekammern Pharmacia GNA-100 und -200 (Nukleinsäuren), Pharmacia
 Entwicklermaschine, AGFA Curix 60
 Feinwaage Navigator, Ohaus
 Heizblock DRI-Block DB3
 Heizofen, Heraeus
 Horizontal Kammer, CAMAG
 Inkubatoren für die eukaryotische Zellkultur mit CO₂-Regelung, Heraeus
 Kühlzentrifuge 5415 R (24 Röhrchen), Eppendorf
 Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotor JA20, Beckmann
 Kühlzentrifuge Multifuge primoR, Heraeus
 Linomat V, CAMAG mit N₂-Regelung
 Mikrowelle MW 800
 Mikropulser, Bio-Rad
 Multifuge 3 S-R, Heraeus
 PCR Maschine PTC-100 und PTC 200 Programmable Thermal Controller, BioZym
 Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500 Bio-Rad
 Spannungsgerät LKB GPS 200/400, Spannungsgerät Bio-Rad 1000/500 Bio-Rad
 Spannungsgerät LKB GPS 200/400
 Spektralphotometer DU 640, Beckman
 Szintillationszähler LS 1801, Beckman
 UV Stratalinker 2400, Stratagene
 UV-Transilluminator Herolab E.A.S.Y Win32, Herolab
 Zentrifuge 5415 D (24 Röhrchen), Eppendorf
 Zentrifuge J2-21 (variabler Rotor), Beckman
 Zentrifuge Universal 2S, Hettich

2.13 Nukleinsäuren

2.13.1 Oligonukleotidstartermoleküle

Startermoleküle werden bei MWG und Microsynth bestellt, mit ddH₂O auf 100 pmol/μl verdünnt und bei – 20°C gelagert.

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Bindungsstelle	Orientierung*	PCR
2_geno_for	GGT CAG TCT GCA TGC AGT TAC CTC TCC	Intron1 des <i>CerS2</i> Gens	S	βgeo
2_βneo	GGG ATC CAC TAG TTC TAG CCT CGA	zwischen der 5'LTR und dem Spleissdonor der Rosafary Sequenz	G	βgeo
2_geno_rev	GAG ACA AGC ACA TCC CCA AAG CAC	Intron1 des <i>CerS2</i> Gens	G	βgeo
2_βneoend for	CCT TCT TGA CGA GTT CTT CTG AG	3'Ende der Sequenz des Fusionsproteins βgeo der Rosafary Sequenz	S	Hygro
Hinter frt rev neu	CTT TAT CCA GCC CTC ACT CCT TCT C	Zwischen zweiter frt Sequenz der Hygromycinresistenzkassette und der 3'LTR der Rosafary Sequenz	G	Hygro
Lass2 frt for	CAT TGA CTG GAG CGA GGC GAT GTT C	3'Ende der Sequenz der Hygromycinresistenzkassette	G	Hygro
<i>USP-Flp</i>	TAA GGT CCT GGT TCG TCA GTT TGT GG	Flp-Rekombinase	S	Flp
<i>DSP-Flp</i>	GTG ATA TTA TCC CAT TCC ATG CGG GG	Flp-Rekombinase	G	Flp
Lass2_E2H	CCC AAG CTT GAT GCT CCA GAC CTT GTA TGA CTA C	Exon 2 des <i>CerS2</i> Gens	S	2_ SB
Lass2_Isof_E7	GCT TGA CAT CAG AGG CAA TGC TG	Exon 7 des <i>CerS2</i> Gens	G	2_ SB
<i>Lass6 for</i>	CAG GAA TTC GCC CCT TTT CCA CGT TGT GGT C	Exon 10 des <i>CerS6</i> Gens	S	<i>CerS6</i>
<i>Lass6 rev</i>	CTG GGA TCC GTC AGG ACA GAA GAC TGG ACT AAT AG	Exon 10 des <i>CerS6</i> Gens	G	<i>CerS6</i>
4_5'HR_RV_for	CAG GGG CCC GAG CAC ATG CTG AGG TCA CAG	Intron 1 des <i>CerS4</i> Gens; mit Restriktionsschnittstelle <i>PspOMI</i>	S	5'HR

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Bindungsstelle	Orientierung*	PCR
4_5'HR_RV_rev	<u>CAT AAC TCT</u> ATG CAT GAG GCT CTG GTT CCC AGA C	Intron 1 des <i>CerS4</i> Gens, unterstrichene Sequenz = Überlappungsbereich in der Fusions-PCR	G	5'HR
4_3'HR_RV_for	<u>CAG AGC CTC</u> ATG CAT AGA GTT ATG TGG ACA CAA TG	3'UTR des <i>CerS4</i> Gens; unterstrichene Sequenz = Überlappungsbereich der Fusions-PCR	S	3'HR
4_3'HR_RV_rev	CTG GAG CTC CCT GGC CCA TGA CCC CTA TAT TTT C	3'UTR des <i>CerS4</i> Gens; mit Restriktionsschnittstelle <i>SacI</i>	G	3'HR
SA for	CAG GGT ACC GAA CTC TTC AAG GAT TGA CCA TG	Spleissakzeptor vor Exon2 des <i>CerS4</i> Gens; mit Restriktionsschnittstelle <i>Asp718I</i>	S	SA
4konv_SA_rev 2	<u>CTT TTT TGG</u> AGC CAT GCT GTG GAT ACA CAA TCA	Spleissakzeptor vor Exon2 des <i>CerS4</i> Gens; unterstrichene Sequenz = Überlappungsbereich der Fusions-PCR	G	SA
4 kon_LacZ_for2	<u>CCT GAT TGT GTA TCC ACA</u> <u>GCA TGG CTC CAA AAA</u>	NLS-LacZ Reportergen; unterstrichene Sequenz = Überlappungsbereich der Fusions-PCR	S	LacZ
LacZ rev	TCG GCA TAA CCA CCA CGC TCA TCG	NLS-LacZ Reportergen	G	LacZ
3'HR_Mini_for	CAG GGA AGA TCT ACT AGT ATA GAC AAC CTT GGA C	E11 des <i>CerS4</i> Gens - 3'UTR	S	3'HR Mini
3'HR_Mini_rev	CTA ACC ATA CAT GGA TCC TCT GGC TTT GG	3'UTR des <i>CerS4</i> Gens	G	3'HR Mini
3'HR_Test_for	CAG GGA AGA TCT ACT AGT ATA GAC AAC CTT GGA C	E11 des <i>CerS4</i> Gens- 3'UTR	S	3'HR Test
3'HR_Test_rev	GTC ACT AGT CAA GTG AGC AAG TCT CCT CAT GTC	Hinter dem vierten Polyadenylierungssignal des <i>CerS4</i> Gens	G	3'HR Test
4_Test_for	GTA ACC GTT CGT ACG AGA ATG	Hinter der zweiten frt-Stelle des Testvektors	S	ES-Zell
4_Test_rev	CAG ACC TGT CCT GGA CTT GCT TGG	3'UTR des <i>CerS4</i> Gens	G	ES-Zell
4_S3_for_EcoRV	GTG GGA CAT TTC TAA TCC AAG TCG C	5'HR Sonde für Southern-Blot Analyse	S	5' Sonde
4_S3rev_EcoRV	GTG ACA CAT GTT TAC CCA CAC	5'HR Sonde für Southern-Blot Analyse	G	5' Sonde

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Bindungsstelle	Orientierung*	PCR
Lass4_I1 for	GAG ACC CTG ACT TTG AAA ACC AGG TG	Intron 1 des <i>CerS4</i> Gens	S	PCR I
Lass4_I1 rev	GTT TAT GCG TAC ATG GGC AAG TCC	Intron 1 des <i>CerS4</i> Gens	G	PCR I
Lass4 geno for (Intron1)	GGG AGT CAG AGG AGG GCA TTG GC	Intron 1 Bereich des <i>CerS4</i> Gens	S	Genotypi- sierung
NLS_LacZ rev	GGG CGC ATC GTA ACC GTG CAT CTG	NLS LacZ Reporter gen	S	Genotypi- sierung
Lass4 geno rev (Exon2)	CAG CCA CCA GGA CCA GAG CCA C	Exon 2 des <i>CerS4</i> Gens	G	Genotypi- sierung

* S = Sinnstrang; G = Gegensinnstrang

2.13.2 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Passagier-DNA	Referenz
Lox-frt-Neo-frt-loxP	pBSK	LoxP-frt-Neo-frt- LoxP	Hagen Wende
pBS_IRES_NLS-LacZ	pBSK	IRES_NLS-LacZ	Oliver Tress

2.13.3 Klonierungsvektoren

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle
pBlueskript II SK (+/-)	Blau-Weiß-Selektion, Ampizillin-Resistenzgen, T7-/ T3-Promotoren, MCS	Stratagene
pdrive	Blau-Weiß-Selektion, Ampizillin-Resistenzgen, Kanamycin-Resistenzgen, T7/ SP6-Promotoren	Qiagen
pDTA	Diphtherien ToxinA Gen als negativ Kontrolle in der ES- Zellkultur, MCS, T3- Promotoren	Hagen Wende

2.13.4 Hybridisierungssonden

Zielregion	Beschreibung	Größe	Verwendung	Referenz/ Quellen
Exon5-Exon6 des <i>CerS2</i> Gens	Asp718I-, BamHI Fragment aus dem Vektor E5- E6_pBSK	424 bp	Southern-Blot Analyse	
Exon11- 3'UTR der <i>CerS2</i> RNS	<i>Pst</i> I-, <i>Nco</i> I- Fragment aus dem Vektor <i>CerS2</i> _EST- Klon	624 bp	Northern-Blot Analyse	
LacZ	<i>Bst</i> XI-Fragment aus dem Vektor pSV- β -Galakto- sidase	617 bp	Southern-Blot Analyse Northern-Blot Analyse	Promega
<i>CerS1</i>	<i>Kpn</i> I-, <i>Xho</i> I- Fragment aus Lass1-cDNS_ subkloniert in pBSK	550 bp	Northern-Blot Analyse	Christina Ginkel
<i>CerS4</i>	<i>Kpn</i> I-Fragment aus <i>CerS4</i> _EST Klon	750 bp	Northern-Blot Analyse	RZPD
<i>CerS5</i>	<i>Xho</i> I-, <i>Bgl</i> I-, Fragment aus <i>CerS5</i> _EST- Klon	585 bp	Northern-Blot Analyse	Dominic Gosejacob
<i>CerS6</i>	<i>Eco</i> RI-, <i>Bam</i> HI- Fragment aus <i>CerS6</i> _pBSK	550 bp	Northern-Blot Analyse	
GADPH	<i>Bam</i> HI-, <i>Sac</i> I- Fragment aus dem Vektor pTRI-GADPH Mausvektor	316 bp	Northern-Blot Analyse	Thomas Ott
CDS_1	<i>Ava</i> I Fragment aus dem Vektor CDS1_pBSK	695 bp	BAC Analyse	
3'UTR	<i>Kpn</i> I, <i>Hind</i> III Fragment aus dem Vektor 3'UTR_pBSK	1053 bp	BAC Analyse	

Zielregion	Beschreibung	Größe	Verwendung	Referenz/ Quellen
5'Sonde_SB	EcoRI Fragment aus dem Vektor pdrive		Southern-Blot Analyse ES-Zellen	
3'Sonde_SB	Psil-, NotI Fragment aus Testvektor	571 bp	Southern-Blot Analyse ES-Zellen	

2.14 Größenstandards

2.14.1 DNS, RNS und Protein

Standard	Fragmentgrößen in kb bzw. kDa
100 bp DNS Leiter (Invitrogen)	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072
1 kb DNS Leiter (Invitrogen)	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1639, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216
Lamba-DNS (Roche); HindIII/EcoRI- gespalten	0,125, 0,5, 0,83, 0,95, 1,4, 1,7 1,9 2,0, 4,3 5,0, 5,1, 21,2
0,5 – 1 kb RNS Leiter (Invitrogen)	0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10
Prestained Precision Protein Standard (Bio-Rad)	10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250

2.14.2 Lipidstandards

Material	Herkunft	Hersteller
Cholesterol	Pflanze	Avanti Polar Lipids
Cholesteryl oleate	synthetisch	Sigma
1,2-Dicapryloyl- <i>sn</i> -glycerol	synthetisch	Sigma
Galaktosylceramid	synthetisch	Avanti Polar Lipids
Ganglioside	Rindergehirn	Sigma
L- α -Phosphatidylinositol-4-phosphat	Schweinegehirn	Avanti Polar Lipids
L- α -Phosphatidylethanolamine-4- phosphat	Schweinegehirn	Avanti Polar Lipids
L- α -Phosphatidylcholin-4-phosphat	Schweinegehirn	Avanti Polar Lipids
L- α -Phosphatidylserin-4-phosphat	Schweinegehirn	Avanti Polar Lipids
Sphingomyelin	Rindergehirn	Sigma
Stearinsäure	Pflanzen	Matreya
Triolein	synthetisch	Sigma

2.15 Bakterienstämme

E. coli Stamm	Genotyp	Referenz
XL-1 blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ (mcrCB-hsd SMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F'proAB lacIqZ Δ M15, Tn10 (Tetr12,5 μ g/ml)]	Bullock et al., 1987
DH10B	F_mcrA_(mrr-hsRMS-, mcrBC)_80dlacZ_M15_lacX74 deoR recA1 endA1 araD139_(ara,leu)7649 ga/Uga/K rspL nupG	Liu et al., 2003
DH10B+ λ	wie DH10B, λ -Red ⁺	Liu et al., 2003
DY380	wie DH10B, λ -Red ⁺	Liu et al., 2003
EL250	Wie DY380, jedoch araC-P _{BAD} -Cre	Liu et al., 2003

2.16 Eukaryontische Zell-Linie

Bezeichnung	Eigenschaft und Verwendung	Referenz/Quelle
HM1	Embryonale Stammzellen der Maus, gewonnen aus dem Mausstamm Sv 129P2/OlaHsd	Magin et al., 1992

2.17 Mauslinien

Bezeichnung	Eigenschaft und Verwendung	Quelle
C57BL/6	Wildtyp-Mausstamm mit schwarzer Fellfarbe für Züchtungen und Rückkreuzungen; Weibchen als Blastozysten-Spendertiere für BCI	Charles River; eigene Zucht
NMRI	Wildtyp-Mausstamm, albino, Weibchen als Empfängertiere für BCI, vasktomierte Männchen zur Erzeugung von scheinchwangeren Leihmüttern (Foster)	Charles River; eigene Zucht
Deleter Flp	Transgene Mauslinie, welche die Flp-Rekombinase ubiquitär unter Kontrolle des menschlichen β -Aktin Promotors exprimiert	Rodriguez et al., 2000

2.18 Antikörper

Antikörper	Einsatz	Verdünnung	Referenz
anti-MBP aus Kaninchen (monoklonal)	primär	1:2000	AbD Serotec
Ziege anti-Kaninchen (polyklonal), HRP konjugiert	sekundär	1:2500	Dionova

3. Methoden

3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.1.1 Plasmid-Präparation aus Bakterien

3.1.1.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Diese Methode eignet sich für eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien, die eine Identifikation rekombinanter Bakterienklone durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen ermöglicht.

2 ml antibiotikahaltiges LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37° C inkubiert. 1,5 ml der Bakteriensuspension werden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 12000 Upm 1 min lang zentrifugiert, wodurch die Bakterien auf den Reaktionsgefäßboden sedimentieren. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 100 µl Alkalilösung I resuspendiert und 2 min inkubiert. Dadurch kommt es zur Destabilisierung der Bakterienzellwand durch EDTA und zur Degradation der RNS durch die in der Lösung enthaltene RNase. Durch Zugabe von 200 µl Alkalilösung II, mehrmaligen Invertieren und einer weiteren Inkubation von 2 min wird die Zellwand vollständig lysiert und die chromosomale- und Plasmid-DNS sowie Proteine denaturiert. Anschließend erfolgt die Neutralisierung des Lysats durch die Zugabe von 150 µl Alkalilösung III mit anschließendem Invertieren, wodurch die Plasmid-DNS renaturiert wird. Die denaturierte chromosomale DNS, Proteine und RNS bilden in Anwesenheit der Salze einen unlöslichen Komplex und werden mit dem Salz präzipitiert. Der unlösliche Komplex wird bei 12000 Upm für 6 min und RT zentrifugiert, der Überstand mit der Plasmid-DNS wird hingegen mit 500 µl absoluten Ethanol in einem neuen Reaktionsgefäß gefällt und durch eine 6-minütige Zentrifugation bei 12000 Upm sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Plasmidsediment mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 12000 Upm für 5 min und RT zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Plasmidsediment luftgetrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer gelöst. Eine 30-minütige Inkubation bei RT auf dem Schüttler fördert das Lösen der Plasmid-DNS.

3.1.1.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midipräparation) aus Bakterien

Größere Mengen Plasmid-DNS mit hohem Reinheitsgrad werden durch Ionenaustausch-Chromatographie gewonnen. Hierfür wird der Reagenziensatz JETstar Plasmid Midi Kit 50 (Genomed) verwendet. Die Präparation erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Je nach Ausbeute (100 - 200 µg bei *high copy*-Plasmiden und einem Kulturvolumen von 50 ml) und in Abhängigkeit von ihrer weiteren Verwendung wird die Plasmid-DNS in 100–200 µl ddH₂O oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und ist bei 4°C bzw. -20°C lagerbar.

3.1.1.3 Endotoxin-freie Plasmidisolierung (Maxi-Präparation)

Die Aufreinigung des Austauschvektors für die Transfektion der HM1 ES-Zellen erfolgt mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben und unter sterilen Bedingungen.

3.1.2 Isolierung genomischer DNS aus embryonalen Stammzellen

Eine erste Identifizierung homolog rekombinierter HM1 ES-Zellen erfolgt mithilfe der PCR (Kap. 3.2.1.3). Dazu wird die Zellsuspension (Kap. 3.6.3) in eine 96 well Schale überführt, die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (800 upm, RT, 5 min) und in 40 µl 1xPCR Puffer mit 1 µl Proteinase K-Mix durch Strudelmischen resuspendiert. Nach einer Inkubation von 55°C ü.N. wird das Lysat auf 95°C für 15 min erhitzt. 10 µl dieses Lysats werden für die ES-Zell PCR eingesetzt.

Für eine DNS-Aufreinigung zur Durchführung einer Southern-Blot Hybridisierungs-Analyse (Kap. 3.5.1) wird ein mit ES-Zellen konfluent bewachsener T25-Kolben eingesetzt, der nach zwei Waschschritten in PBS⁻ mit 1,5 ml ES-Lysis-Puffer eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert wird. Anschließend wird das Lysat in ein 13 ml Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und zwei Tage bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Roti Phenol/Chloroform und anschließendem mehrfachen Invertieren wird der Ansatz bei 6000 Upm für 15 min zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Röhrchen überführt. Die DNS-Fällung erfolgt durch Zugabe von 3 ml Isopropanol und mehrfachen Invertieren, bis eine DNS-Flocke sichtbar wird, die mit einem sterilen Zahnstocher entnommen wird. Die DNS-Flocke wird durch Zugabe von 5 ml 70 % EtOH, kurzer Zentrifugation (6000 Upm, 5 min) und Abdekantieren des Überstandes zweimal gewaschen, bevor sie 15 min bei RT getrocknet und schließlich in 100 µl TE-Puffer aufgenommen wird. Zum vollständigen Lösen wird der Ansatz eine Stunde bei 55°C im Wasserbad inkubiert, bevor etwa 10 µl zur Restriktionsspaltung und anschließender Southern-Blot Hybridisierung oder nach entsprechender Verdünnung für PCR Analysen eingesetzt werden. Die Lagerung der DNS erfolgt bei 4°C.

3.1.3 Isolierung genomischer DNS aus Mausschwanzspitzen

Zur Isolierung genomischer DNS werden Schwanzbiopsien der Mäuse (etwa 0,5 cm) in 0,5 ml Laird-Puffer (Laird et al., 1991) mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) bei 55°C über Nacht lysiert. Haare und unlösliche Zellrückstände werden durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, RT) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und mehrmaliges Invertieren wird die DNS präzipitiert und durch erneute Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, RT) sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wird die DNS mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl Wasser aufgenommen. Nach der Inkubation bei 55°C ü.N. kann die DNS für Genotypisierungs-PCRs eingesetzt werden.

3.1.4 Isolierung der genomischen DNS aus der Leber

Die Lebern von CerS2^{+/+}, CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäusen mit und ohne Hygromylinresistenzkassette werden direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Gewebeprouben werden in vorgekühlten Schraubzylindern mit Metallstäben und einem Hammer zu Pulver zerkleinert, welches in 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesammelt wird. Anschließend wird das Gewebepulver mit 10 ml Laird-Puffer versetzt und zwei bis drei Tage im Wasserbad bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µg/ml RNase 2000 erfolgt eine Inkubation bei 37°C schüttelnd ü.N.. Zu den Organlysaten werden 10 ml Roti Phenol/Chloroform hinzugegeben und anschließend bei 6000 upm für 30 min zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und nach Zugabe von zwei Volumen absoluten Ethanol und 1/50 Volumen 3 M NaCl und mehrfachen Invertieren wird eine DNS-Flocke sichtbar. Diese DNS-Flocke wird zwei Stunden in 70 % Ethanol auf der Wippe gewaschen, luftgetrocknet und nach Zugabe von 1 ml TE-Puffer ü.N. im 55°C Wasserbad gelöst. Die DNS kann bei 4°C gelagert und für Southern-Blot Analysen eingesetzt werden.

3.1.5 Isolierung der Gesamt-RNS aus Leber, Niere und Gehirn

Zur Gewinnung von RNS werden PBS⁻ gewaschene und anschließend schockgefrorene Lebern, Nieren und Gehirne von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen eingesetzt. Zur Homogenisierung der Gewebe werden 5 ml Trizol auf die Gewebe gegeben und diese jeweils mit einem Homogenisierungsstab für 30 sec zerkleinert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 4°C wird zu den Gewebelysaten 1 ml Chloroform gegeben und 15 sec bei RT

mehrfach invertiert. Das Gemisch wird anschließend 15 min bei 12000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase, welche die gelöste RNS enthält, wird vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, in dem 3 ml Isopropanol vorgelegt sind. Nach mehrfachem Invertieren des Ansatzes wird er für 15 min bei 12000 Upm und 4°C zentrifugiert, wobei die RNS sedimentiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert. Die pelletierte RNS wird mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, für 10 min bei 10000 Upm und 4°C erneut zentrifugiert und bei RT getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 100 µl RNS freien Wasser aufgenommen und in ein 1,5 ml Schraubdeckel-Gefäß überführt und bei -70°C gelagert. Zur RNS-Konzentrationsbestimmung (Kap. 3.1.9.1) und für ein RNS-Testgel werden 10 µl abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Die verbleibende RNS wird wie in Kap. 3.1.8 beschrieben mit 3 M Natriumacetat und Ethanol (absolut) gefällt und auf 5 µg/µl eingestellt.

3.1.6 Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen

3.1.6.1 Gelelution mit kommerziellen Reagenziensätzen

Die gewünschten DNS-Fragmente werden unter UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Präparation von DNS-Fragmenten aus dem Gel werden die Reagenziensätze QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf) nach Herstellerangaben verwendet und die DNS in 30 µl ddH₂O eluiert.

3.1.7 Natrium-Acetat-Fällung

Diese Methode dient der Konzentrierung von DNS oder RNS. Dabei wird die DNS/RNS mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen kaltem Ethanol (absolut) gefällt. Die Inkubation findet 30 min bei -20°C statt, ist aber auch ü.N. möglich. Anschließend wird die DNS 30 min bei 13000 Upm und 4°C sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol zur Entfernung von Salzen wird die DNS/RNS 10 min unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wird die DNS luftgetrocknet und in einer entsprechenden Menge TE-Puffer in Lösung gebracht. Die aufgereinigte DNS kann bei -20°C, die aufgereinigte RNS bei -80°C gelagert werden.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.8.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum der heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm, und das von in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Die Absorptionen von Nukleinsäurelösungen werden bei 260 nm und 280 nm gegen TE-Puffer als Referenz gemessen (Quarzküvetten). Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von 1 cm Länge einer Konzentration von 50 µg/ml (DNS) bzw. 40 µg/ml (RNS). Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der Lösung und sollte für DNS zwischen 1,8 und 2,0 bzw. für RNS zwischen 1,9 und 2,2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch UV-absorbierende Stoffe (Proteine, Phenole) hin.

3.1.8.2 Konzentrationsabschätzung im Gel

Der Vorteil dieser Methode liegt neben der Konzentrationsabschätzung auch in der Kontrolle der Qualität der Nukleinsäuren anhand des Bandenmusters. Außerdem können im Gel Nukleinsäurekonzentrationen dargestellt werden, welche für eine photometrische Bestimmung zu gering sind. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über einen Bandenintensitätsvergleich der Probe unbekannter Konzentration mit einer Probe bekannter Nukleinsäurekonzentration (200 ng λ -DNS, *HindIII*/*EcoRI*; Kap. 2.14.4). Hierbei wird die zur Konzentration proportionale Leuchtintensität einer Bande in einem EtBr-Agarosegel mit derjenigen des Referenzstandards verglichen.

3.2 Nukleinsäure-Analysen

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl. „polymerase chain reaction“) erlaubt die exponentielle Amplifikation (Mullis und Feloona, 1987) eines bestimmten DNS-Abschnitts. Für das erfolgreiche Ablaufen einer PCR müssen sich folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß befinden: DNS, ddH₂O, 5x PCR Puffer in entsprechender Verdünnung, MgCl₂ (25mM), dNTP-Mix, Sinnstrang-Oligonukleotidstartermoleküle und Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermoleküle. Die PCR besteht aus drei Schritten. Vor diesen Schritten wird einmalig am Beginn jeder PCR die DNS 5 min bei 94°C erhitzt. Dies dient zur Trennung der DNS-Doppelstränge. Im ersten Schritt der PCR erfolgt eine Denaturierung der DNS bei

94°C, wodurch die als Matrize eingesetzten DNS-Fragmente denaturiert werden. Im zweiten Schritt (Schmelzphase) wird die Temperatur auf 50 – 70°C herabgesenkt, wodurch sich die Oligonukleotidstartermoleküle an die homologen Sequenzen der DNS anlagern. Im dritten Schritt findet die Synthese an den Oligonukleotidstartermolekülen in 3' Richtung durch die Taq-Polymerase statt, indem das Reaktionsgemisch auf 72°C erhitzt wird. Es werden somit zwei komplementäre DNS-Einzelstränge synthetisiert. Diese drei Schritte (Denaturierung, Anlagerung der Oligonukleotidstartermoleküle und DNS-Synthese) werden ca. 20-40 mal wiederholt, wodurch eine exponentielle Amplifikation der zwischen den beiden Oligonukleotidstartermolekülen liegenden Sequenzen erreicht wird. Eine Analyse der amplifizierten DNS-Sequenzbereiche erfolgt über Agarosegelelektrophorese.

MgCl₂-Lösung [25 mM], PCR Puffer [5x] und die Taq-Polymerase [5 U/μl] werden von der Firma Promega bezogen. Die dNTP-Lösung (10 mM each) stammt von der Firma Hybaid-AGS, während die verwendeten Startermoleküle von den Firmen MWG und Microsynth synthetisiert und nach Herstellerangaben in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst werden. Die Isolierung der DNS wird in den Kapiteln 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben.

PCR zur Charakterisierung von CerS2 „Gene Trap“ Mäusen

3.2.1.1 PCR zum Nachweis der Insertion der Rosafary Sequenz ins Genom von transgenen Mäusen (βgeo PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 μl	DNS	94°C	5 min	1
16,3 μl	ddH ₂ O	94°C	30 sec	
1,5 μl	25 mM MgCl ₂	61°C	30 sec	35
5,0 μl	5xPCR Puffer	72°C	40 sec	
0,3 μl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 μl	2_geno_for	25°C	∞	1
0,2 μl	2_βneo			
0,2 μl	2_geno_rev			
0,3 μl	Taq-Polymerase			

Die βgeo PCR liefert für das Wildtyp ein 400 bp großes Amplikon und für das „Gene Trap“ Allel ein 564 großes Amplikon.

3.2.1.2 PCR zum Nachweis der Anwesenheit der Hygromylinresistenzkassette in der Rosafary Sequenz in transgenen Mäusen (Hygro PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
15,8 µl	ddH ₂ O	94°C	30 sec	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	64°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	40 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	2_βneoend for	25°C	∞	1
0,2 µl	Hinter frt rev neu			
0,2 µl	Lass2 frt for			
0,3 µl	Taq-Polymerase			
0,5 µl	DMSO			

Die Hygro PCR liefert für das Allel mit Hygromylinresistenzkassette ein 679 bp großes Amplikon und für das Allel ohne Hygromylinresistenzkassette ein 455 bp großes Amplikon.

3.2.1.3 PCR zum Nachweis der Anwesenheit der Flp-Rekombinase in transgenen Mäusen (Flp PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
2,0 µl	25 mM MgCl ₂	60°C	1 min	40
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	2 min	
0,2 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	<i>USP-Flp</i>	25°C	∞	1
0,2 µl	<i>DSP-Flp</i>			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Ein vorhandenes Amplikon zeigt die Anwesenheit der kodierenden Region der Flp-Rekombinase an.

3.2.1.4 PCR zur Erzeugung einer CerS2 Sonde für die CerS2 Southern-Blot Analyse (2_SB Sonde PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
2,0 µl	25 mM MgCl ₂	60°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	100 sec	
0,2 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	Lass2_E2H	25°C	∞	1
0,2 µl	Lass2_Isof_E7			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 1,6 kb, das mit den Restriktionsenzymen Asp718I und BamHI geschnitten wird, wodurch ein 0,4 kb grosses Fragment entsteht. Dieses wird in den mit den gleichen Restriktionsenzymen gespaltenen „pBSK Vektor“ ligiert. Es entsteht der Vektor „E5-E6_pBSK“.

3.2.1.5 PCR zur Erzeugung einer CerS6 Sonde zur Ermittlung der CerS6 Transkriptmenge in CerS2^{gt/gt} Mäusen (CerS6 PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	30 sec	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	61°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	40 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	Lass6 for	25°C	∞	1
0,2 µl	Lass6 rev			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 544 bp bei der Amplifikation der CerS6 Sonde.

3.2.1.6 PCRs zur Erzeugung des Austauschvektors CerS4KILacZ

3.2.1.6.1 Fusions-PCR

Eine Fusions-PCR besteht aus drei PCR Reaktionen. Sie wird verwendet, um zwei Fragmente auf die Base genau miteinander zu verbinden und anschließend zu amplifizieren. In den ersten beiden PCR Reaktionen werden Teilstücke der DNS-Sequenz mit jeweils zwei Oligonukleotidstartermolekülen vervielfältigt. Das Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül der ersten PCR Reaktion sowie das Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül der zweiten Reaktion besteht an seinen Enden aus komplementären Sequenzen. In der dritten PCR Reaktion (Fusions-PCR) lagern sich die gleichen Abschnitte aneinander und werden von der Polymerase jeweils bis zum Beginn bzw. Ende der Sequenz verlängert. Über den Einsatz des Sinnstrang-Oligonukleotidstartermoleküls der ersten PCR Reaktion und des Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermoleküls der zweiten PCR Reaktion wird die komplette Sequenz amplifiziert.

3.2.1.6.2 PCR zur Erzeugung der 5´ und 3´homologen Region des Retrievalvektors

Reaktionsansatz			
	5´HR PCR	3´HR PCR	Fusions-PCR
DNS	1,0 µl	1,0 µl	2,0 µl
ddH ₂ O	16,5 µl	16,5 µl	15,5 µl
5xPCR Puffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
dNTP-Mix	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
4_5´HR_RV_for	0,2 µl	-	0,2 µl
4_5´HR_RV_rev	0,2 µl	-	-
4_3´HR_RV_for	-	0,2 µl	-
4_3´HR_RV_rev	-	0,2 µl	0,2 µl
Phusion	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Polymerase			

Temperatur	Dauer		Zyklen
	5'HR PCR 3'HR PCR	Fusions- PCR	
98°C	30 sec	30 sec	1
98°C	10 sec	10 sec	
62°C	20 sec	20 sec	35
72°C	30 sec	30 sec	
72°C	10 min	10 min	1
25°C	∞	∞	1

Die Größe der amplifizierten DNS-Fragmente beträgt 318 bp bei Amplifikation der 5' homologen Region, 226 bp bei Amplifikation der 3' homologen Region und 538 bp bei Amplifikation des Fusionsprodukts aus der 5' und 3' homologen Region.

3.2.1.6.3 PCR zur Erzeugung des Minitargetingvektors

3.2.1.6.3.1 PCR zur Amplifikation des Fusionsprodukts aus dem Spleissakzeptor und einer Teilsequenz des NLS-LacZ Gens

Reaktionsansatz			
	SA PCR	NLS-LacZ PCR	Fusions-PCR
DNS	1,0 µl	1,0 µl	2,0 µl
ddH ₂ O	16,5 µl	16,5 µl	15,5 µl
5xPCR Puffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
dNTP-Mix	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
	0,2 µl	-	0,2 µl
	0,2 µl	-	-
	-	0,2 µl	-
	-	0,2 µl	0,2 µl
Phusion Polymerase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl

Temperatur	Dauer			Zyklen
	SA PCR	NLS-LacZ PCR	Fusions-PCR	
98°C		30 sec	30 sec	1
98°C		10 sec	10 sec	
62°C		20 sec	20 sec	35
72°C		45 sec	1 min	
72°C		10 min	10 min	1
25°C		∞	∞	1

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 799 bp bei Amplifikation des vor Exon2 liegenden Spleissakzeptors, 977 bp bei Amplifikation einer Teilsequenz des NLS-LacZ Gens und 1741 bp bei Amplifikation des Fusionsprodukts des vor Exon2 liegenden Spleissakzeptors und einer Teilsequenz des NLS-LacZ Gens.

3.2.1.6.3.2 PCR für die Amplifikation der 3' homologen Region des Minitargetingvektors (3'HR Mini PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
5,0 µl	5xPCR Puffer	64°C	30 sec	35
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	1 min	
0,2 µl	3'HR_Mini for	72°C	10 min	1
0,2 µl	3'HR_Mini rev	25°C	∞	1
0,3 µl	Fusions-Polymerase			

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 803 bp bei Amplifikation der 3' homologen Region des Minitargetingvektors.

3.2.1.6.4 PCR für die Amplifikation der verlängerten 3' homologen Region des Testvektors (3'HR Test PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	61°C	1 min	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	160 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	3'HR_Test for	25°C	∞	1
0,2 µl	3'HR_Test rev			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 2,4 kb bei Amplifikation der verlängerten 3' homologen Region des Testvektors.

3.2.1.7 PCR zum Nachweis der Insertion im Intron 1 des *CerS4* Gens im Genom von HM1 (PCR I)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	64°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	1 min	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	CerS4_I1 for	25°C	∞	1
0,2 µl	CerS4_I1 rev			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Ein Amplikon von 700 bp wurde bei der PCR I aus genomischer DNS mit C57BCL/6 erhalten, wohingegen ein 1100 bp großes Amplikon bei der Verwendung aus genomischer DNS mit einem genetischen Hintergrund von HM1 entstand.

3.2.1.8 PCR zum Nachweis der homologen Rekombination von Lass4KILacZ in ES-Zellen (ES-Zell PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
10,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
4,9 µl	ddH ₂ O	94°C	1 min	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	57°C	1 min	35
3,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	130 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	4_Test_for	25°C	∞	1
0,2 µl	4_Test_rev			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Ein Amplikon von 1,8 kb zeigt die homologe Rekombination des Vektors Lass4 KO in HM1 ES-Zellklonen an.

3.2.1.9 PCR zur Erzeugung der 5' Southern-Blot Sonde für die Charakterisierung der ES-Zell Klone (5' Sonde PCR)

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,5 µl	ddH ₂ O	94°C	30 sec	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	57°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	40 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	4_S3 for_EcoRV	25°C	∞	1
0,2 µl	4_S3rev_EcoRV			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Die Größe des amplifizierten DNS-Fragments beträgt 590 bp bei Amplifikation der 5'externen Sonde.

3.2.1.10 PCR zum Nachweis der Deletion der CerS4 kodierenden Region

Reaktionsansatz		Temperatur	Dauer	Zyklen
1,0 µl	DNS	94°C	5 min	1
16,3 µl	ddH ₂ O	94°C	30 sec	
1,5 µl	25 mM MgCl ₂	61°C	30 sec	35
5,0 µl	5xPCR Puffer	72°C	40 sec	
0,3 µl	dNTP-Mix	72°C	10 min	1
0,2 µl	Lass4 geno for	25°C	1 min	1
0,2 µl	NLS-LacZ rev			
0,2 µl	Lass4 geno rev			
0,3 µl	Taq-Polymerase			

Diese PCR liefert für das Wildtyp ein 390 großes Amplikon und für das CerS4KILacZ Allel ein 561 großes Amplikon.

3.3 Herstellung rekombinanter Plasmide**3.3.1 Spaltung doppelsträngiger DNS mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNS an kurzen, palindromischen Nukleotid-Abfolgen, wodurch ein ringförmiges DNS-Molekül linearisiert oder in definierte Fragmente zerlegt wird. Infolgedessen entstehen an den Enden der DNS einzelsträngige 3'- oder 5'-Überhänge oder glatte Doppelstrangenden. Entsprechend den Herstellerangaben werden Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten Puffersystemen bei angegebener Temperatur eingesetzt. Gleichzeitige Spaltung einer DNS-Probe mit mehreren Enzymen ist nur bei kompatiblen Pufferanforderungen möglich, ansonsten muss die Probe vor Behandlung mit jedem neuen Enzym umgepuffert werden. Der Versuchsansatz einer Restriktionsspaltung misst in der Regel 20 µl, in dem 2 µl eines geeigneten 10-fach Puffers, der eine optimale Enzymaktivität unterstützt, 1 µl einer ausgewählten Restriktionsendonuklease und 0,5-2 µg DNS vorliegen. Das restliche Volumen wird ad 20 µl mit sterilem ddH₂O aufgefüllt. Die Inkubationszeit eines Spaltungsansatzes beträgt 1 bis mehrere Stunden.

3.3.2 Modifikationen und Ligation von DNS-Molekülen

3.3.2.1 Auffüllen klebriger Enden (Blunten)

Viele Restriktionsendonukleasen erzeugen bei der Spaltung von DNS-Molekülen 3'- oder 5'-überhängende Enden. Häufig sind die erzeugten Enden von DNS-Fragmenten, die später verbunden werden sollen, nicht kompatibel. In diesen Fällen können die Enden durch Auffüllen (5'-überhängende Enden) mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I aus *E. coli* oder durch Abbau (3'-überhängende Enden) mittels der T4 DNS-Polymerase des Bakteriophagen T4 geglättet werden.

Beim Auffüllen der Enden mit dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I wird der Restriktionsansatz gegebenenfalls in Puffer H oder B (Roche) umgepuffert und mit 1 µl Klenow-Polymerase (1 U/µl) sowie 1 µl dNTP-Mix (2 mM/µl) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Beim Abbau der Enden mit der T4-Polymerase wird der Restriktionsansatz gegebenenfalls in Puffer 2 (NEB) umgepuffert und mit 0,5 µl T4-Polymerase 10 min bei 16°C inkubiert. Das Ansetzen des Restriktionsansatzes erfolgt auf Eis.

Beide Ansätze werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel eluiert (Kap. 3.1.7.1).

3.3.2.2 Dephosphorylierung von Vektorrückgraten

Nach Restriktionsspaltung (Kapitel 3.2.1.1) oder Auffüllen kohäsiver DNS-Strang-Enden (Kapitel 3.3.2.1) befinden sich am 5'-Ende der DNS Phosphatgruppen. Daher kann das Vektorrückgrat während der Ligations-Reaktion (Kapitel 3.3.2.3) auch ohne Insertion des einzuklonierenden Fragments rezirkularisieren und damit ein funktionelles Plasmid bilden (Re-Ligation). Um dies zu vermeiden, werden die freien 5'-Phosphatgruppen mit einer alkalischen Phosphatase aus der Garnele abgespalten. Zu 25 µl aufgereinigter DNS werden 1 µl der Phosphatase (Roche), 3 µl Phosphatasepuffer (Roche) und 1 µl ddH₂O gegeben. Nach 30 min und 1 h Inkubation bei 37°C wird jeweils 1 µl Phosphatase nachgelegt. Danach erfolgt eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 60-75°C. Der Ansatz kann bei -20°C gelagert werden.

3.3.2.3 Ligation von DNS-Fragmenten

Die DNS-Ligation ist ein ATP-abhängiger Prozess, bei dem freie 5'-Phosphatgruppen über Phosphodiesterbindungen mit freien 3'-Hydroxylgruppen verknüpft werden. In einen Ligationsansatz werden zu 1 µl Vektorrückgrat 7 µl Insert-DNS, 1 µl 10-fach Ligase-Puffer

und 1 µl T4-Ligase zugefügt und bei 16°C ü.N. inkubiert. Der inkubierte Ansatz kann anschließend zur Transformation eingesetzt werden. Die Insert-DNS und das Vektorrückgrat werden zuvor aus einer Gelaufreinigung gewonnen.

3.3.2.4 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier DNS in prokaryotische Zellen. Zwei Transformationsmethoden sind dabei möglich: Transformation mit chemisch-kompetenten und elektro-kompetenten Bakterien. Bei den chemisch-kompetenten Bakterien wird die Zellwand der Bakterien durch Schwermetalle porös gemacht, wohingegen bei den elektro-kompetenten Bakterien ein Stromstoß Poren erzeugt. Beide Methoden erleichtern die freie DNS-Aufnahme.

3.3.2.4.1 Herstellung von elektro-kompetenten Bakterien

Die Herstellung von elektro-kompetenten Bakterien sorgt dafür, dass die Salze des LB^o Mediums herausgewaschen werden, da eine Elektroporation salzfrei durchgeführt werden sollte.

5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium werden mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 250 Upm und 37°C inkubiert.

1 ml ü.N.-Kultur wird in 100 ml vorgewärmtes antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Die Kultur wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Bakterien werden im Eiswasser unter Schütteln für 20 min gekühlt. Jeweils 50 ml Kultur in 50 ml Falcons überführen und 10 min bei 4°C mit 2900 g pelletieren. Der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird in 40 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und es folgen Zentrifugationen mit 4000g, 5800g, 7300g und 9000g für 10 min bei 4°C. Zwischen den Zentrifugationsschritten erfolgt das Verwerfen des Überstandes und die Resuspension von 40 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt bei 9000g wird der Überstand verworfen, so dass möglichst wenig Flüssigkeit zurückbleibt. Das Bakterienpellet wird in 200 µl 50 %iger Glycerinlösung resuspendiert. Aliquots mit 26 µl können in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert werden. Beim sofortigen Gebrauch der elektro-kompetenten Bakterien werden Aliquots von 40 µl verwendet. Die Effizienz dieser Bakterien sollte bei etwa 10⁻⁸-10⁻⁹ Kolonien/µg DNS liegen.

3.3.2.4.2 Elektro-Transformation

Für die Elektro-Transformation ist es wichtig, dass die Transformationsansätze komplett salzfrei und enzymfrei sind. Falls sie diesen beiden Kriterien nicht entsprechen, muss für enzymhaltige (meist ein Ligationsansatz) und salzhaltige Ansätze eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Mikrodialyse vorgenommen werden. Bei salzhaltigen Ansätzen genügt die Durchführung einer Mikrodialyse.

Bei der Phenol/Chloroform Extraktion werden 10 µl Wasser sowie 20 µl Phenol/Chloroform zu dem Ligationsansatz hinzugegeben und resuspendiert. Der komplette Ansatz wird bei 13000rpm für 1 min abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und für die Mikrodialyse verwendet.

Bei der Mikrodialyse wird die Dialyse-Membran mit der glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche eines mit VE Wasser gefüllten Becherglases platziert. Die salzhaltige DNS Lösung wird als Tropfen auf die Dialyse-Membran pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wird der DNS haltige Tropfen in ein Reaktionsgefäß überführt und kann zur Elektro-Transformation eingesetzt werden.

Bei der Elektro-Transformation wird ein Aliquot auf Eis aufgetauter elektro-kompetenter Bakterien vorsichtig mit dem entsalzten und proteinfreien Ligationsansatz bzw. einer DNS haltigen Lösung vorsichtig resuspendiert und in den Spalt einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gegeben. Diese Küvette wird in ein Elektroporationsgerät (Mikropulser, Bio-Rad) mit folgender Einstellung gestellt: Programm Bacteria, 1,8kV, 1 Puls, Zeit variable. Nach der Elektroporation wird sofort 1 ml vorgekühltes LB⁰ Medium hinzugefügt und die Bakteriensuspension nach einer vorsichtigen Resuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Bakteriensuspension wird 1 Stunde bei 37°C bzw. 32°C bei 225 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Nach der einstündigen Inkubationszeit werden 100 µl Bakteriensuspension auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die restlichen Bakterien werden bei 8000 rpm für 30 sec pelletiert und der Überstand bis auf einen kleinen Anteil, der für die Resuspension des Pellets notwendig ist, verworfen. Die restliche Bakteriensuspension wird auf einer Selektionsplatte ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C bzw. 32°C im Brutschrank inkubiert.

3.3.2.4.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie des erwünschten Bakterienstammes werden 2,5 ml YT⁺⁺-Medium inokuliert und ü.N. auf dem Schüttler bei 37°C und 225 Upm inkubiert. 50 µl ü.N.-Kultur werden in 5 ml YT⁺⁺-Medium überführt und weitere 90 min bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wird zu 100 ml vorgewärmten YT⁺⁺-Medium gegeben. Die Kultur wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,55 inkubiert, danach auf zwei 50 ml Plastikröhrchen aufgeteilt und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien werden bei 5000 Upm für 5 min und 4°C sedimentiert, die Überstände verworfen. Nach Resuspendierung der Sedimente in 10 ml TFB I im Kühlraum folgt eine 10-minütige Inkubation auf Eis und eine erneute Zentrifugation der Bakterien bei 5000 Upm für 5 min und 4°C mit anschließender Verwerfung der Überstände. Die Sedimente werden im Kühlraum in je 2 ml TFB II aufgenommen und jeweils 100 µl Bakteriensuspensionen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

3.3.2.4.4 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Ein Aliquot auf Eis aufgetauter chemisch-kompetenter Bakterien wird auf den Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 90 sec bei 42°C inkubiert und sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz werden 900 µl LB-Medium gegeben und bei 250 Upm und 37°C für 1 h inkubiert (37°C, 250 Upm). Dies ermöglicht die Ausprägung des auf dem Plasmid kodierten Resistenzgens. Anschließend werden die Bakterien bei 10000 Upm für 10 sec zentrifugiert, 950 µl des Überstandes verworfen, das Bakteriensediment in dem überstehenden Medium resuspendiert und mittels eines Drigalski-Spatels auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden mit der Oberseite nach unten ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach können die Platten bei 4°C gelagert werden.

3.3.3 Rekombineering

Für die Erzeugung des Austauschvektors CerS4KILacZ wurde das Prinzip des Rekombineering verwendet, da die Klonierung auf klassischem Weg aufgrund einer ungünstigen Konstellation von Restriktionsschnittstellen nicht möglich war.

Prinzip

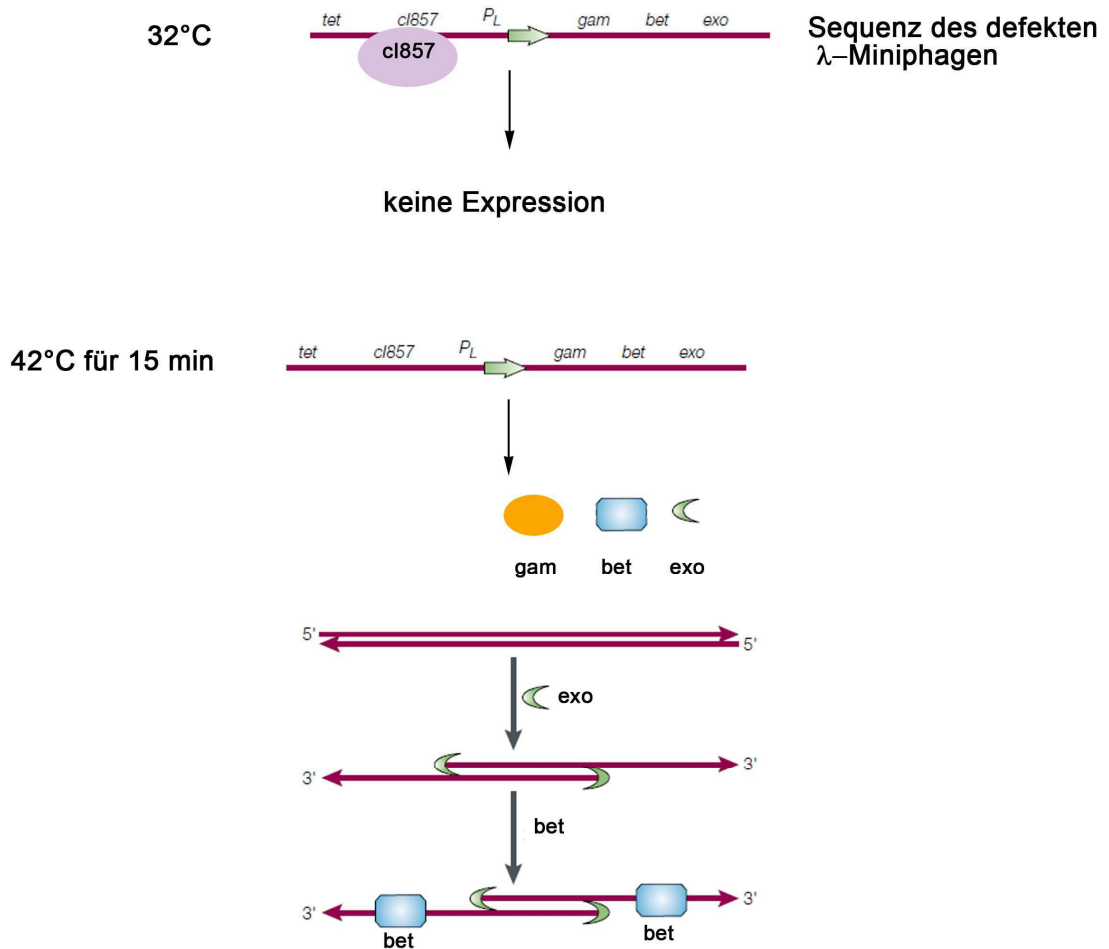


Abb.3.1: Rekombinierung Prinzip (modifiziert nach Copeland et al., 2001). tet bedeutet Tetrazyklinresistenzkassette, P_L Promotor L.

Das Rekombinierung basiert auf der homologen Rekombination in E.coli, wodurch DNS Moleküle wie z.B. BAC Klone verändert werden können. Die homologe Rekombination ist ein Prozess, der Fragmente von DNS zwischen zwei DNS Molekülen austauscht, wodurch eine neue Kombination der DNS entsteht. Beim Rekombinierung wird lineare und zirkuläre DNS verwendet, wobei beide über eine unterschiedliche Resistenzkassette verfügen. Zusätzlich sind zwei Homologien auf beiden DNS-Molekülen enthalten. Beide DNS Moleküle werden in kompetente Zellen elektroporiert, wo zwischen ihnen eine homologe Rekombination stattfinden kann. Die Region zwischen den homologen Bereichen kann entweder ausgetauscht oder eingefügt werden.

Die homologe Rekombination wird durch Phagenproteine vermittelt. Phagenproteine können entweder RecC/RecT aus dem RAC Prophagen oder die Red Proteine aus dem Bakteriophagen Lambda darstellen. Bakteriophagen besitzen keine Elemente für seine Amplifikation mehr und werden daher als defekte λ -Miniphagen bezeichnet. Defekte λ -

Miniphagen sind im E.coli Chromosom des Stamms DY380 integriert. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass defekte λ -Miniphagen aus DH10B+ λ -Miniphagen aus dem Genom ausgeschnitten und anschließend in BAC Bakterien wieder eingeführt werden können. Der λ -Miniphage besteht aus einem Operator, einem Promotor, unter dessen Kontrolle drei Red Gene kodiert werden. Die drei Gene sind *gam*, *bet* und *exo*. Zusätzlich verfügt er über einen temperatursensitiven Repressor, *ci857*. Dieser temperatursensitive Repressor wird bei 32°C gebildet und bindet an den Operator, wodurch verhindert wird, dass es zur Expression der Gene *gam*, *bet* und *exo* führt.

Der Rekombineering Prozess wird mit einem Hitzeschock von 42°C für 15 min eingeleitet. Der temperatursensitive *ci857*-Repressor wird nicht mehr gebildet. Die Gene *exo*, *gam* und *bet* werden exprimiert und schalten somit das Rekombineering an. Das Gen *exo* ist eine 5'-3' Exonuklease, die die doppelsträngige DNS aufwindet, wodurch ein Einzelstrang entsteht. Das Gen *beta* bindet an diesen Überhang und verbindet ihn mit einem einzelnen komplementären Einzelstrang.

Das Gen *gam* verursacht einen Defekt in RecBCD, einer ATP abhängigen Exonuklease, das die Funktion besitzt, die Instabilisierung von „fremden“ Plasmiden hervorzurufen.

Neben dem Bakterienstamm DY380 gibt es Bakterienstämme wie EL250 und EL350, die das Flp- bzw. Cre-Rekombinase Gen an der Stelle der Tetrazyklinresistenzkassette besitzen. Diese Bakterienstämme können verwendet werden, um *frt*- bzw. *loxP*-flankierte Bereiche in Bakterien auszuschneiden.

Durchführung

Beim Rekombineering wird der DY380 Bakterienstamm verwendet, der einen defekten λ Miniphagen enthält oder den Bakterienstamm DH10B, in dem durch eine Transformation ein isolierter λ Miniphage eingebracht werden kann. Die Bakterien werden elektro-kompetent gemacht.

Für das Rekombineering werden die Bakterien nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,6 bis 0,8 im Wasserbad bei 42°C 15 min lang unter Schütte In inkubiert. Es folgt eine Abkühlung der Bakterien unter Schütteln für 20 min im Eiswasser, und der weitere Ablauf folgt der Herstellung von elektro-kompetenten Bakterien.

Zur Aktivierung der Flp- und der Cre-Rekombinase werden die Bakterien nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,4 mit 0,1 % Arabinose für 2 Stunden bei 32°C induziert. Der weitere Ablauf folgt der Herstellung der elektro-kompetenten Bakterien. Alle λ Miniphagen transformierten Bakterien werden bei 32°C inkubiert .

3.3.4 Anlegen von Glyzerinkulturen

Glyzerinkulturen eignen sich für eine längerfristige Lagerung von Bakterien. Dazu werden 800 µl einer bakteriellen ü.N.-Kultur mit 200 µl sterilem 87 % Glycerin versetzt, gründlich gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien können so über 1-2 Jahre bei -70°C gelagert werden. Zur Rekultivierung wird unter sterilen Bedingungen etwas gefrorenes Material von der jeweiligen Glyzerinkultur abgekratzt, zur Vereinzelnung auf einem geeigneten Nährboden ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank ü.N. inkubiert.

3.3.5 Sequenzierung

Zur Ermittlung der Insertionsstelle der „Gene Trap“ Sequenz sowie der Überprüfung der korrekten Verknüpfung der DNS-Fragmente wurde eine Sequenzierung in Auftrag gegeben, die von der Firma Microsynth, Landsberg, durchgeführt wurde.

3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung dient der qualitativen sowie der quantitativen Analyse von Nukleinsäuren. Bei der Auftrennung wandern die Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Netto-Gesamtladung zur Anode. Dabei wirkt die Gelmatrix, die die Nukleinsäuren zu durchwandern haben, als molekulares Sieb, das große Nukleinsäure-Moleküle stärker zurückhält als kleine. Die Größen der aufgetrennten Fragmente lassen sich durch Vergleich mit Molekülen bekannter Länge (Größenstandard) bestimmen.

3.4.1 Native Agarosegel-Elektrophorese von DNS

Für die Auftrennung von DNS im Bereich zwischen 100 bp und 20 kb wird Agarose als Matrix unter nativen Bedingungen verwendet. Je nach zu analysierender Größe der DNS-Fragmente werden Gelkonzentrationen von 0,7–2,0 % hergestellt. Dazu wird Agarose in 0,75-fachen TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Schmelzen gebracht. Die flüssige Agarose Lösung wird bis auf 60°C abgekühlt, mit 0,5 µg/ml E thidiumbromid versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger mit Probenauftragekämmen, die später Geltaschen bilden, gegossen. Nach Aushärtung des Gels kann dieses mit dem Gelträger in eine mit 0,75-fachem TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt werden, so dass das Gel von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt ist. Die mit 6-fachem Ladepuffer versetzten DNS-Proben sowie der Größenstandard werden in die Geltaschen pipettiert. Nach der Elektrophorese lassen sich

die aufgetrennten Banden durch das in die DNS interkalierte Ethidiumbromid, an einem UV-Transilluminator dokumentieren.

3.4.2 Denaturierende Elektrophorese von RNS

Eine denaturierende Gelelektrophorese ist bei Auftrennung von RNS notwendig. Ribonukleinsäuren liegen meist einzelsträngig vor und nehmen bevorzugt energetisch günstige Zustände ein. Diese Sekundärstrukturen, in denen die RNS mit bestimmten Sequenzabschnitten hybridisieren, beeinflussen das Auftrennungsverhalten während der Gelelektrophorese. Daher werden für die Auftrennung der RNS denaturierende Agarosegele verwendet. Für die Herstellung eines 1,4 % Midi-Gels werden 2 g Agarose in 145 ml RNS-ddH₂O in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Ausgleichen des Flüssigkeitsverlusts und anschließender Abkühlung der flüssigen Agarose-Lösung werden 16,7 ml 10-fach Mops-Puffer (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure-Puffer) und 4,2 ml 35 % Formaldehyd hinzugegeben, gemischt und in einen abgeklebten, mit vorbereitetem Kamm bestückten Gelträger gegossen.

Bei der Probenvorbereitung werden 4 µl der RNS-Probe sowie 2 µl des RNS Markers mit jeweils 4 µl Formaldehyd (37%), 11,25 µl Formamid deionisiert, 2,25 µl 10-fach Mops-Puffer und 2,25 µl RNS-Ethidiumbromid (400 µg/µl) versetzt, 10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2,25 µl 6 × RNS-Ladepuffer werden Proben und RNS-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1-fach Mops-Puffer, der alle 30-60 min im Anoden- und Kathodenbereich der Gelkammer durchmischt wird. Die Laufstrecken der ribosomalen RNS (28S = 4,7 kb und 18S = 1,9 kb) und des RNS-Standards werden mit dem UV-Transilluminator dokumentiert.

3.5 Southern-Blot und Northern-Blot Analysen

Unter einem Southern-Blot bzw. einem Northern-Blot wird der Transfer von DNS- bzw. RNS-Molekülen aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran bezeichnet. Die DNS bzw. RNS ist damit immobilisiert und ermöglicht den Nachweis spezifischer Nukleinsäuremoleküle durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde. Geeignet ist dieses Verfahren für den Nachweis von Restriktionsfragmenten nach einer enzymatischen Spaltung genomischer DNS oder für den Nachweis von gesuchten mRNS-Transkripten in Gesamt-RNS, die aus Zellen isoliert wurden.

3.5.1 Transfer von DNS (Southern-Blot Analyse)

Nach einer Aufreinigung genomischer DNS werden 20 µg bzw. 100 ng mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und elektrophoretisch in einem Agarosegel geeigneter Konzentration aufgetrennt (ü.N, 2-3 V/cm²) sowie nach Anlegen eines Fluoreszenzlineals als Größenmass unter dem UV-Transilluminator dokumentiert. Zur Depurinierung der DNS wird das Gel 10 min in Depurinierungs-Lsg. auf einer Wippe bei RT inkubiert. Das Gel wird kurz mit Wasser gespült und 30 min bei RT auf der Wippe in Denaturierungs-Lsg. inkubiert. Zum Aufbau des Blots wird eine Glasplatte quer auf eine mit Denaturierungs-Lsg. gefüllte Melaninschale gelegt. Auf dieser Glasplatte liegen zwei mit Denaturierungs-Lsg. angefeuchtete 3mm-Papiere (Brücke), die an beiden Enden in den Puffer reichen. Auf das 3mm-Papier wird mit den Taschenöffnungen nach unten das Gel gelegt. Auf das Gel wird eine zugeschnittene und mit Denaturierungs-Lsg. befeuchtete Nylonmembran (Hybond-N+) und drei mit Denaturierungs-Lsg. angefeuchtete 3mm-Papiere aufgelegt. Die freie Glasplatte und die Brücke werden mit Parafilm abgedeckt, so dass der Kapillarsog nur durch das Gel und die Membran stattfindet. Der Blot-Aufbau wird mit zwei 15 cm hohen Stapeln Handtuchpapier (Tork) abgeschlossen sowie mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Der Transfer findet ü.N. oder über das Wochenende statt. Anschließend wird bei dem Abbau mit einem Bleistift die Position der Geltaschen auf der Nylonmembran markiert. Die Vollständigkeit des DNS-Transfers wird durch Betrachten des Gels auf dem UV-Transilluminator überprüft. Die Nylonmembran wird für zwei Minuten in 2 x SSC gewaschen, um Gelreste zu entfernen und Salzkristallbildung zu vermeiden, und anschließend eine Stunde bei RT getrocknet. Danach wird die DNS in der Membran durch UV-Bestrahlung quervernetzt und kann bis zum weiteren Gebrauch zwischen zwei Lagen 3mm-Papier bei RT gelagert werden.

3.5.2 Transfer von RNS (Northern-Blot Analyse)

Nach Präparation der Gesamt-RNS aus Gewebe (Kap. 3.1.6) und Auftrennung mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.4.2) wird das Gel zweimal 15 min in 20 x SSC inkubiert, das auch als Transferlösung dient. Der Aufbau des Northern-Blots folgt analog zum Aufbau des Southern-Blots (Kap. 3.5.1). Beim Abbau des Blots wird die Membran kurz in 20-fach SSC gewaschen, bevor sie eine Stunde luftgetrocknet wird. Danach wird die DNS UV-vernetzt und zwischen 3mm-Papier gelagert.

3.5.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Die Herstellung radioaktiver Sonden zum Nachweis genomischer DNS sowie RNS werden mit dem Multiprime Reagenziensatz durchgeführt. 50 ng des DNS-Fragments, welches auf einem Agarosegel eluiert wurde und als Sonde eingesetzt werden soll, werden mit 5 µl Primer-Hexamer-Lösung und entsprechender Menge Wasser auf ein Endvolumen von 36 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 5 min gekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 10 µl Markierungspuffer versetzt, der nicht radioaktives dATP, dGTP und dTTP enthält. Zusätzlich werden 2 µl [^{32}P]-dCTP (10 µCi/µl) und 2 µl Klenow-Polymerase (1 U/µl) zugegeben und der Ansatz 45 min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wird mit 150 µl TE-Puffer verdünnt, auf eine Sephadex G50 Säule gegeben und bei 1000 Upm für fünf min zentrifugiert, wodurch die freien, radioaktiven Nukleotide und kurze Oligonukleotide aus dem Ansatz entfernt werden. Die Markierungsreaktion wird durch Vermessung der jeweiligen Sondenlösung im Szintillationszähler überprüft. Zur Hybridisierung von Nukleinsäuren in Nylonmembranen mit radioaktiven DNS-Sonden wird QuickHyb verwendet. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird durch eine Inkubation der Membran mit Quick-Hyb für 1 h bei 68°C im Rollinkubator erreicht. Nach der Vorhybridisierung wird die durch 5-minütiges Aufkochen hitzedenaturierte, radioaktiv markierte DNS-Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt zwei bis drei Stunden bei 68°C. Durch das Waschen der mit der Sonde inkubierten Membran wird die unspezifisch gebundene Sonde entfernt. Dazu werden die Membranen jeweils zweimal 10 min bei 65°C in 0,1 % SDS-haltigen Lösungen einer absteigenden Salzkonzentration (2 x SSC bis 0,1 x SSC) geschwenkt und die radioaktiven Lösungen ordnungsgemäß entsorgt. Die Abnahme der Radioaktivität an den Membranen wird zwischen den Waschschritten überprüft. Das Einschweissen der Membran in Haushaltsfolie erfolgt, wenn 50 counts auf der Membran nachgewiesen werden können. In der Dunkelkammer wird die Membran auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit des Films liegt zwischen einem Tag bis zu drei Wochen bei -70°C. Die Entwicklung des Röntgenfilms wird in einer Entwicklermaschine durchgeführt.

3.6 Zellkultur

3.6.1 HM1 embryonale Stammzellen der Maus

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Linie HM1 werden aus agoutifarbenen, männlichen Blastozysten des Mausstammes Sv129P2/Ola isoliert (Magin et al., 1992).

Sie benötigen für ihre Kultivierung keine Fibroblasten (*Feeder-Zellen*), sondern wachsen auf

gelatinisierten Kulturschalen in Gegenwart des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF). LIF unterdrückt die Differenzierung der HM1 ES-Zellen, die daher über mehrere Zellpassagen totipotent bleiben.

3.6.1.1 Kultivierung der HM1 ES-Zellen

Die Kultivierung der embryonalen Stammzellen erfolgt in ES-WT-Medium in Heraeus-Inkubatoren mit einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Das Medium wird außer bei geringer Zelldichte täglich gewechselt. Ist eine Konfluenz von etwa 90 bis 95 % erreicht, werden die ES-Zellen durch Trypsinierung und anschließende Ausplattierung in einer Verdünnung von 1:3 passagiert. Für das Trypsinieren der ES-Zellen wird das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit ES-PBS⁻, einmal mit ES-Trypsin gewaschen und anschließend wird 1,5 ml ES-Trypsin zugegeben. Nach 5 min bei 37°C im Brutschrank wird das Trypsin durch Zugabe von ES-Medium inaktiviert, die Zellen gründlich vereinzelt und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 Upm, RT, 5 min) wird das Zellsediment in ES-Medium oder ES-Selektionsmedium aufgenommen und auf gelatinisierte Kulturschalen ausplattiert, in denen frisches ES-Medium vorgelegt ist. Die Gelatinisierung erfolgte zuvor durch eine Inkubation der Kulturschalen mit 0,1 % Gelatine-Arbeitslösung für 10 min. Die Passagenzahl gibt Auskunft über den Kultivierungszeitraum der ES-Zellen und wird auf den Kulturgefäßen notiert.

3.6.1.2 Einfrieren und Auftauen von HM1 ES-Zellen

Zum Einfrieren werden die HM1 ES-Zellen eines konfluent bewachsenen T25-Kolbens nach dem Trypsinieren und Zentrifugieren (800 Upm, RT, 5 min) in 1,5 ml ES-Medium aufgenommen und resuspendiert. Diese Zellsuspension wird mit 1,5 ml ES-Einfriermedium vermischt. Je 1 ml wird in eine beschriftete Ampulle pipettiert und in einem mit Isopropanol (4°C) gefüllten Einfrierbehälter bei -70°C ü.N. langsam eingefroren, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wird. Das Auftauen der HM1 ES-Zellen erfolgt durch zügiges Überführen einer Ampulle aus der Flüssigstickstoffphase in ein 37°C Wasserbad und anschließender Überprüfung der Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen, in dem 9 ml ES-Medium vorgelegt wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt (800 Upm, RT, 5 min) wird das Zellsediment in 5 ml ES-WT-Medium resuspendiert und auf einer gelatinisierten 6 Loch Schale rekultiviert.

3.6.2 Stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen mittels Elektroporation

Die stabile Transfektion von HM1 ES-Zellen erfolgt mit Hilfe der Elektroporation. Dazu werden 300 µg des mithilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) aufgereinigten Austauschvektors eingesetzt (Kap. 3.1.1.3), der durch eine Restriktionsspaltung linearisiert, gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 100 µl endotoxinfreien TE-Puffer aufgenommen wird. ES-Zellen mit möglichst niedriger Passagenzahl werden unter Standardbedingungen kultiviert und bis zur Konfluenz einer T75-Kulturflasche herangezogen, anschließend trypsiniert und die Zellkonzentration der Einzelzellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in HBS-Puffer aufgenommen, so dass in 800 µl 3×10^7 Zellen enthalten sind. Die 800 µl Zellsuspension werden mit dem linearisierten Austauschvektor in 100 µl TE-Puffer vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit 4 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation wird für 0,1 sec bei 3,0 µF und 0,8 kV durchgeführt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT werden die Zellen vorsichtig in 10 ml ES-WT-Medium resuspendiert und in unterschiedlicher Verdünnung auf mehreren 10 cm-Schalen mit 10 ml ES-WT-Medium ausplattiert.

3.6.3 Selektion von HM1 ES-Zellen auf stabile Integration und homologe Rekombination

Die Selektion wird auf Anwesenheit eines Selektionsmarkergens (Neomycin) durchgeführt, indem 24 Stunden nach der Elektroporation das ES-WT-Medium gegen G418-haltiges ES-Selektionsmedium ausgetauscht wird, das alle zwei bis drei Tage gewechselt wird. Nach zehn Tagen der Selektion können die ersten resistenten Klone ausgewählt, vereinzelt und mit ES-WT-Medium kultiviert werden. Beim ersten Passieren der ES-Zellklone von einer 48-Loch- auf eine 24-Loch-Kulturschalenvertiefung wird die Hälfte der Zellsuspension abgenommen, ein Zelllysat hergestellt (Kap. 3.1.3) und die DNS mithilfe der ES-Zell PCR (Kap. 3.2.1.3) auf das Ergebnis der homologen Rekombination analysiert. PCR positive Zellklone werden schrittweise bis hin zu zwei konfluent bewachsenen T25-Kolben expandiert. Die Zellen des einen Kolbens werden zur gegebenenfalls später erfolgenden Blastozysten-Injektion eingefroren, die Zellen des anderen Kolbens auf zwei T25-Kolben weiterkultiviert. Ein Kolben wird zur genomischen DNS-Gewinnung aus embryonalen Stammzellen und anschließender Southern-Blot Analyse eingesetzt, der andere Kolben wird für die Karyotyp-Analyse verwendet.

3.6.4 Karyotyp-Analyse homolog rekombinierter ES-Zellklone

Die Chromosomenzahl lässt sich nur aufgrund der starken Kondensation der DNS während der Metaphase der Mitose besonders gut feststellen. Die Zellen eines konfluenten T25-Kolbens werden durch Inkubation mit 0,1 µg/ml Colzimid für 50 min bei 37°C im Brutschrank in der Metaphase der Mitose arretiert. Die Zellen werden mit PBS⁻ gewaschen, trypsiniert und pelletiert. Das Pellet wird in 1 ml isotonischer KCl-Lösung aufgenommen. Nach Zugabe von weiteren 3 ml isotonischer KCl-Lösung schwellen die Zellen in einer 10-minütigen Inkubation osmotisch an und werden anschließend bei 700 upm für 10 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wird durch Zugabe von eiskaltem, frisch angesetztem Methanol:Eisessig (3:1)-Gemisch resuspendiert. Dieser Vorgang wird insgesamt zweimal wiederholt. Im letzten Zentrifugationsschritt wird das Pellet in 1 ml Methanol:Eisessig (3:1)-Gemisch aufgenommen und mit einer Glaspipette wird die Zellsuspension aus unterschiedlichen Höhen auf Objektträgern getropft.

Die Chromosomen werden mit einer einminütigen Inkubation Giemsa Färbelösung angefärbt und die Färbung durch zweimaliges Waschen mit Leitungswasser differenziert.

Bevor die Chromosomen Anhäufung auf den Objektträger durch Mikroskop ausgezählt werden, werden diese getrocknet und in Entellan eingedeckelt.

3.6.5 Vorbereitung der ES-Zellen für die Blastozysteninjektion

Für die Blastozysteninjektion müssen die homolog rekombinierten HM1 ES-Zellklone in der ES-Zell PCR und der Southern-Blot Analyse positiv sein sowie einen korrekten Karyotyp aufweisen. Die ausgewählten homolog rekombinierten HM1 ES-Zellklone werden aufgetaut (Kap.3.6.1.2), zwei Tage vor der Blastozysteninjektion passagiert und am Tag selbst zweimal in PBS⁻ gewaschen, trypsiniert und gründlich vereinzelt. Nach der Zentrifugation (800 Upm, 5 min, RT) wird das sedimentierte Zellpellet in 0,8 ml Medium aufgenommen und bis zur Blastozysteninjektion auf Eis gelagert.

3.7 Zucht- und Haltungsbedingungen von Versuchsmäusen

Die Mäuse werden in nicht isolierten Tierställen bei einem über das Jahr konstanten Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 / 12 Stunden mit unbeschränktem Zugang zu Futter und Wasser bei einer konstanten Raumtemperatur von 23°C gehalten. Die Tiere werden zweimal wöchentlich in saubere Käfige umgesetzt. Generell werden männliche und weibliche Tiere getrennt gehalten.

3.7.1 Blastozysteninjektion, Uterustransfer und Chimärismusgrad

Die Erzeugung transgener Mäuse aus embryonalen Stammzellen mittels Blastozysteninjektion wird von Nagy A. et al. (2003) beschrieben.

Die ES-Zellen stammen von agoutifarbenen Mäusen ab, so dass zur Unterscheidung C57BL/6 Blastozystenspendertiere mit schwarzer Fellfarbe und albinofarbene NMRI-Empfängertiere verwendet werden. Die mit manipulierten HM1 ES-Zellklonen injizierten Blastozysten werden operativ in den Uterus von scheinchwangeren NMRI-Weibchen implantiert, die die chimären Embryonen austragen und die daraus resultierenden Jungtiere großziehen. Je nach Beteiligung der ES-Zellen an der Entwicklung des manipulierten Embryos resultieren mosaikfarbene chimäre Mäuse. Das Verhältnis von agoutifarbenem zu schwarzem Fell ergibt Auskunft über den Chimärismusgrad einer Maus. Die Isolierung der Blastozysten, die Injektion der manipulierten HM1 ES-Zellklone und der operative Uterustransfer werden von Christine Siegmund durchgeführt.

3.8 Histologische Untersuchungen

Für die Herstellung von X-Gal Färbung von unterschiedlichen Geweben werden CerS2^{+/+}, CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Gehirn, Leber, Niere mit Nebenniere, Thymus, Milz, Hoden, Ischias-Nerv, Haut, Darm und Bauchspeicheldrüse aus den Mäusen entnommen, bis auf die Leber eingefroren und auf Trockeneis bei -80°C gelagert. Das Einfrieren und die Lagerung der Leber erfolgt bei -20°C.

3.8.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die gefrorenen Präparate werden mit Einbettmedium auf dem Objektisch des Gefriermikrotoms fixiert. Die Gewebeschnitte (12 µm) werden bei -20°C Kammertemperatur, einem Schnittwinkel von 10° und einer Objekttemperatur von -19°C hergestellt und auf Objektträger aufgenommen. Diese werden für 30 min bei RT luftgetrocknet, sie sind bei -70°C lagerbar.

3.8.2 X-Gal Färbung von unterschiedlichen Organen der CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäuse

Die Expression des *LacZ*-Reportergens wird in unterschiedlichen Organen der CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäuse durch X-Gal-Färbung sichtbar gemacht. Als Kontrolle werden die CerS2^{+/+} Mäuse verwendet. Durch die Aktivität der β -Galaktosidase wird das farblose Substrat X-Gal

(5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) in das blaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo umgewandelt, was zu einer Blaufärbung der unterschiedlichen Zelltypen im Gewebe führt. Die Kryoschnitte werden mit 0,4 % Glutaraldehyd in PBS⁻ 10 min bei RT fixiert und anschließend dreimal für 10 min mit PBS⁻ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die LacZ-Substratlösung hinzugegeben und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Färbung wird durch zweimaliges Waschen mit PBS⁻ abgestoppt. Nach dem letzten Waschschrift werden die Objektträger an der Luft getrocknet und mit Entellan eingedeckelt. Nach Trocknung des Entellans werden die Objektträger unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert.

3.8.3 Histologische Analyse der Leber, Niere und Gehirn von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen

Die histologische Analyse der Leber, Niere und des Gehirns von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen wurde von Prof. Dr. Dieter Hartmann durchgeführt. Die Analysen der Lichtmikroskopie sowie der Transmission Elektronenmikroskopie beruhen auf Semidünnschnitten. Die Mäuse werden mit Chloroform betäubt und anschließend durch eine Ganzkörperperfusion mit entweder 6 % Glutaraldehyd in Sörensen Phosphatpuffer oder mit Karnovsky Lösung fixiert, die aus 2 % Glutaraldehyd und 2 % PFA in Sörensen Phosphatpuffer besteht. Leber, Niere, Gehirn und der Trigemini-Nerv von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen werden präpariert und im gleichen Fixativ mindestens ü.N. nachfixiert. Nach der Nachfixierung wird das Gewebe in Phosphatpuffer gewaschen und die gewünschte Region zu einer Größe von 2x3x1 mm mit einem Leica Vibratom oder direkt zugeschnitten. Die gewünschten Regionen werden mit 2 % Osmiumtetroxid nachfixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Epon 812/Glycidether eingebettet. Semidünnschnitte werden von 1 μ m angefertigt, doppelt angefärbt mit Toluidin Blau und Pyronin G oder mit p-Phenylenediamin und auf einen Aminosilan beschichteten Objektträger aufgezogen und eingedeckelt. Nach dem Trocknen werden die Objektträger mikroskopiert und fotografiert. Nach Einschätzung der Schnitte per Lichtmikroskopie werden die Epon Blöcke solange getrimmt bis sie den gewünschten Bereich von 1mm² erreicht haben und Schnitte von 70 nm Dicke hergestellt werden können. Die Schnitte werden auf ein 300 bzw. 100 Maschenkupfernetz gebettet, anschließend mit Uranylacetat und Tripleidicitrat kontrastiert. Die Analyse findet unter einem Elektronenmikroskop statt.

3.9 Proteinpräparation

3.9.1 Herstellung von Gehirnlysaten

Die Gewebe werden den durch zervikale Dislokation getöteten Mäusen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss werden die Gehirne in einem Homogenisierungspuffer und mit einem Ultraschallstab homogenisiert. Die Homogenate werden 5 min bei 13000 und 4°C abzentrifugiert, und der Überstand wird weiter für die Proteinbestimmung und die Immunoblot Analyse verwendet.

3.9.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach der „Bichinonic Acid Kit for Protein Determination“, die nach den Angaben der Firma durchgeführt wird.

3.9.3 Immunoblot Analyse

3.9.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung. Die Proteine unterscheiden sich neben ihrer molekularen Masse in ihrer pH-Wert-abhängigen Nettoladung und in ihrer Konformation. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ist jedoch erst möglich, wenn diese mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergenz behandelt werden. SDS lagern sich an die hydrophoben Aminosäuren an, wodurch die Eigenladung der Proteine vernachlässigt werden kann. Durch den Zusatz von β -Mercaptoethanol werden inter- und intramolekulare Disulfidbrücken reduziert. Das denaturierte Proteingemisch wird auf eine Gelmatrix aufgetragen, die in zwei Bereiche geteilt werden kann: Sammelgel und Trenngel. Sie unterscheiden sich in ihrer Porengröße und des pH-Wertes. Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese erreicht die Fokussierung der Proteine in scharfe Banden.

Bei der Anlegung eines elektrischen Felds wandern die Chloridionen aufgrund ihrer Größe und ihrer negativen Ladung als Leitonen vor dem SDS-Protein-Komplex. Die Glyzin-Moleküle liegen bei einem pH-Wert von 6,8 als Zwitterionen mit einer Nettoladung von Null vor und bilden somit die Folgeionen des SDS-Protein-Komplexes.

Beim Eintritt in das kleinporeige Trenngel (pH 8,8) werden aufgrund der pH-Änderung die SDS-Proteinkomplexe vom negativ geladenen Glycerin überholt und die SDS-Proteinkomplexe können sich nach ihrer Größe auftrennen.

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele in einem Gelgießstand (Amersham Biosciences) wird erst ein 15 % Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wird das Isopropanol verworfen und das Sammelgel gegossen, in das der Auftragekamm eingesetzt wird. Nach Polymerisierung des Sammelgels wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Pufferkammern mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben werden mit 4 x Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Neben dem aufgekochten mit 4 x Laemmli versetzten Proteinlysats wird auf das Gel ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei 20 mA statt.

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (15 %)
Arcylamid	1,3 ml	9,3 ml
Trenngelpuffer	-	6,2 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-
Wasser	6,2 ml	9,4 ml
APS	100,0 µl	300,0 µl
TEMED	10,0 µl	30,0 µl

Tab. 3.1: Zusammensetzung von zwei Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.

Bei der Immunoblot Analyse werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort einzelne Proteine immunologisch nachgewiesen. Nach der Gelelektrophorese wird ein „Sandwich“ aus angefeuchteten Schaumstofflappen, 3mm-Papier, Polyacrylamid, Hybond-ECL Nitrozellulose-Membran, 3mm-Papier und Schaumstofflappen aufgebaut. Dieser „Sandwich“ wird mithilfe zweier gelöcherter Plastikplatten zusammengepresst und in die mit Transferpuffer gefüllte Elektroblokkammer gesetzt. Dabei ist die Nitrozellulosemembran zur Anode orientiert. Der Proteintransfer erfolgt rührend bei 4°C und einer Spannung von 100 V für 1:20 h.

3.9.3.2 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Zum Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wird die Membran für 1 Stunde mit 1xRotiBlock-Lösung zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen bei RT inkubiert. Es folgt eine Inkubation des ersten Antikörpers, der in 1xRotiBlock verdünnt ist, bei 4°C ü.N. unter ständigem Drehen der Membran. Anschließend wird die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer zur Entfernung des unspezifisch gebundenen Antikörpers gewaschen. Die Membran wird mit dem in Blockpuffer verdünnten Sekundäantikörper für 1 h bei RT inkubiert und anschließend die unspezifisch gebundenen Antikörper abgewaschen (2 x 5 min, 2 x 10 min, RT). Chemilumineszenz-Lösung wird frisch aus zwei unterschiedlichen Lösungen im Verhältnis 1:1 angesetzt und anschließend die Membran in

dieser Lösung für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Membran wird zwischen Folie in eine Filmkassette gelegt und ein RX-Film (Fuji) exponiert. Zur Regeneration der Membran für weitere immunologische Nachweise wird die Membran zweimal in Waschpuffer geschwenkt und anschließend Restore™ Western-Blot Stripping Kit der Firma Pierce nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.10 Lipidanalytik

3.10.1 Ceramidsynthase Aktivitätstest

Der Ceramidsynthase Aktivitätstest wurde von PD. Dr. Matthias Eckhardt durchgeführt. Für die Messung der Ceramidsynthase Aktivität werden zunächst die Membranen aus Leber und Gehirn isoliert. Leber und Gehirn von 10 Wochen alten CerS2^{+/+} und CerS2^{g/gt} Mäusen werden im 20 mM HEPES-KOH homogenisiert, bei 960g zentrifugiert, wovon der Überstand nochmals bei 100000 g für 1 Stunde zentrifugiert. Die Membranfraktionen werden aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration der Membranfraktion wird mit dem Bio-Rad DC Proteintest bestimmt. Der Ceramidsynthase Aktivität wird mit kleinen Abweichungen nach Hirschberg et al. (1993) und Lahiri et al. (2007) gemessen. Membranen werden mit 20 µM D-Erythrodihydrosphingosin, 20 µM BSA ohne Fettsäuren und 50 µM Acyl-Coenzym A für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 3 Volumen Chloroform/Methanol im Verhältnis 1:2 abgestoppt, die Lipide werden nach Bligh (1959) extrahiert und auf einer HPTLC-Platte mit Laufmittel Chloroform/Methanol/Essigsäure (190/9/1) aufgetrennt. Die Lipide werden durch einen Bioimager Screen sichtbar gemacht, wodurch Ceramid von der Platte abgekratzt werden kann und im Szintillationszähler vermessen wird.

3.10.2 Lipidanalyse über Dünnschichtchromatographie

Zur Analyse von Phospholipiden, Triacylglycerin, neutralen- und sauren Sphingolipiden werden die Gewebe homogenisiert, anschließend erfolgt eine Extraktion der Lipide. Nach der Extraktion kann der komplette Lipidextrakt durch eine Folch-Verteilung entsalzt und somit mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden. Zur Analyse der neutralen und sauren Sphingolipide müssen die Phospholipide durch eine alkalische Hydrolyse zerstört werden. Anschließend erfolgt die Entsäuerung des Extraktes über eine RP-18 Säule. Die Trennung der neutralen und sauren Sphingolipide erfolgt über die DEAE-Anionenaustauschchromatographie, wonach eine weitere Entsäuerung über die RP-18 Säule erfolgt.

3.10.2.1 Homogenisierung

Für die Lipidaufreinigung werden Niere, Gehirn und Leber aus der Maus entnommen und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Vor der Homogenisierung werden die Gewebe gewogen (Feuchtgewicht) und in Precelly Röhrchen überführt. Die Homogenisierung erfolgt bei 3x10 sec bei 5000 rpm bei RT. Leber und Niere werden aufgrund ihres hohen Blutgehalts lysophilisiert. Das Lysophilisat wird abgewogen (Trockengewicht).

3.10.2.2 Lipidextraktion

Für die Lipidextraktion werden jeweils 100 mg Gewebe in Schraubkappengläsern gefüllt und mit 1,6 ml Wasser, 4 ml Methanol und 2 ml Chloroform versetzt. Die Extraktion der Lipide erfolgt anschließend über 24 h rührend bei 37°C. Zur Abtrennung unlöslicher Gewebebestandteile werden die Proben nachfolgend zunächst 20 min bei 3200 g zentrifugiert. Der Überstand wird unter Stickstoffstrom eingedampft. Das Pellet wird mit 1,6 ml Wasser, 4 ml Methanol und 2 ml Chloroform versetzt, vermischt und wiederum über Nacht rührend bei 37°C inkubiert. Nach der Abtrennung unlöslicher Gewebebestandteile wird der Überstand in das vorher verwendete Schraubkappenglas überführt und das Pellet mit 8 ml Methanol/Chloroform (1:1) versetzt und über Nacht rührend bei 37°C inkubiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Gewebebestandteile wird der Überstand in das Schraubkappenglas mit den zuvor eingedampften Lipidüberständen überführt und wieder durch einen Stickstoffstrom eingedampft.

3.10.2.3 Lipidaufarbeitung

3.10.2.3.1 Alkalische Hydrolyse

Für die alkalische Hydrolyse werden die eingedampften Lipidextrakte in 5 ml Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und durch einen Tischrüttler vermischt. Nach 5-minütiger Behandlung im Ultraschallbad erfolgt die Zugabe von 125 µl einer 4 M Natriumhydroxidlösung. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit rührend bei 37°C im Wasserbad werden die Proben mit 20 µl Eisessig neutralisiert und im Stickstoffstrom eingedampft. Die Entsalzung der Probe erfolgt wie in Kap. 3.10.2.4 beschrieben.

3.10.2.3.2 DEAE-Anionenaustauschchromatographie

Die DEAE-Anionenaustauschchromatographie dient der Trennung von sauren und neutralen Lipiden. Für die Durchführung der DEAE-Anionenaustauschchromatographie wird DEAE-Sepharose von der Chloridform in die Acetatform überführt. Dazu wird die DEAE-Sepharose auf einem Filterpapier in einem Büchnertrichter nacheinander mit Methanol und Wasser gewaschen. Anschließend wird das Säulenmaterial mit einer 1 M Natriumacetat-Lösung gewaschen bis im Silbernitrat-Nachweis kein Chlorid mehr nachweisbar ist. Die Acetatform der DEAE-Sepharose wird mit Wasser und Methanol gründlich gewaschen. Das Säulenmaterial wird als eine 1:1 Suspension in Methanol bei 4°C gelagert.

Für die DEAE-Anionenaustauschchromatographie müssen die eingedampften Lipide in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/ Wasser (3:7:1) aufgenommen, gut gemischt und anschließend 5 min im Ultraschallbad behandelt werden.

Für die DEAE-Anionenaustauschchromatographie wird 2 ml DEAE-Sepharose-Suspension in eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette gefüllt und mit 1 ml Methanol gewaschen. Anschließend wird die Säule mit 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (3:7:1) äquilibriert. Die gelösten Lipide werden auf die Säule aufgetragen. Ein Schraubkappenglas fängt unter der Säule die neutrale Lipidfraktion auf. Zur Entfernung möglichst aller Lipide wird das Schraubkappenglas je 2 ml mit dem selben Lösungsmittel gespült und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Zur Elution der neutralen Lipide wird die Säule mit 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (3:7:1) gewaschen. Nach dem Leertropfen der Säulen wird ein neues Schraubkappenglas unter die Säule gestellt und die anionischen Lipide mit 8 ml Chloroform/Methanol/0,8 M wässriger Ammoniumacetat-Lösung (3:7:1) eluiert. Die Eluate werden im Stickstoffstrom bei 37°C eingedampft und die Proben nochmals entsalzt (Kap. 3.10.2.4.1)

3.10.2.4 Entsalzung der Lipidextrakte

3.10.2.4.1 Entsalzung über RP-18

Das RP-18 Säulenmaterial wird vor der Verwendung mehreren Waschschritten unterzogen. Es wird in 2 Volumen Chloroform/Methanol 2:1 resuspendiert und 30 min gerührt, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 4°C. Der Überstand wird verworfen, und es folgen vier Waschschriffe mit 2 Volumen Methanol, die jeweils 30 min gerührt und 20 min auf Eis inkubiert werden, wonach der Überstand wieder verworfen wird. Das RP-18 Säulenmaterial wird in 1 Volumen Methanol aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Für die Herstellung der RP-18 Säule wird 2 ml der RP-18 Suspension in eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette gefüllt und zweimal mit 1 ml Chloroform/Methanol/200mM Natriumacetat im Verhältnis 3:48:47 gewaschen.

Für die Beladung der RP-18 Säule wird die eingedampfte Lipidfraktion in 1 ml Methanol gelöst und 5 min im Ultraschall sonifiziert. Nach Zugabe von 1 ml 300mM Natriumacetat wird die Säule mit der Lipidlösung beladen. Das Schraubkappenglas wird mit je 0,5 ml Methanol/200 mM Natriumacetat (1:1) gewaschen und auf die Säule gegeben. Nach der Beladung der Säule wird die RP-18 Säule sechs Mal mit 1 ml Wasser gewaschen. Nach dem Leertropfen werden die Lipide von der RP-18 Säule in ein neues Schraubkappenglas eluiert. Zunächst wird 1 ml Methanol auf die Säule gegeben. Dabei werden 60 % der Lipide eluiert. Anschließend werden acht Mal je 1 ml Chloroform/Methanol auf die Säule gegeben. Das Eluat wird im Stickstoffstrom eingedampft. Für die DEAE-Anionenaustauschchromatographie wird die eingedampfte Lipidfraktion in 1 ml Methanol gelöst. Zum Auftragen der Lipidlösung auf eine Dünnschichtchromatographie wird die Lipidfraktion in 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) gelöst. Die Proben können bei -80°C gelagert werden.

3.10.2.4.2 Folchextraktion

Bei der Folchextraktion wird die eingedampfte Lipidfraktion in 2 ml Methanol, 2 ml Chloroform und 0,8 ml Wasser gelöst. Für die Phasentrennung wird die Lipidlösung für 30 min bei 3500 g bei 4°C zentrifugiert. Die untere Phase wird in ein neues Schraubkappenglas überführt und im Stickstoffstrom eingedampft.

3.10.2.5 Dünnschichtchromatographie

Die Lipidlösungen der unterschiedlichen Organe von den CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen werden dünnschichtchromatographisch analysiert. Dazu werden die Lipide in 1ml Chloroform/Methanol 1:1 gelöst. Die Volumina, die die gleiche Menge an Feuchtgewicht besitzen (Tab. 3.1), werden durch ein Probenauftragegerät (Linomat V) auf 10 cm x 10 cm große HPTLC-Platten aufgetragen. HPTLC-Platten werden in einer horizontalen Laufkammer entwickelt. Dazu wird die Kammer mit dem entsprechenden Laufmittel befüllt (Tab. 3.2) und die HPTLC-Platte mit der beschichteten Seite nach unten hineingelegt. Die Dünnschichtchromatographie wird nach einer 15-minütigen Sättigungsphase gestartet. Die Dünnschichtchromatographie ist beendet, wenn die Lauffront die obere Kante der HPTLC-Platte erreicht hat. Nach Beendigung der Dünnschichtchromatographie wird die Platte an der Luft getrocknet.

Organe	Lipidart	mg Feuchtgewicht
Gehirn	neutrale Sphingolipide	5 mg
	anionische Sphingolipide	10 mg
	Triacylglycerin	10 mg
	Phospholipide	6 mg
Leber	neutrale Sphingolipide	21 mg
	anionische Sphingolipide	21 mg
	Triacylglycerin	1 mg

Tab. 3.2: Aufgetragene Lipid-Mengen pro Bahn auf eine HPTLC-Platte.

Zusätzlich sollen sogenannte Standard-Dünnschichtchromatographien durchgeführt werden, wobei neben der aus Organen gewonnenen Lipidlösung einzelne Standardsubstanzen aufgetragen werden, die zur Identifizierung der einzelnen Lipide dient.

Lipid	Laufmittel	(v/v/v)
Neutrale Sphingolipide	Chloroform/Methanol/0,22% CaCl ₂	60:35:8
Sphingolipide	Chloroform/Methanol/Wasser	60:25:4
anionische Sphingolipide	Chloroform/Methanol/0,22% CaCl ₂	55:45:10
Phospholipide	Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser	30:20:2:1
Triacylglycerin	n-Hexan/Diethylether/Eisessigsäure	70:30:5

Tab. 3.3: Verwendete Laufmittel.

3.10.2.6 Visualisierung

Zur Visualisierung der neutralen und sauren Sphingolipide sowie des Triacylglycerins werden die getrockneten Dünnschichtplatten durch zweimaliges Eintauchen in Phosphorsäure/Kupfersulfat eingetaucht und anschließend durch Erhitzen für 10-15 min bei 180°C gefärbt. Alle Lipide erscheinen als schwarz-b raune Bande auf der HPTLC-Platte.

Zur Visualisierung der Phospholipide wird in einem Molybdän-Reagenz gefärbt und anschließend für 10-15 min auf 120°C erhitzt. Die Lipide erscheinen als blaue Banden auf einem weissen Hintergrund, die schnell nachdunkeln. Die Dünnschichtplatten werden als jpeg-Dateien eingescannt.

3.10.3 Myelin Präparation und Lipid Analyse von Sphingolipiden im Myelin und dem Ischias-Nerv über die Dünnschichtchromatographie

Die Aufreinigung des Myelins sowie die Dünnschichtchromatographie des Myelins und Ischias-Nervs wurden von PD. Dr. Matthias Eckhardt und Dr. Hany Farwanah durchgeführt. Die Myelinaufreinigung wird nach Norton und Poduslo (1973b) durchgeführt. Gehirne von CerS2^{+/+}, CerS2^{+/-gt} und CerS2^{gt/gt} Mäusen werden in 10,5 % Saccharose homogenisiert und anschließend in einen Saccharose Gradienten (10,5 % - 30 %) zentrifugiert. Da Myelin eine

geringe Dichte besitzt als die zellulären Membranen sammelt sich das Myelin in der Interphase des Saccharose Gradienten. Das isolierte Myelin aus der Interphase wird dreimal mit Wasser gewaschen, um die Saccharose zu entfernen, und anschließend lysophilisiert. Die Lipide aus dem Myelin und dem Ischias-Nerv von CerS2^{+/+}, CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäusen werden extrahiert, alkalisch hydrolysiert und anschließend mit einer Folch-Extraktion aufgereinigt. Die Lipide werden anschließend über Dünnschichtchromatographie mit einem Laufmittel Chloroform/ Methanol/ Wasser (70:30:4) analysiert.

3.10.4 Lipidanalyse über Massenspektroskopie

Die Massenspektroskopien der Sphingolipide von Leber, Niere und Gehirn von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen wurden von Dr. Hany Farawanah und Prof. Dr. Roger Sandhoff durchgeführt. Die Lipide werden nach Kap. 3.10.2 isoliert. Die Messungen wurden, wie es in Jennemann et al., 2007 beschrieben ist, in einem Triple Quadrupole Instrument durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von CerS2 „Gene Trap“ Mäusen

Die CerS2 „Gene Trap“ Mäuse wurden aus kommerziellen CerS2 „Gene Trap“ ES-Zellen erzeugt, die in Blastozysten durch Christine Siegmund injiziert wurden, wodurch fünf Chimären hervorgingen (Silke Imgrund, Diplomarbeit, 2007; siehe Abb. 1.8.1.2).

4.1.1 Charakterisierung der CerS2 „Gene Trap“ Mäuse mittels PCR, Southern-Blot und Northern-Blot Analyse

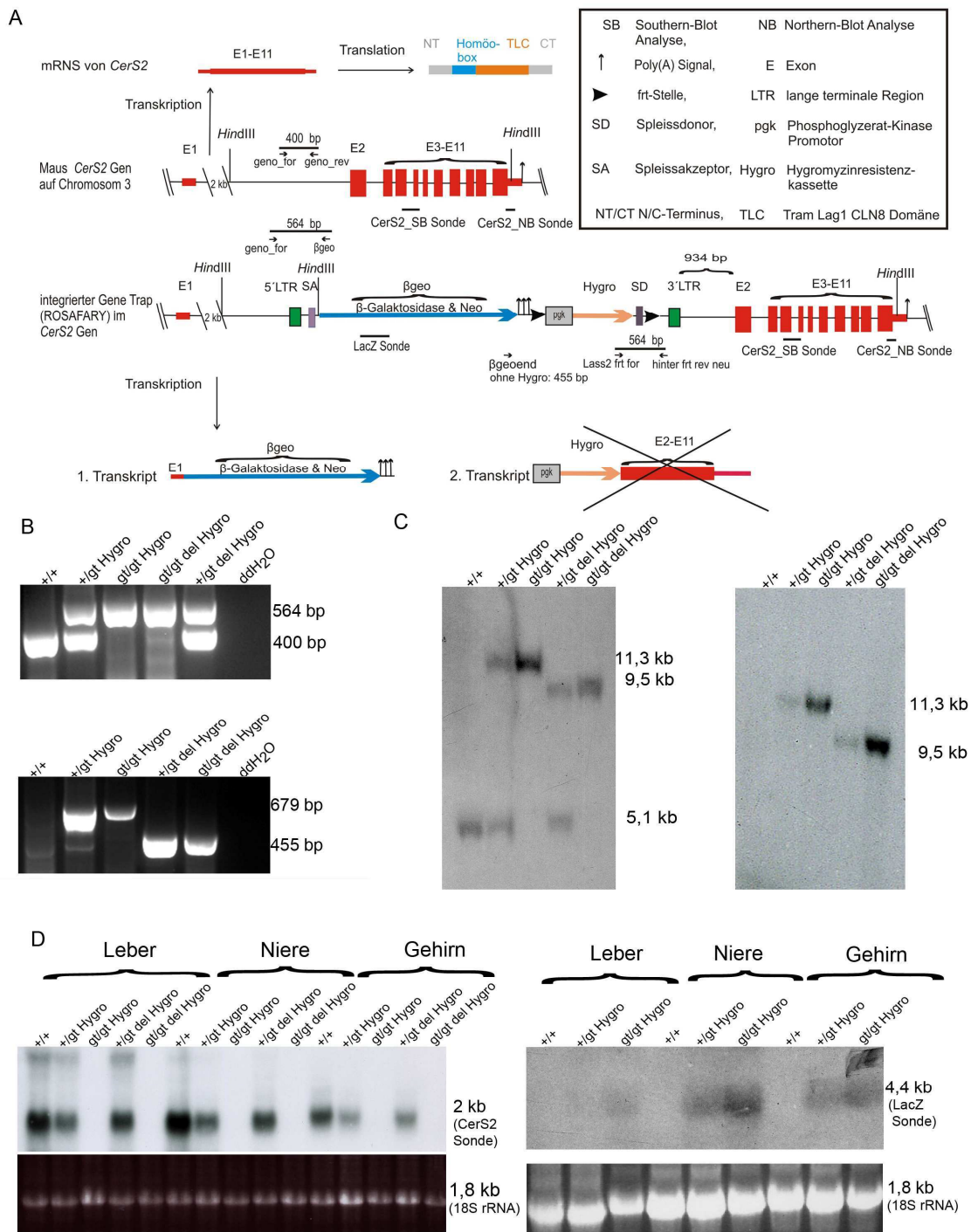


Abb. 4.1: Erzeugung der CerS2 „Gene Trap“ Mäuse: A Schematische Darstellung des Wildtyp und des „Gene Trap“ Locus in ES-Zellen für die Erzeugung der CerS2 defizienten Mäuse. Der „Gene Trap“ ROSAFARY war im Intron1 des *CerS2* Gens integriert.

B β geo und Hygro PCR Analyse von $CerS2^{+/+}$ (+/+), $CerS2^{+/gt Hygro}$ (+/gt Hygro), $CerS2^{+/gt del Hygro}$ (+/gt del Hygro), $CerS2^{gt/gt Hygro}$ (gt/gt Hygro) und $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ (gt/gt del Hygro) genomischer Schwanzspitzen DNS. Bei der β geo PCR ergab die *CerS2* spezifische Oligonukleotidstartermolekül-Kombination ein 400 bp großes Amplikon für das *CerS2* Wildtyp Allel und ein 564 bp großes Amplikon für das *CerS2* „Gene Trap“ Allel. Bei der Hygro PCR resultierte aus der spezifischen Oligonukleotidstartermolekül-Kombination ein 697 bp großes Amplikon für das *CerS2* „Gene Trap“ Hygro Allel und ein 455 bp großes Amplikon für das *CerS2* del Hygro „Gene Trap“ Allel. **C** Southern-Blot Hybridisierung von *HindIII* gespaltener $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt Hygro}$, $CerS2^{+/gt del Hygro}$, $CerS2^{gt/gt Hygro}$ und $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ genomischer DNS aus der Leber, bei der eine externe *CerS2*_SB Sonde und eine LacZ Sonde verwendet wurden. Bei der Hybridisierung mit der externen *CerS2* Sonde zeigte das 5,1 kb große Fragment das *CerS2* Wildtyp Allel, das 11,3 kb große Fragment das *CerS2* „Gene Trap“ Allel mit Hygromylinresistenzkassette (gt/gt Hygro) und das 9,5 kb große Fragment das *CerS2* „Gene Trap“ Allel ohne Hygromylinresistenzkassette (gt/gt del Hygro) an. Bei der Hybridisierung mit der LacZ Sonde zeigte sich, dass der „Gene Trap“ nur einmal im Mausgenom integriert hat.

D Northern-Blot Analyse von $CerS2^{+/+}$ (+/+), $CerS2^{+/gt Hygro}$ (+/gt Hygro), $CerS2^{+/gt del Hygro}$ (+/gt del Hygro) und $CerS2^{gt/gt Hygro}$ (gt/gt Hygro), $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ (gt/gt del Hygro) RNA isoliert aus Leber, Niere und Gehirn. Die *CerS2*_NB Sonde wies ein Transkript von 2048 bp theoretischer Länge nach. Die LacZ Sonde detektierte ein Transkript von 4,4 kb Länge. Die 18S rRNA wurde als Ladekontrolle verwendet.

Die Chimären wurden mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Nur die Chimäre mit einem Chimärismusgrad von 50% (Silke Imgrund, Diplomarbeit, 2007) gebar heterozygote Nachkommen ($CerS2^{+/gt Hygro}$) mit brauner Fellfarbe, die untereinander verpaart wurden, so dass homozygote Nachkommen geboren wurden. Diese Nachkommen wurden als $CerS2^{gt/gt Hygro}$ bezeichnet. Aus Zeitgründen wurden diese Nachkommen mit einem C57BL/6-Gehalt von 50% für die nachfolgenden Analysen verwendet. Desweiteren führten Verpaarungen von heterozygoten Mäusen ($CerS2^{+/gt Hygro}$) mit deleter Flp Mäusen zu Tieren mit einem Genotyp $CerS2^{+/gt del Hygro}$:Flp. Diese wurden wieder untereinander verpaart, wodurch Mäuse mit dem Genotyp $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ entstanden.

Die Charakterisierung dieser Mäuse erfolgte mit der DNS aus Schwanzspitzen-Biopsien mit der β geo und Hygro PCR. Die β geo PCR wies die Integration des „Gene Traps“ in das Intron1 des *CerS2* Gens nach, wohingegen die Hygro PCR den Verlust der *frt*-flankierten Hygromylinresistenzkassette nachwies (Abb. 4.1 A). In der β geo PCR waren die Sinnstrang- und Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermoleküle β geo_for und β geo_rev im Intron 1 lokalisiert, wohingegen das Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül β geo_rev

zwischen der Sequenz der 5'LTR (lange terminale Region) und der Sequenz des Spleissdonors hybridisierte. Es entstand bei einem $CerS2^{+/gt Hygro}$ bzw. einem $CerS2^{+/gt del Hygro}$ Tier ein 400 bp großes Amplikon für das Wildtyp Allel und 564 bp großes Amplikon für das „Gene Trap“ Allel. In der Hygro PCR befand sich das Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül βgeo end im 3'Ende der Sequenz des Fusionsproteins βgeo , das erste Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül $CerS2$ frt for lagerte sich am 3'Ende der Sequenz der Hygromylinresistenzkassette, das zweite Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül hinter frt rev neu hinter der zweiten frt Sequenz der Hygromylinresistenzkassette an. Es entstand bei einer $CerS2^{+/gt Hygro}$ bzw. $CerS2^{gt/gt Hygro}$ Maus ein 679 bp großes Amplikon und bei einer $CerS2^{+/gt del Hygro}$ bzw. $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ Maus ein 455 bp großes Amplikon. In einer $CerS2^{+/+}$ Maus wurde kein Amplikon gebildet (Abb. 4.1 B).

Für die Southern-Blot Hybridisierung wurde genomische Leber-DNS mit dem Restriktionsenzym *HindIII* gespalten, elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran übertragen (Abb. 4.1 C). Zur Bestätigung der Insertion des „Gene Traps“ im $CerS2$ Locus wurde eine externe $CerS2_SB$ Sonde verwendet, die der Sequenz von Exon5-Exon7 des $CerS2$ Gens entsprach. Das Wildtyp Allel wurde nach der Hybridisierung durch ein 5,1 kb großes Fragment, das „Gene Trap“ Allel durch ein 11,3 kb großes Fragment nachgewiesen. Durch Deletion der Sequenz der Hygromylinresistenzkassette durch die Flp-Rekombinase verkürzte sich das Fragment auf 9,5 kb. Zum Ausschluss einer Mehrfachinsertion des „Gene Traps“ in das Mausgenom wurde eine Southern-Blot Hybridisierung mit einer LacZ Sonde durchgeführt, die in der Sequenz des Fusionsproteins βgeo hybridisierte. In $CerS2^{+/+}$ Mäusen konnte kein Fragment nachgewiesen werden. In $CerS2^{+/gt Hygro}$ und $CerS2^{gt/gt Hygro}$ Mäusen konnte ein 11,3 kb großes Fragment detektiert werden, wohingegen in den Hygromylinresistenzkassette deletierten Mäusen ein 9,5 kb großes Fragment nachgewiesen wurde. Zur Bestätigung der Zerstörung des $CerS2$ Gens durch die Insertion des „Gene Traps“ wurde eine Northern-Blot Hybridisierung mit RNS aus Leber, Niere und Gehirn von $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt Hygro}$, $CerS2^{gt/gt Hygro}$ sowie $CerS2^{+/gt del Hygro}$ und $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ Mäusen durchgeführt (Abb. 4.1 D-E). Es wurden zwei Sonden verwendet, eine $CerS2_NB$, die der Sequenz von Exon 11 und dem 3'UTR entsprach, und eine LacZ Sonde, die einen Teil der Sequenz des Fusionsproteins βgeo abdeckte. Das $CerS2$ Wildtyp Transkript von 2 kb konnte in der Leber, Niere und im Gehirn nachgewiesen werden. In der Leber, Niere und im Gehirn von $CerS2^{gt/gt Hygro}$ und $CerS2^{gt/gt del Hygro}$ Mäusen wurde kein $CerS2$ Transkript gefunden. Unter Berücksichtigung des 18S rRNA Abgleichs war die $CerS2$ Transkriptmenge in der Leber und der Niere am höchsten, im Gehirn niedriger. In $CerS2^{+/gt Hygro}$ und $CerS2^{+/gt del Hygro}$ Mäusen mit und ohne Hygromylinresistenzkassette konnte eine ungefähr 50%ige Abnahme des $CerS2$ Transkripts festgestellt werden. Das Transkript des βgeo Fusionsproteins konnte

durch ein 4.4 kb großes Fragment in einer LacZ Northern-Blot Hybridisierung gezeigt werden. In der Niere und im Gehirn könnte die Menge des LacZ Transkripts dem des CerS2 Transkripts entsprechen. In der Leber traf dies nicht zu.

4.1.2 Transkriptmengen der *CerS1*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6* Gene im Gehirn von *CerS2^{gt/gt}* Mäusen

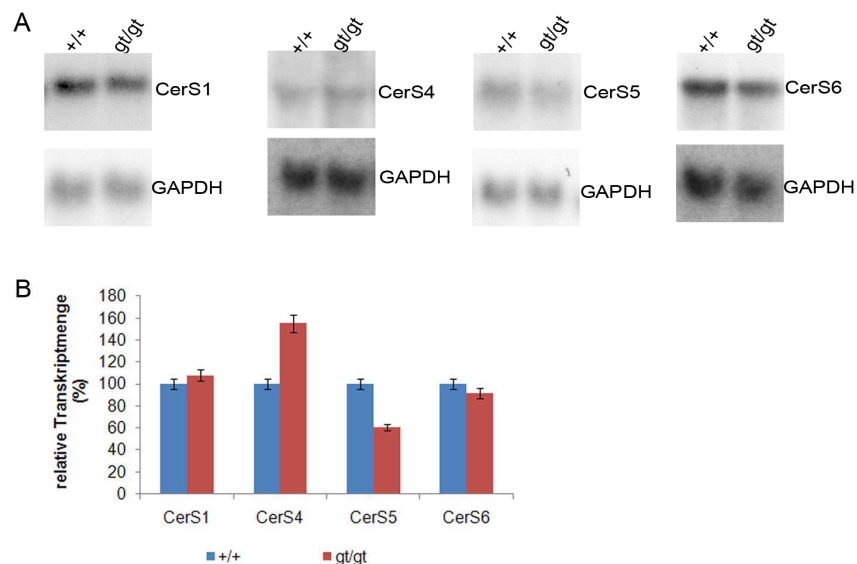


Abb. 4.2: Transkriptmengen der *CerS1*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6* Gene in *CerS2^{gt/gt}* Mäusen. **A** Autoradiographie nach den Northern-Blot Hybridisierungen mit einer *CerS1*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6*-Sonde. **B** Quantitative Analyse der Transkriptmenge von *CerS1*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6*. Die Analyse wurde mit 3-6 Mäusen durchgeführt. Das *CerS4* Transkript wird in den *CerS2^{gt/gt}* Mäusen (*gt/gt*) hochreguliert, wohingegen das *CerS5* Transkript herunterreguliert wird. Bei den *CerS1*- und *CerS6* Transkripten konnte keine Veränderung zu den *CerS2^{+/+}* Mäusen (*+/+*) in der Transkriptmenge beobachtet werden. Das Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase(GAPDH) Transkript wurde als Ladungsabgleich verwendet.

Anhand von Northern-Blot Analysen wurden die Transkriptmengen der anderen vier CerS Mitglieder (*CerS1*, *CerS4*, *CerS5* und *CerS6* Gen) im Gehirn bestimmt. Das *CerS3* Gen wurde nicht untersucht, da das *CerS3* Gen nicht im Gehirn transkribiert wird (Mizutani et al., 2006; Lavaid et al., 2007). Das *CerS1* Transkript konnte als 2,7 kb großes Fragment nachgewiesen werden, wohingegen das *CerS4* Transkript als 1,6 kb großes Fragment, das *CerS5* Transkript als 2 kb und das *CerS6* Transkript als 7 kb gezeigt werden konnte. Die drei weiteren Transkripte (2 kb, 3 kb, 4 kb) des *CerS4* Gens konnten aufgrund der schwachen Transkription nicht analysiert werden (Abb. 4.2 A). Die Transkriptmenge des *CerS1* Gens sowie die des *CerS6* Gens veränderte sich in *CerS2^{gt/gt}* Mäusen im Gegensatz zu den *CerS2^{+/+}* Mäusen nicht. Das *CerS5* Transkript wurde in *CerS2^{gt/gt}* Mäusen um 40% im

Gegensatz zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen erniedrigt, wohingegen das 1,6 kb große $CerS4$ Transkript um 50% im Gegensatz zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen erhöht wurde (Abb. 4.2 B).

4.1.3 Vererbungsstatistik

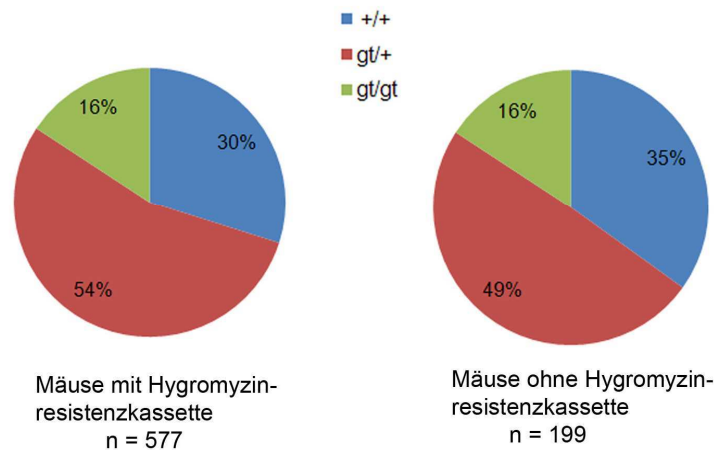


Abb. 4.3: Verhältnis der Nachkommen aus $CerS2^{+/gt}$ x $CerS2^{+/gt}$ nach 3 – 6 Wochen.

A Allelverteilung der $CerS2^{+/+}$ (+/+), $CerS2^{+/gt}$ $Hygro$ (+/gt) und $CerS2^{gt/gt}$ $Hygro$ (gt/gt) Nachkommen.

B Allelverteilung der $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt}$ del $Hygro$ und $CerS2^{gt/gt}$ del $Hygro$ Mäuse. gt = „Gene Trap“ Allel, + = Wildtyp Allel.

Drei bis sechs Wochen nach der Geburt wiesen aus mehreren heterozygoten hygromylin-resistenzkassetten-haltigen Verpaarungen ($CerS2^{+/gt}$ $Hygro$) die Nachkommen 30% den Genotyp $CerS2^{+/+}$, 55% den Genotyp $CerS2^{+/gt}$ $Hygro$ und 16% den Genotyp $CerS2^{gt/gt}$ $Hygro$ auf. Insgesamt wurden 577 Mäuse analysiert. Aus heterozygoten hygromylin-resistenzkassetten-deletierten Verpaarungen ($CerS2^{+/gt}$ del $Hygro$) gingen 39% mit dem Genotyp $CerS2^{+/+}$, 49% mit dem Genotyp $CerS2^{+/gt}$ del $Hygro$ und 16% $CerS2^{gt/gt}$ del $Hygro$ von 199 Mäusen hervor. Dies entsprach nicht der erwarteten Allelverteilung nach Mendel (25% - 50% - 25%) (Abb. 4.3).

4.1.4 β -Galaktosidase Reporter Gen Expression des Fusionsproteins β geo in $CerS2^{+/gt}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

Das Vorhandensein des $CerS2$ Transkripts in verschiedenen Organen konnte bislang nur durch Northern-Blot Hybridisierungen (Mizutani et al., 2005), Real-Time PCRs (Lavaud et al., 2007) und *in-situ* Experimenten im Gehirn (Becker et al., 2007) nachgewiesen werden. Demnach ist das $CerS2$ Transkript ubiquitär transkribiert, jedoch ist die Transkriptmenge am höchsten in der Leber und der Niere. Zusätzlich konnte durch *in-situ* Experimente gezeigt werden, dass Transkripte des $CerS2$ Gens in Oligodendrozyten des Gehirns vorhanden sind (Becker et al., 2007).

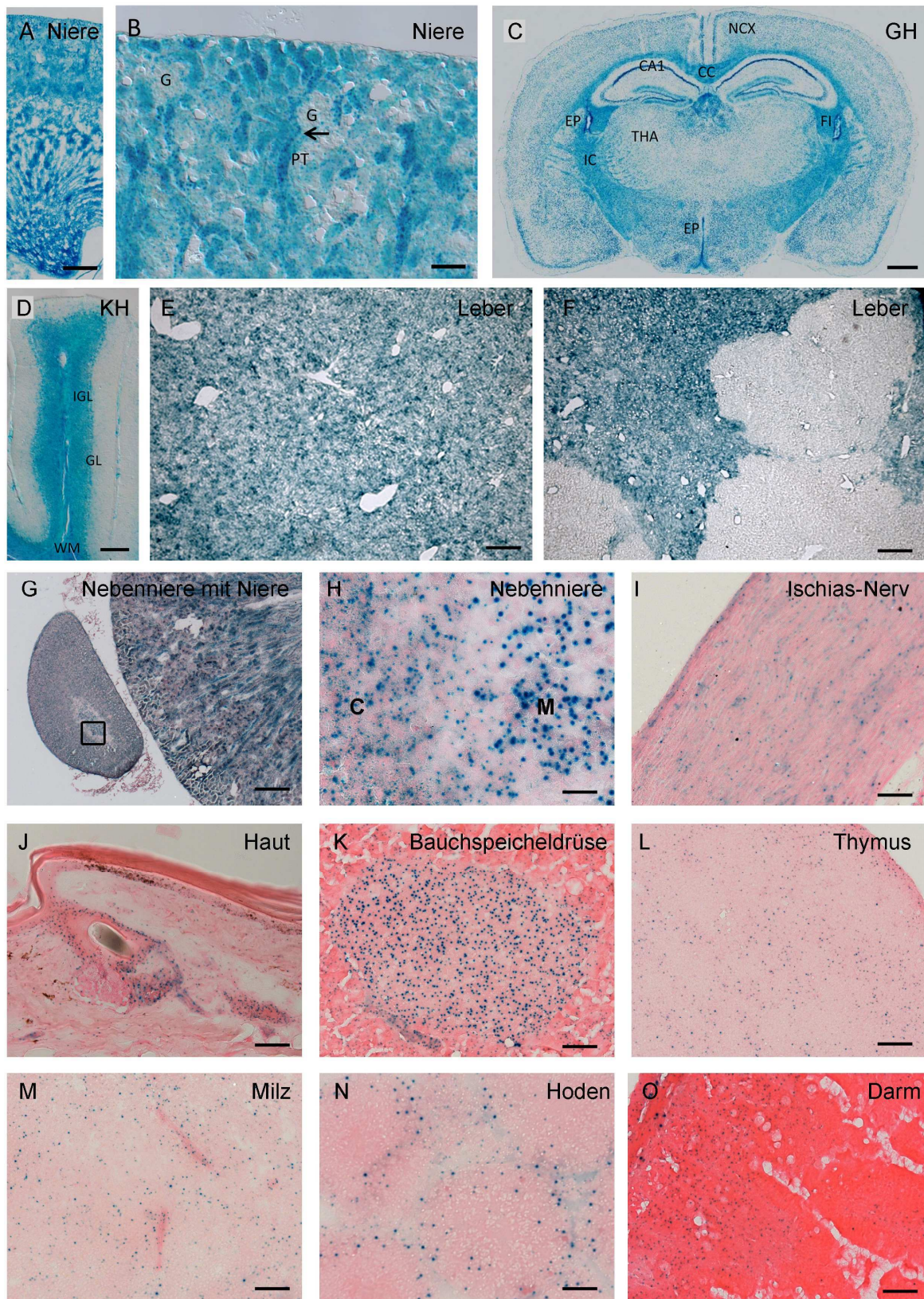


Abb. 4.4: Expressionsanalyse des β -Galaktosidase Reportergens vom Fusionsprotein β_{geo} an Kryoschnitten von unterschiedlichen Organen der $CerS2^{+/gt}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse. A–B Die β -Galaktosidase Reportergen Expression des Fusionsproteins β_{geo} in der Niere war in den Sammelrohren, den Tubuli, insbesondere den proximalen Tubuli (PT), sowie in den Nierenkörperchen (G) lokalisiert. Der Pfeil zeigt den Kontakt zwischen dem proximalen Tubulus und dem

Nierenkörperchen. **C-D** LacZ Signale konnten im Großhirn (GH) sowie im Kleinhirn (KH) in der weißen Substanz, wie z.B. in der inneren Kapsel (IC), im Corpus Callosum (CC) des Großhirns wie auch im Mark des Kleinhirns, bestimmt werden. Weitere LacZ Signale wurden in der grauen Substanz wie in der CA1, CA2, CA3 und CA4 Region des Hippokampus, im Neokortex (NCX) und im Thalamus (THA) des Großhirns wie auch in der Körnerschicht (IGL) und Purkinje Schicht (GL) des Kleinhirns beobachtet. Zusätzlich konnte die Expression des β -Galaktosidase Reportergens vom Fusionsprotein β geo in den ventrikulären Ependymalzellen (EP) des Großhirns beobachtet werden. **E-F** In der Leber konnte nur ein blauer Schleier festgestellt werden. In der Leber von 11 Monate alten Mäusen wurden Bereiche bestimmt, die keinen blauen Schleier aufwiesen. **G-H** Expression des β -Galaktosidase Reportergens in der Nebenniere wurde im Mark (M) sowie im Kortex (C) beobachtet. **I** Im Ischias-Nerv wurden LacZ Signale in Schwanzzellen sowie in perineuralen Zellen festgestellt. **J** In der Haut waren die LacZ Signale in der Basalschicht der Epidermis, im Trichter des Haarfollikels sowie in vereinzelt Zellen der Dermis vorhanden. **K** In der Bauchspeicheldrüse zeigten sich LacZ Signale in den Langerhans-Inseln. **L-M** Im Thymus sowie in der Milz konnten LacZ positive Zellen nachgewiesen werden. **N** Im Hoden konnte eine β -Galaktosidase Reportergen Expression in den Samenkanälchen beobachtet werden. **O** Im Darm zeigten sich die LacZ positiven Zellen in der Ringmuskulatur, in der Längsmuskulatur, im Plexus submucosus Meissneri sowie in den Zotten (jedoch nicht im Darmepithel der Zotten). In den Kryoschnitten der Niere, der Leber, des Gehirns, des Ischias-Nervs, der Nebenniere, der Haut, der Bauchspeicheldrüse, dem Thymus und der Milz, im Darm sowie der Hoden von $CerS2^{+/+}$ Mäusen konnten keine LacZ Signale festgestellt werden. Größenstandard in A 1 mm, B 200 μ m, C 1 mm, D 150 μ m, E und F 200 μ m, G 100 μ m, H 50 μ m, I ,50 μ m J 20 μ m, K 50 μ m, L und M 100 μ m, N 50 μ m und O 100 μ m.

Zur Bestimmung der $CerS2$ Promotoraktivität im Gewebe konnte das Fusionsprotein β geo in $CerS2^{+/gt}$ Mäusen verwendet werden, da es die Sequenz des β -Galaktosidase Reportergens enthält und unter dem $CerS2$ Promotor transkribiert wird.

In der Niere von $CerS2^{+/gt}$ Mäusen wiesen die Sammelrohre, die sich im Nierenmark und insbesondere in der Papilla renalis befinden, eine starke β -Galaktosidase Reportergen Expression des Fusionsproteins β geo auf. Zusätzlich konnte eine starke Expression des β -Galaktosidase Reportergens in den subkapsulären Tubuli, die wahrscheinlich die proximalen Tubuli der Nierenkörperchen darstellen, beobachtet werden. Neben den proximalen Tubuli konnte in weiteren Typen der Tubuli eine schwache bis intermediäre LacZ Färbung nachgewiesen werden, während die β -Galaktosidase Reportergen Expression in den Glomeruli nur eine schwache LacZ Färbung aufwies (Abb. 4.4 A-B).

Im Großhirn von $CerS2^{+/gt}$ konnte die β -Galaktosidase Reportergen Expression an drei Bereichen nachgewiesen werden. Der erste Bereich war die weisse Substanz wie das Corpus Callosum oder die innere Kapsel. Die Verteilung der LacZ Expression deutet daraufhin, dass das $CerS2$ Gen in Oligodendrozyten exprimiert wird. Der zweite Bereich war

in der grauen Substanz, wie im Hippokampus, dem ganzen Neokortex und im Thalamus. Im Hippokampus zeigte sich in den CA1 pyramidalen Zellen eine starke β -Galaktosidase Aktivität, die an der CA1/CA2 Grenze reduziert und in den CA3 pyramidalen Zellen aufrechterhalten wurde. Zusätzlich wurden LacZ Signale in der subgranularen Zone des Gyros Dentatus gefunden. Der dritte Expressionsort befand sich in den epithelialen Zellen des Choroid Plexus und in den ependymalen Zellen des Gehirnventrikels (Abb. 4.4 C).

Im Kleinhirn wurde die LacZ Färbung ebenfalls in der grauen und weißen Substanz beobachtet. Die graue Substanz teilt sich in drei Schichten auf: die Körnerschicht, Purkinje Schicht und die Molekularschicht. Die β -Galaktosidase Reporter gen Expression des Fusionsproteins β geo befand sich in der Körnerschicht und Purkinje Schicht, wo sie schwächer ausgeprägt war. Die weiße Substanz wird durch das Mark des Kleinhirns dargestellt und wies eine sehr starke β -Galaktosidase Aktivität auf (Abb. 4.4 D).

In der Leber von 10 Wochen alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen konnte kein positives LacZ Signal nachgewiesen werden, sondern nur ein blauer „Schleier“. In der Leber von 11 Monate alten Mäusen wurden Bereiche bestimmt, die keinen blauen Schleier aufwiesen. Die Größe der Bereiche variierte in den Lebern von alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (Abb. 4.4 E-F). In der Nebenniere der $CerS2^{+/gt}$ Mäuse zeigte sich eine schwache LacZ Färbung im Kortex, wohingegen sie im Mark stärker vorhanden war (Abb. 4.4 G–H). Im Ischias-Nerv zeigten sich die LacZ Signale im Perineurium und im Neurolemm (Abb. 4.4 I). In der Haut konnte eine β -Galaktosidase Reporter gen Expression des Fusionsproteins β geo in der Basalschicht der Epidermis, im Trichter des Haarfollikels sowie in vereinzelt Zellen der Dermis nachgewiesen werden (Abb. 4.4 J).

Die Bauchspeicheldrüse besteht aus einem endokrinen und einem exokrinen Anteil. Im exokrinen Anteil waren schwache LacZ Signale vorhanden, im endokrinen Anteil, der die Langerhans-Inseln darstellt, war eine β -Galaktosidase Reporter gen Expression des Fusionsproteins β geo zu beobachten (Abb. 4.4 K). Ebenso konnte die LacZ Färbung in den interlobulären Ausführungsgängen nachgewiesen werden.

Die Hoden der $CerS2^{+/gt}$ Mäuse zeigten eine β -Galaktosidase Reporter gen Expression des Fusionsproteins β geo in den Samenkanälchen – vermutlich in den Keimzellen.

Desweiteren zeigten sich verstreute LacZ Signale in der Milz und im Thymus der $CerS2^{+/gt}$ Mäuse. Im Darm der $CerS2^{+/gt}$ Mäuse konnte eine β -Galaktosidase Aktivität in der Ringmuskulatur, in der Längsmuskulatur, im Plexus submucosus Meissneri sowie in den Darmzotten festgestellt werden (Abb. 4.4 O).

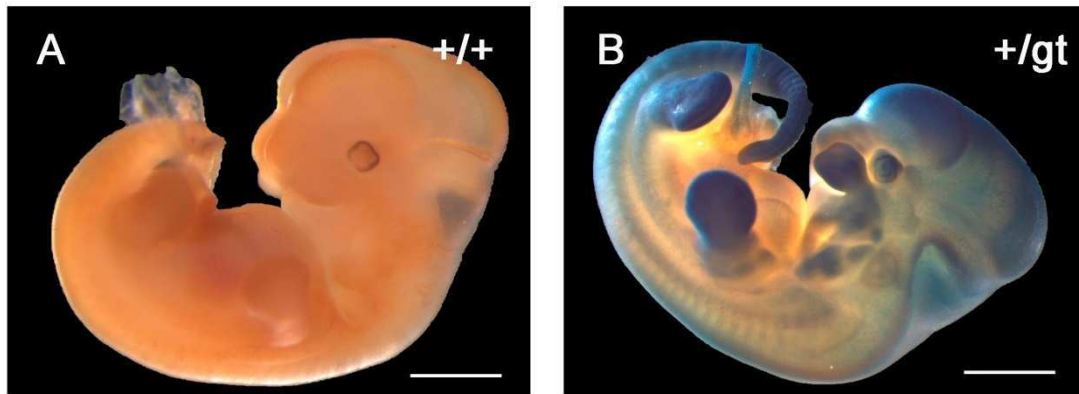


Abb. 4.5: β -Galaktosidase Expression in einem 11,5 Tage alten CerS2^{gt/gt} Embryo. Die β -Galaktosidase Reportergen Expression des Fusionsproteins β geo zeigte sich in den Vorläufern der Extremitäten, der Augen und des Gehirns von CerS2^{gt/gt} Embryonen (+/gt) im Vergleich zu CerS2^{+/+} Embryonen (+/+). Größenstandard A und B 1 mm.

Die Expression des β -Galaktosidase Reportergens, welches in der Sequenz des Fusionsproteins β geo enthalten war, konnte in der Entwicklung von CerS2^{gt/gt} Mäusen beobachtet werden. 11,5 Tage alte CerS2^{gt/gt} Embryonen zeigten eine β -Galaktosidase Aktivität in den Vorläuferstrukturen der Pfoten sowie im Auge und des Gehirns (Abb. 4.5).

4.1.5 Verhaltensphänotyp in CerS2^{gt/gt} Mäusen

Ab einem Alter von 5-6 Monaten kam es bei CerS2^{gt/gt} Mäusen zu Lähmungserscheinungen (Abb. 4.6 A), die sich besonders nach dem Herausziehen des Käfigs zeigten. Die Geschwistertiere liefen kreuz und quer durch den Käfig. Nach 45 Sekunden wurden die ersten zögernden Bewegungen der CerS2^{gt/gt} Mäuse festgestellt. Nach einer Minute zeigten sie das typische Laufverhalten wie CerS2^{+/+} Mäuse bzw. CerS2^{gt/gt} Mäuse. Diese Lähmungszustände traten nach 6 Monaten selten auf, nahmen jedoch mit zunehmendem Alter verstärkt zu. Zusätzlich konnten häufige Phasen des Kopfnickens bei den CerS2^{gt/gt} Mäusen beobachtet werden (Abb.4.6 B). Neben diesen beiden Verhaltensmerkmalen zeigten sich beim Hochheben der Mäuse am Schwanz die Hinterbeine in einer umklammerten Position, wohingegen die CerS2^{+/+} Mäuse ihre Hinterbeine wegspreizten (Hinterbeinparalyse) (Abb. 4.6 C).

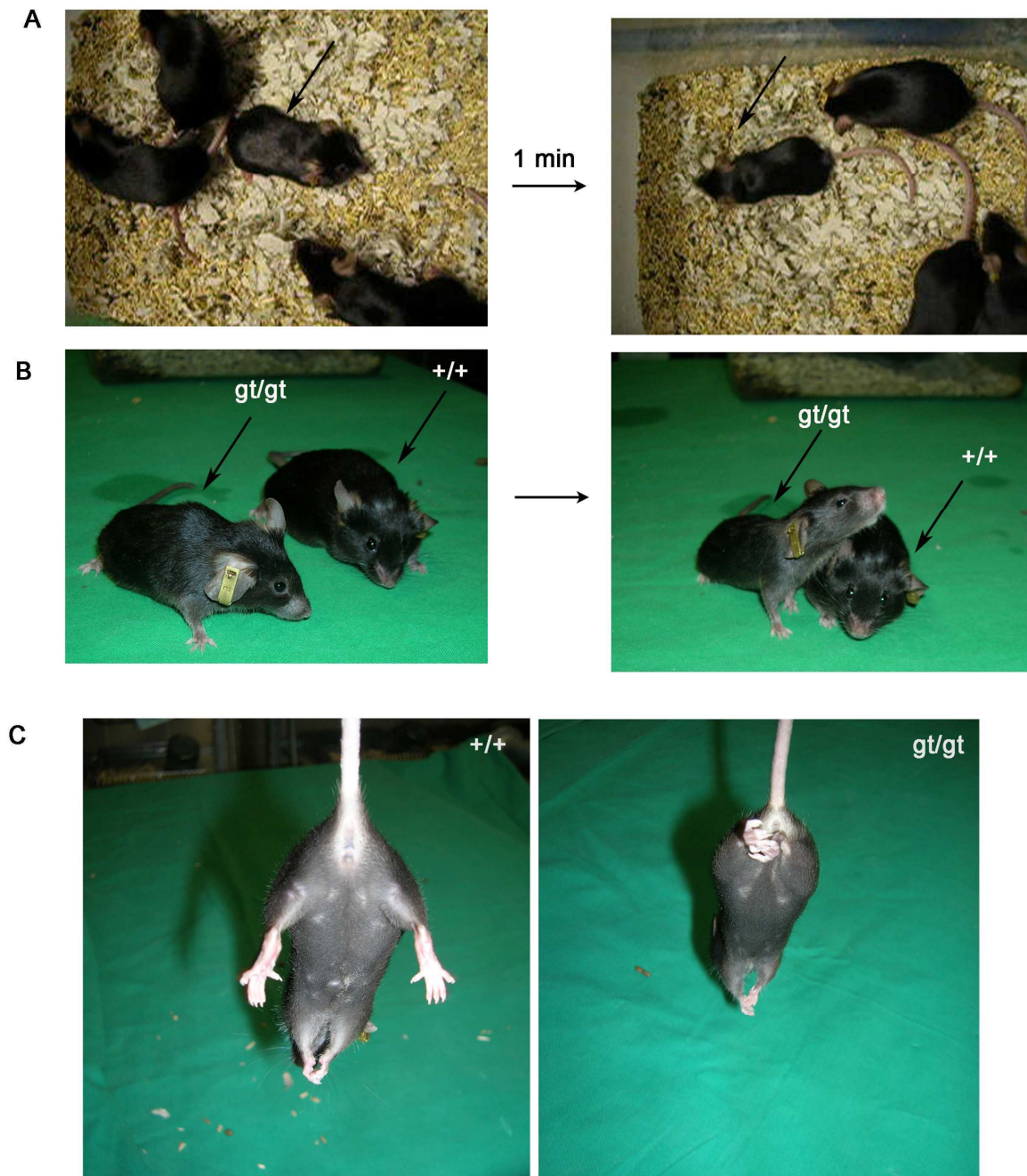


Abb. 4.6: Lähmungserscheinung und Hinterbeinparalyse von 6 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen.
A Die $CerS2^{gt/gt}$ Maus liegt in einem gelähmten Zustand in der Käfigstreu (schwarzer Pfeil). Nach 45 sec konnten die ersten Bewegungen beobachtet werden, nach einer Minute lief sie mit den Geschwistern durch den Käfig. **B** Phasen des Kopfnickens von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. **C** Hinterbeinparalyse bei $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen.

4.1.6 Phänotypische Anomalien in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

Bislang konnte die Funktion des *CerS2* Gens in der Maus nicht bestimmt werden. Das *CerS2* Gen wird ubiquitär in der Maus exprimiert, jedoch zeigt sich eine hohe Transkriptmenge in der Niere und im Gehirn (Mizutani et al., 2005; Laviad et al., 2007). Einen ersten Hinweis für phänotypische Anomalien im zentralen und peripheren Nervensystem zeigte der

Verhaltensphänotyp, den die $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse im Alter von 5-6 Monaten aufwiesen. Aufgrund der hohen Transkription des $CerS2$ Gens wurde ebenfalls die Leber und Niere auf Anomalien untersucht.

4.1.6.1 Phänotypische Anomalien des Nervensystems in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

4.1.6.1.1 Morphologie und Anfärbbarkeit des Gehirns in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

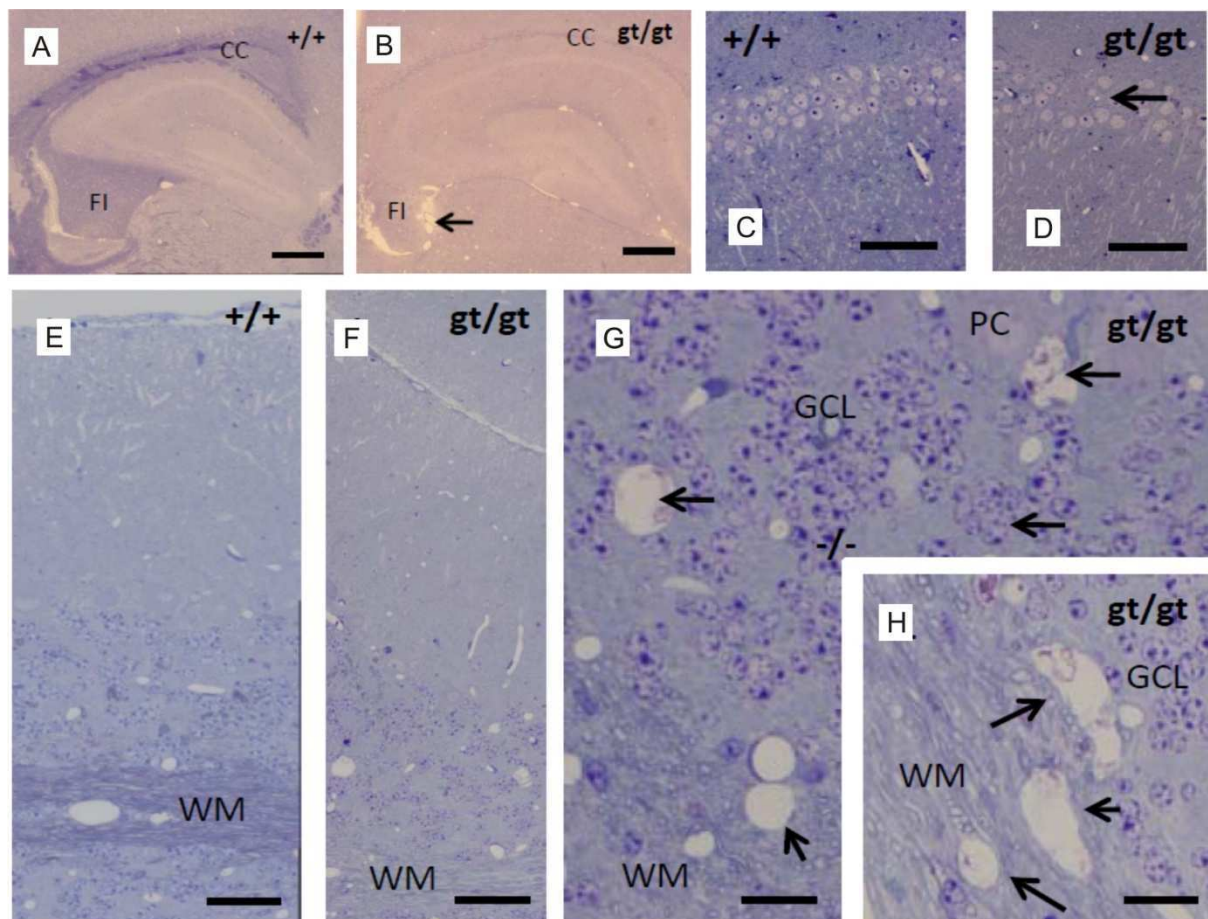


Abb. 4.7: Veränderung der Myelinzusammensetzung sowie Zystenbildung im Groß- und Kleinhirn in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen im Vergleich zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen anhand von Toluidin Blaufärbungen. A, B, E und F Anfärbbarkeit der weißen Substanz, wie des Korpus Kallosum (CC) und der Fimbria (FI) im Großhirn (A) und des Marks im Kleinhirn (E) in $CerS2^{+/+}$ Mäusen (+/+) sowie der Verlust der Anfärbbarkeit im Großhirn (B) und im Kleinhirn (F) in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) **C-D** „Leere“ Zysten in der CA1 Region des Hippokampus in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) im Vergleich zu den Kontrollen. **G-H** „Leere“ Zysten (Pfeile) in der weißen Substanz (WM) des Markerlagers sowie der Körnerzellschicht (GCL) und der Purkinje-Zellschicht (PL) in der grauen Substanz. Größenstandard in A 1 mm, B 200 μ m, C 50 μ m, D-E 500 μ m, F und G 75 μ m, H 150 μ m, I und J 50 μ m, K und J 20 μ m.

Ab einem Alter von 3 Monaten konnte eine Reduktion der Anfärbbarkeit des Myelins im Großhirn innerhalb des Korpus Kallosums, der Alveus und der Fimbria in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen im Vergleich zu den $CerS2^{+/+}$ Mäusen mit dem Farbstoff Toluidin Blau beobachtet werden.

Toluidin Blau ist ein basisch geladener Farbstoff und lagert sich an das negativ geladene Myelin an. Die Reduktion der Anfärbbarkeit des Myelins in CerS2^{gt/gt} Mäusen weist auf eine Änderung der Lipidzusammensetzung im Myelin hin.

Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Fimbria von CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen kleiner war und verschrumpelte Konturen besaß (Abb. 4.7A-B). Einzelne Zellen oder kleine Zellgruppen in der pyramidalen CA1 Schicht des Hippokampus wurden apoptotisch, wodurch es zu kleineren Lücken in dieser Schicht kommt (Abb. 4.7 C-D).

Im Kleinhirn von CerS2^{gt/gt} Mäusen kam es ähnlich wie im Großhirn zum Verlust der Anfärbbarkeit des Myelins im Marklager des Kleinhirns (Abb. 4.7 E-F). In 9 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen traten innerhalb der weißen Substanz des Marklagers sowie der Körnerzellschicht der grauen Substanz eine vielfache Anzahl von leeren Zysten auf (Abb. 4.7 G-H).

4.1.6.1.2 Morphologie eines peripheren Nervs (Trigeminus) von CerS2^{gt/gt} Mäusen

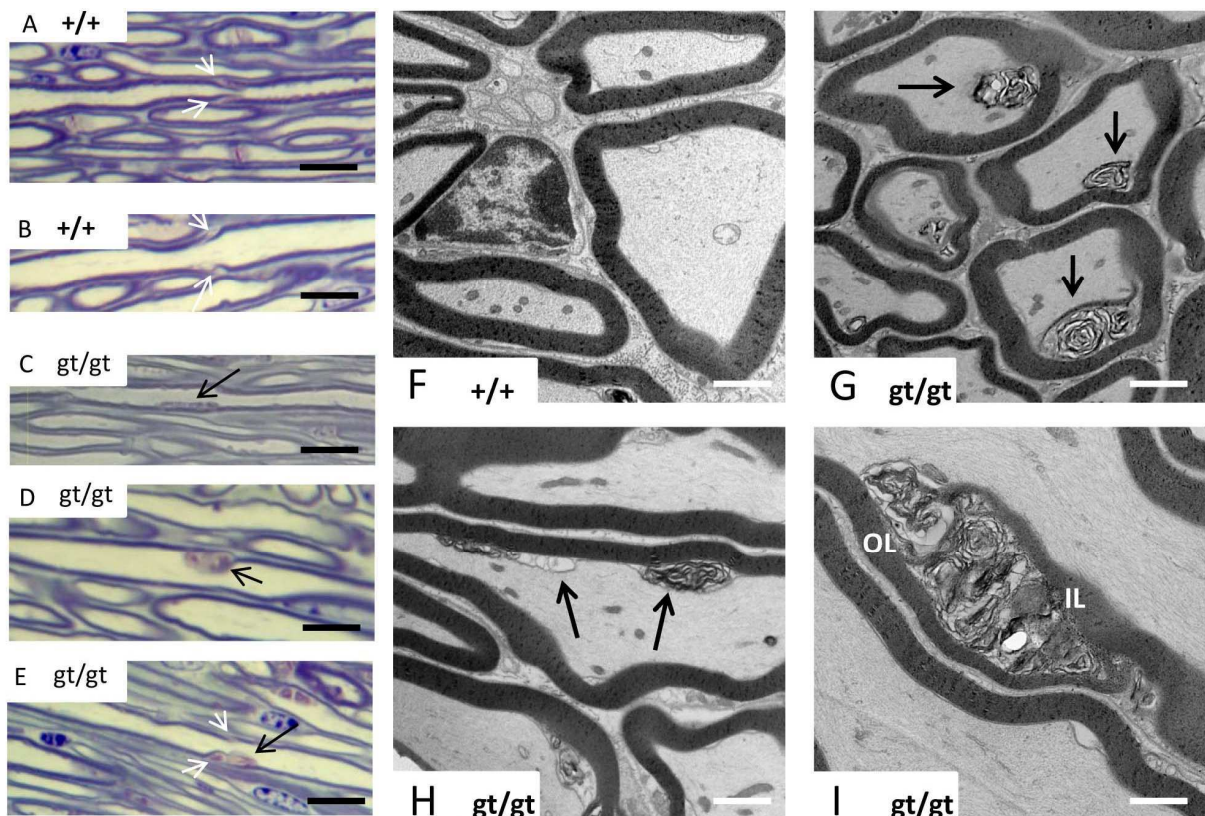


Abb. 4.8: Dysmyelinisierung im trigeminalen Nerv in CerS2^{gt/gt} Mäusen. A-E Toluidin Blau gefärbte Semi-Dünnschnitte des trigeminalen Nervs von CerS2^{gt/gt} Mäusen (gt/gt) zeigten im Gegensatz zu Toluidin Blau gefärbten Semi-Dünnschnitten des trigeminalen Nervs von CerS2^{+/+} Mäusen (+/+) Myelinablagerungen an der Innenseite der Myelinscheide (schwarze Pfeile). Teilweise waren diese Ablagerungen mit Schmidt-Lanterman Einkerbungen verbunden (weisse Pfeile). F-H Transmissions-Elektronenmikroskopische Analysen bestätigten die Ablagerungen von einzelnen bis

mehreren Myelinschichten an der inneren Oberfläche der Myelinscheide (schwarze Pfeile). Größenstandard in A-E 10 μm , F-I 1 μm .

Zur Analyse des trigeminalen Nervs, der stellvertretend für periphere Nerven steht, wurden Toluidin Blau gefärbte Semi-Dünnschnitte angefertigt. Toluidin Blau färbt die innere und äußere Myelinschicht der Neurone sowie Zellkerne des trigeminalen Nervs an. Die inneren angefärbten Myelinschichten zeigten in unregelmäßigen Abständen Ablagerungen des Myelins, die auch als Dysmyelinisierung bezeichnet werden können. Diese Ablagerungen konnten auch mit Schmidt-Lantermann Einkerbungen verbunden sein (Abb. 4.8 A-E). Die Transmissions-Elektronenmikroskopischen Analysen bestätigten dieses Ergebnis. Es zeigten sich Ablagerungen von einzelnen oder mehreren Myelinlamellen, die sich in den periaxonalen Raum ausdehnen und in das Axon des Neurons drücken (Abb. 4.8 F-H). In longitudinalen schief angeschnittenen Schnitten konnten einige solcher Ablagerungen hintereinander liegend beobachtet werden (Abb. 4.8 H). In einzelnen Fällen können diese Ablagerungen von Myelinlamellen zwischen äußerer und innerer Myelinscheide die gesamte Fläche einer Myelinscheide einnehmen, wie es auch bei den Schmidt-Lantermann Einkerbungen der Fall ist (Abb. 4.8 I). Als Fazit konnten Defekte in der inneren Oberfläche der Myelinscheide bei über 20% der Gesamtaxone im peripheren Nerv festgestellt werden.

4.1.6.2 Phänotypische Anomalien der Leber in $\text{CerS2}^{\text{gt/gt}}$ Mäusen

Ab einem Alter von 7 Monaten konnten in $\text{CerS2}^{\text{gt/gt}}$ Mäusen Lebertumore beobachtet werden. Diese Lebertumore zeigten sich in Form von grauen Knoten, die im gesamten Leberparenchym verteilt waren. Im Extremfall nahmen die Lebertumore das gesamte Leberläppchen ein, wodurch die Architektur der Leberläppchen zerstört wurde. Die Hepatozyten der Tumore waren lipid- und glykogenreich (Abb. 4.9 A–E). Ein Charakteristikum der Wildtyp Leberläppchen sind der Disse-Raum und die Gallengänge. In der Leber von $\text{CerS2}^{\text{gt/gt}}$ Mäusen konnte der Disse-Raum sowie die Gallengänge nicht mehr nachgewiesen werden. Endothelartige Zellen hefteten sich direkt an Hepatozyten an, wodurch die Gallengänge entstellt wurden. Die Morphologie der Lebertumore wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Dieter Hartmann untersucht (Abb. 4.9 F-J).

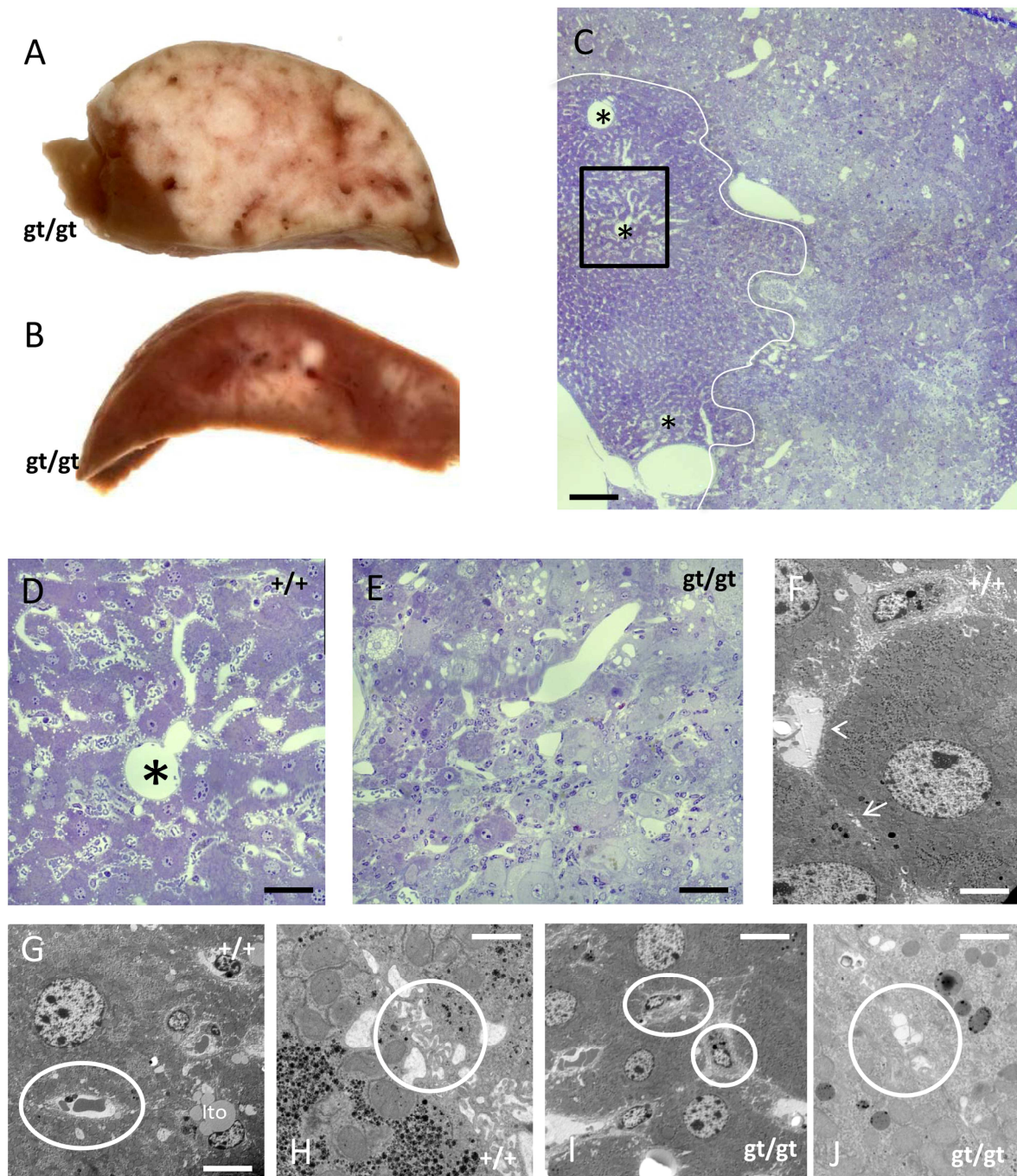


Abb. 4.9: Lebertumore in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen sowie deren Morphologie im Vergleich zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen. A-B 7 Monate alte Mäuse zeigten Lebertumore, die im gesamten Leberparenchym verteilt, als graue Knoten sichtbar waren. Im Extremfall, gezeigt in A, breiteten sich die Tumore über das Leberläppchen aus. C-E Architektur der Leberläppchen mit zentralen Venen und radial angeordneten Sinusoiden, das der Wildtyp Leber entspricht (links von der weißen Linie) im Vergleich zum lipid- und glykogenreichen Tumorgewebe in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt), bei dem die typische Leberläppchen-Architektur zerstört wurde (rechts von der weißen Linie). Beides geht aus Toluidin Blau gefärbten Schnitten hervor. D Vergrößerung der Architektur eines Leberläppchens in $CerS2^{+/+}$ Mäusen ($+/+$). E Vergrößerung des tumorhaltigen Lebergewebes von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) F Ultrastruktur von Hepatozyten mit dem Disse-Raum (Pfeilspitze) und den Gallenkanälchen (Pfeil) von $CerS2^{+/+}$ Mäusen durch Transmissions-Elektronenmikroskopie. G–J Vergrößerung von F der $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$

Leber. Der Disse-Raum und die Gallenkanälchen sind durch weiße Kreise gekennzeichnet. Der Disse-Raum sowie die Gallenkanälchen waren nicht mehr in der Leber von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen erkennbar. Größenstandards in C 500 μm , D und E 100 μm , F 5 μm , G 10 μm , H 1 μm , I 10 μm und J 3 μm .

4.1.6.3 Phänotypische Anomalien in der Niere von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

Aufgrund der starken Expression des β -Galaktosidase Reportergens wurden Anomalien in der Niere erwartet. Jedoch zeigte sich in der Niere nur eine morphologische Veränderung in 7-9 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. Es traten einige 100 μm große „leere“ Zysten im Nierenparenchym auf, die in der Nähe von Blutgefäßen und Glomeruli liegen. Die phänotypischen Anomalien der Niere wurden in Kooperation mit Herrn. Prof. Dieter Hartmann durchgeführt (Abb. 4.10 A-E).

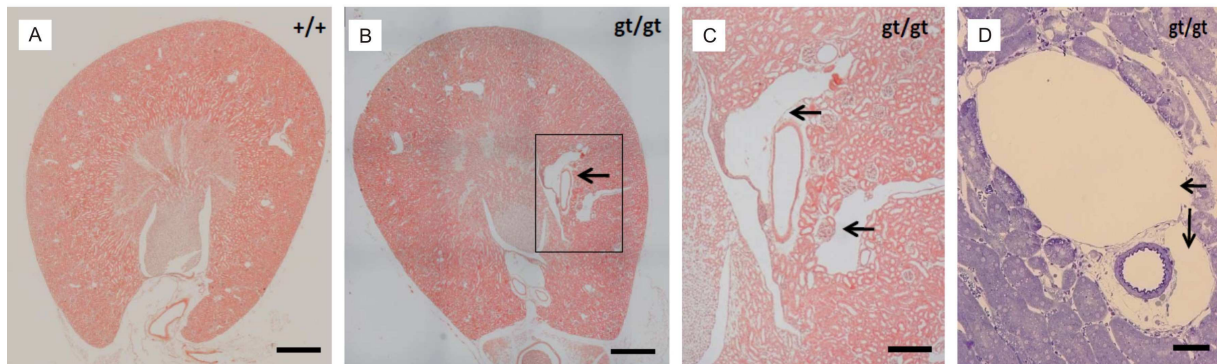


Abb. 4.10: „Leere“ Nierenzysten in 9 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. **A-B** Querschnitte einer eosingefärbten Niere von $CerS2^{+/+}$ (+/+) und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt). **C-D** Vergrößerung von leeren Zysten (Pfeile) im Nierenparenchym von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen, die in der Nähe von Blutgefäßen und Glomeruli lagen. Größenstandard in A 500 μm , B 1 mm, C und D 150 μm .

4.1.7 Ceramidsynthese Aktivitätstest

Die Substratspezifität konnte bislang nur über die Überexpression des *CerS2* Gens in HEK-Zellen oder über siRNA herunter regulierte Expression von *CerS2* in HEK Zellen nachgewiesen werden. Das *CerS2* Protein zeigt eine C22:0 und C26:0 Acyl-CoA abhängige Ceramidsynthese Aktivität (Mizutani et al., 2005; Laviad et al., 2007).

Zur Überprüfung der Substratspezifität des *CerS2* Proteins wurde ein Ceramidsynthese Aktivitätstest an $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen durchgeführt. Dieser Test konnte zusätzlich die Abwesenheit des *CerS2* Proteins bzw. die Abwesenheit der *CerS2* Aktivität zeigen, da zu diesem Zeitpunkt kein geeigneter Antikörper vorhanden war. Der Ceramidsynthese

Aktivitätstest wurde in Kooperation mit PD Dr. Matthias Eckhardt durchgeführt. Bei diesem Aktivitätstest wurde ein Gemisch von Gehirn- oder Leberlysaten, [H^3]-Sphingarin und unterschiedlich langkettigen aktivierten Fettsäuren, die von C16:0 Acyl-CoA bis C24:1 Acyl-CoA reichten, inkubiert, aufgereinigt und über eine Dünnschichtchromatographie analysiert. In CerS2^{gt/gt} Gehirnllysaten war die Ceramidsynthese Aktivität bei C24:1 Acyl-CoA vollständig erniedrigt, wohingegen in CerS2^{+/gt} Gehirnllysaten die Aktivität um 50 % reduziert war. Beim Einsatz von C20:0 Acyl-CoA wurde die Ceramidsynthese Aktivität in CerS2^{gt/gt} Mäusen zu 44 % erniedrigt. Kein bedeutsamer Aktivitätsunterschied wurde bei den Substraten C16:0, C18:0 und C20:0 Acyl-CoA gefunden (Abb. 4.11 A).

In CerS2^{gt/gt} Leberlysaten konnte eine Abnahme der Ceramidsynthese Aktivität bei fast allen aktivierten Fettsäuren außer C16:0 Acyl-CoA nachgewiesen werden. Beim Einsatz von C18:0 Acyl-CoA nahm die Aktivität bis zu 3 % ab, beim Einsatz von C20:0 Acyl-CoA und C22:0 Acyl-CoA weniger als 1 %. Beim Einsatz von C24:1 Acyl-CoA wurde keine Aktivität mehr gemessen. In CerS2^{+/gt} Lysaten wurde bei fast allen aktivierten Fettsäuren, außer C16:0 Acyl-CoA, eine Abnahme der Aktivität um 50 % festgestellt (Abb. 4.11 B).

Der Einbau von C24:1 Acyl-CoA konnte als spezifische Messung der CerS2 Aktivität bestimmt werden, die in der Leber 50-fach höher ist als im Gehirn. Diese Daten demonstrieren, dass das CerS2 Protein eine breite Substratspezifität von C18:0 bis C24:1 Acyl-CoA aufweist, jedoch eine größere Vorliebe für langkettige Substrate besitzt.

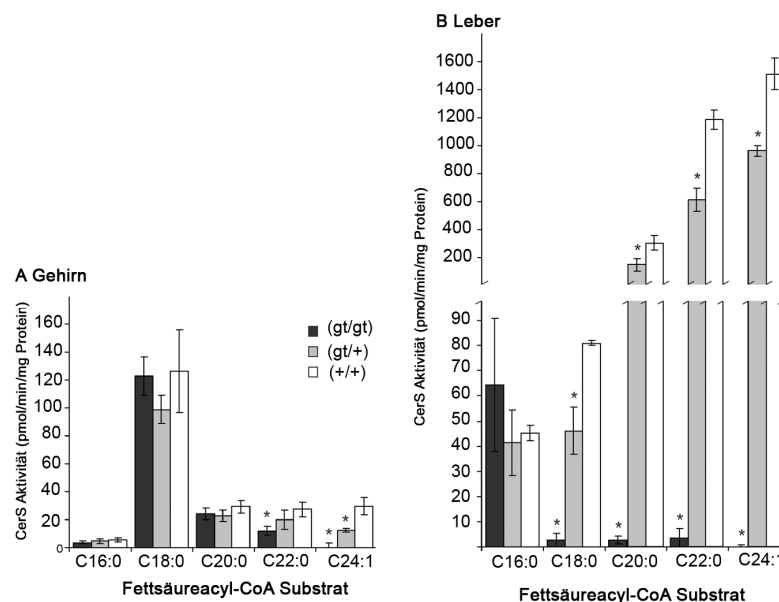


Abb. 4.11: Ceramidsynthese Aktivitätstest. **A** Ceramidsynthese Aktivität im Gehirn von CerS2^{+/+} (+/+), CerS2^{+/gt} (+/gt) und CerS2^{gt/gt} (gt/gt) 10 Wochen alten Mäusen. **B** Ceramidsynthese Aktivität in der Leber von CerS2^{+/+}, CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} 10 Wochen alten Mäusen. Der Einbau von C24:1 Acyl-CoA konnte als spezifische Messung der CerS2 bestimmt werden. Die Analyse wurde mit 3 Tieren durchgeführt. * = statistische signifikante Unterschiede beim Vergleich CerS2^{+/+} zu CerS2^{gt/gt} ($p < 0,05$; t test).

4.1.8 Analyse der Lipidzusammensetzung im Gehirn, in der Leber und in der Niere von *CerS2^{gt/gt}* Mäusen

4.1.8.1 Analyse der Sphingolipide im Gehirn, in der Leber und in der Niere von *CerS2^{gt/gt}* Mäusen anhand der Massenspektroskopie

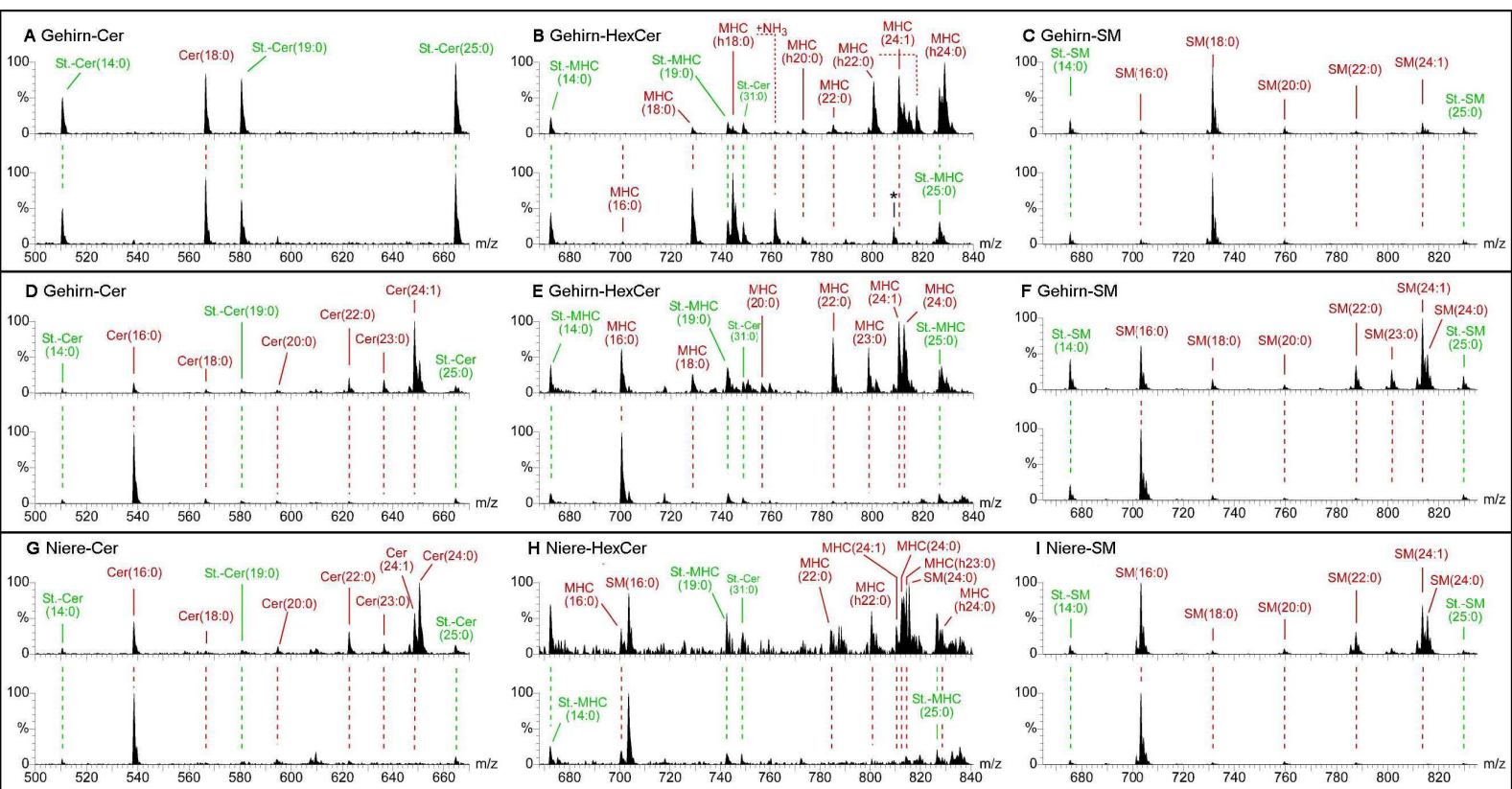


Abb. 4.12: ESI-Massenspektren von Sphingolipiden wie Ceramid (Cer), Hexosylceramid (HexCer) und Sphingomyelin (SM) von 10 Wochen alten *CerS2^{+/+}* (oberes Spektrum) und *CerS2^{gt/gt}* Mäusen (unteres Spektrum) sowie deren Standards zur quantitativen Analyse. A, D, G und B, E, F wurden mit dem Vorläufer-Ionenscan $m/z +264$ für Sphingolipide mit $d18:1$ Sphingosin detektiert. Sphingomyelin (C,F, I) wurde mit dem Vorläufer-Ionenscan $m/z +184$ für die Phosphorylcholin Kopfgruppe mit $d18:1$ Sphingosin analysiert. A-C Gehirn, D-F Leber, G-I Niere. Interne Standards sind in grün gekennzeichnet, endogene Sphingolipide in rot. Im *CerS2^{+/+}* Gehirn des Hexosylceramid-Spektrums ist $m/z 808,5$ mit einem Stern gekennzeichnet. Dieser Wert ist nicht dem Hexosylceramid zu zuordnen, da er mit einem zweiten HexCer spezifischen Scan bestimmt worden war, der einen Verlust von $+180$ amu aufwies.

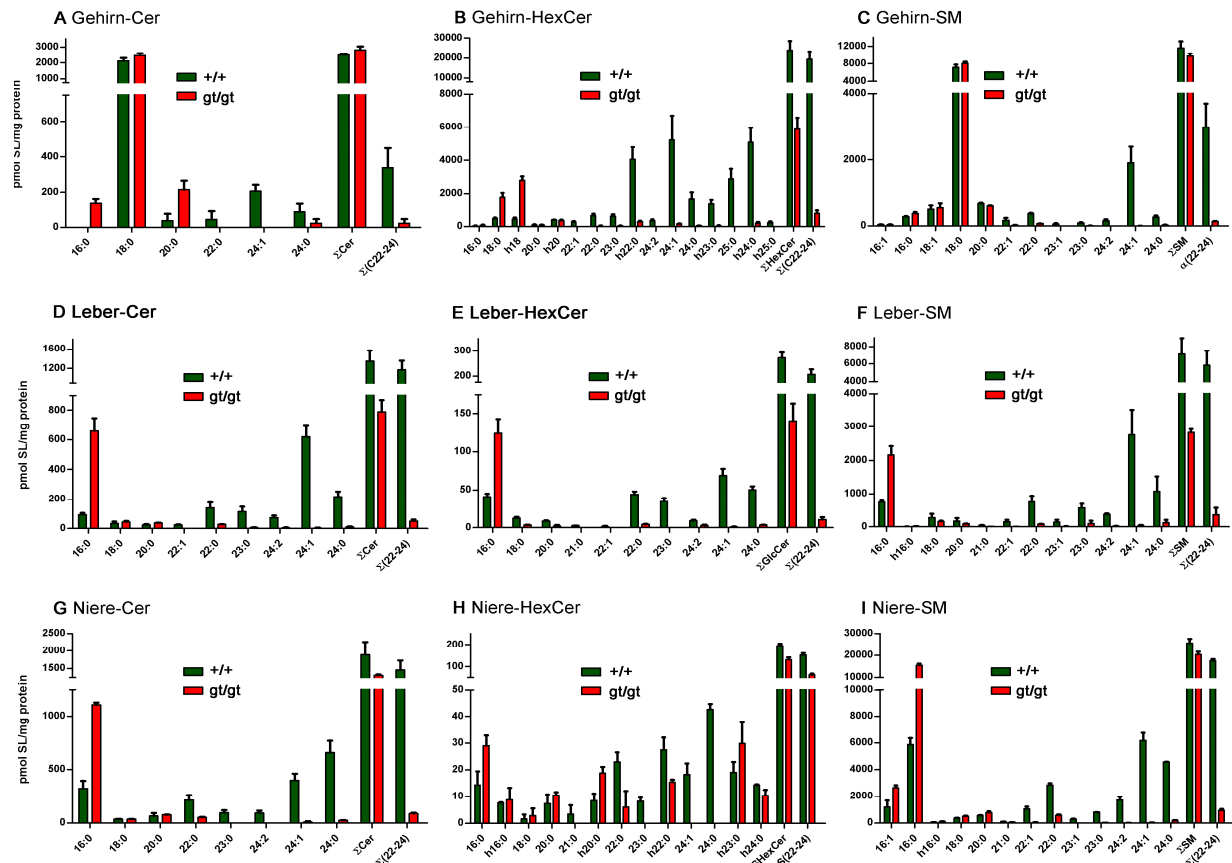


Abb 4.13: Quantitative Analyse von Sphingolipiden (Ceramid, Hexosylceramid und Sphingomyelin) im Gehirn, in der Leber und der Niere. Die Analyse wurde mit drei Tieren durchgeführt ($n = 3$) bis auf die Niere, die nur aus zwei $CerS2^{+/+}$ Mäusen stammt. Die Standardabweichung war als SEM (Mittelwert des Standardfehlers) dargestellt. Eine starke Abnahme der unterschiedlichen Sphingolipide mit einer Kettenlänge von C22:0-C24:0 wurde in den Organen Leber, Gehirn und Niere der $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse im Gegensatz zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen beobachtet. Sphingolipide mit einer Kettenlänge von C16:0 (Leber-, Nieren- und Gehirn-Ceramid) oder C18:0 (Gehirn-Hexosylceramid) wurden in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen stark erhöht.

Bislang konnte nur die Transkriptmenge der Ceramidsynthese Gene in Bezug auf die Wildtyp Sphingolipidmenge zugeordnet werden. Dabei wurde für $CerS2$ die Präferenz auf C22:0 und C24:0 Acyl-CoA gelegt. Aufgrund der hohen $CerS2$ Transkriptmenge in der Niere und in der Leber wurden für einen hohen Anteil an C22:0 und C24:0 Ceramid, Sphingomyelin und in der Niere Hexosylceramid zugeordnet. Im Gehirn ist nur eine geringe Menge des $CerS2$ Transkripts vorhanden, das jedoch für einen hohen Anteil an C22:0 bis C24:0 Hexosylceramid mit anderen Faktoren sorgen soll (Laviad et al., 2007).

Zur Analyse von Sphingolipiden (Ceramid, Hexosylceramid und Sphingomyelin) wurden die Lipide der Leber, der Niere und des Gehirns von $CerS2^{+/+}$ Mäusen und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen extrahiert und über eine Folchextraktion entsalzt. Die qualitative und quantitative Analyse erfolgte im Massenspektrometer. Die unterschiedlichen Fettsäurewerte einer Lipidart werden

mit der $[M+H]^+$ Zahl angegeben, d.h. M steht dabei für die Masse der Fettsäure einer Lipidart, die in einer protonierten Form vorliegt und als positive Ladung des gemessenen Ions angegeben wird. Die dahinterstehende Zahl gibt die genaue Masse der Fettsäure einer Lipidart mit dem Wasserstoffion wieder. Für die quantitative Analyse war die Zugabe von internen Standards notwendig. Diese Analyse wurde von PD Dr. Matthias Eckhardt, Dr. Hany Farawanah und Prof. Dr. Roger Sandhoff durchgeführt.

Es wurden die Ceramide mit den Fettsäurelängen C16:0 $[M+H]^+$ 538,5, C18:0 $[M+H]^+$ 566,6, C20:0 $[M+H]^+$ 594,6, C22:0 $[M+H]^+$ 622,6, C24:1 $[M+H]^+$ 648,6 und C24:0 $[M+H]^+$ 650,6 im Gehirn, in der Leber und in der Niere von CerS2^{+/+} Mäusen ermittelt. Im Gehirn von CerS2^{+/+} Mäusen kam am häufigsten C18:0 Ceramid vor, wohingegen C22:0, C24:0 und C24:1 Ceramid nur in geringen Mengen gefunden werden konnten. Im Gehirn von CerS2^{gt/gt} Mäusen nahmen C22:0, C24:0 und C24:1 Ceramid vollständig ab, wohingegen C20:0 Ceramid 5,5-fach erhöht war (Abb. 4.12 und 4.13 A). In der CerS2^{+/+} Leber und der CerS2^{+/+} Niere kamen die langkettigen Fettsäuren am stärksten vor. In der Leber und der Niere der CerS2^{gt/gt} Mäuse waren die langkettigen Ceramide (C22:0, C24:0 und C24:1) stark erniedrigt, wohingegen C16:0 Ceramid um das 7,5-fache in der Leber und 2,9-fache in der Niere anstieg (Abb 4.12 und 4.13 D und G).

Es wurden die Hexosylceramide mit den Fettsäurelängen C16:0 $[M+H]^+$ 700,6, C18:0 $[M+H]^+$ 728,6, C20:0 $[M+H]^+$ 756,5, C22:0 $[M+H]^+$ 784,5, C24:1 $[M+H]^+$ 810,5 und C24:0 $[M+H]^+$ 812,5 im Gehirn, in der Leber und in der Niere von CerS2^{+/+} Mäusen ermittelt.

In der Leber und der Niere stellte Hexosylceramid das Glukosylceramid dar, wohingegen im Gehirn Hexosylceramid hauptsächlich Galaktosylceramid sowie in geringen Mengen Glukosylceramid repräsentiert. Wie bei Ceramid wurde C16:0 Hexosylceramid in der Niere der CerS2^{gt/gt} Mäuse um das 2,9-fache, in der Leber der CerS2^{gt/gt} Mäuse um das 3,2-fache und das C18:0 Hexosylceramid im Gehirn der CerS2^{gt/gt} Mäuse um das 4-fache erhöht, wohingegen C22:0, C24:0 und C24:1 Hexosylceramid (in der Leber = C24:1 um 98,5 %, in der Niere um 6,7 % und im Gehirn um 96,7 %) verringert wurden (Abb. 4.12 und 4.13 B, E und H).

Es wurden die Sphingomyeline mit den Fettsäurelängen C16:0 $[M+H]^+$ 703,5, C18:0 $[M+H]^+$ 731,5, C20:0 $[M+H]^+$ 759,6, C22:0 $[M+H]^+$ 787,6, C24:1 $[M+H]^+$ 813,6 und C24:0 $[M+H]^+$ 814,6 im Gehirn, in der Leber und in der Niere von CerS2^{+/+} Mäusen ermittelt. In der Leber und der Niere der CerS2^{gt/gt} Mäuse wurden wie bei Ceramid die Sphingomyeline mit den Fettsäurelängen C22:0, C24:1 und C24:0 stark erniedrigt (Leber: C22:0 = um 88,4 %; C24:1 = um 90,8 %; C24:0 = um 59 % und Niere: C22:0 = um 84 %; C24:1 = um 96,5 %; C24:0 =

35 %). Dagegen wurde das Sphingomyelin mit der Fettsäurelänge C16:0 in der Niere bzw. in der Leber (1,9-fach bzw. 3,1-fach) erhöht. Im Gehirn der CerS2^{gt/gt} Mäuse kam es weder bei C16:0 Sphingomyelin noch bei C18:0 Sphingomyelin zu einer Erhöhung (Abb 4.12 und 4.13 C, F und I).

4.1.8.2 Analyse der komplexen Sphingolipide sowie der Phospholipide im Gehirn und in der Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen anhand von Dünnschichtchromatographien

Zur Analyse der neutralen und anionischen Sphingolipide wurden die Lipide aus der Leber (Abb. 4.14) und dem Gehirn (Abb. 4.16) von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen extrahiert, in neutrale und anionische Lipidfraktionen getrennt und mit Dünnschichtchromatographien analysiert. Zur Analyse der Triacylglycerine wurden die Lipide aus der Leber und dem Gehirn von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen extrahiert und über eine Folch-Extraktion aufgereinigt und mit Dünnschichtchromatographien analysiert. Die Gehirne der CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäuse waren 7 Tage, 6-7 Wochen und 11 Monate alt, wohingegen die Leber von 6-7 Wochen und 11 Monate alten Mäusen stammt.

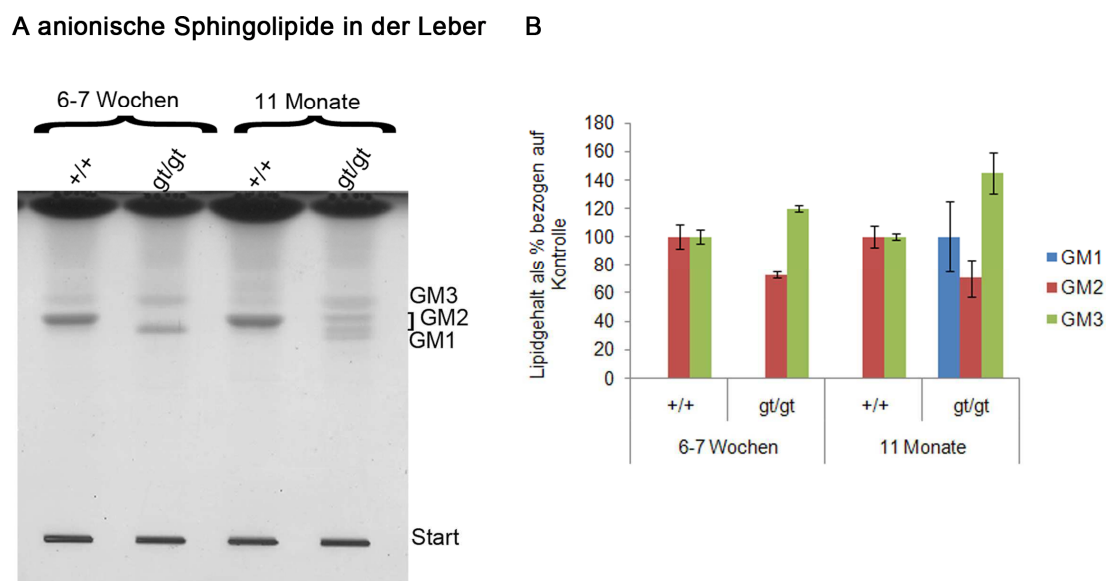


Abb. 4.14: Anionische Sphingolipide der Leber von 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen. **A** Dünnschichtchromatographie der anionischen Sphingolipide von 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{+/+} (+/+) und CerS2^{gt/gt} (gt/gt) Mäusen. In 6-7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen konnte eine Erhöhung von GM3 beobachtet werden sowie die Bildung einer veränderten Form von GM2. In 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurde GM3, die veränderte Form von GM2 und GM1 stärker gebildet, wohingegen GM2 abnahm. **B** Graphische Darstellung der Dünnschichtchromatographien. Die Analyse der anionischen Sphingolipide wurde mit drei 6-7 Wochen drei 11 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die Standardabweichung war als SEM (Mittelwert des Standardfehlers) dargestellt.

Bei der Analyse der Dünnschichtchromatographie der anionischen Sphingolipide zeigte sich in der 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{+/+} Leber, daß hauptsächlich GM2 (1.Form GM2) und GM3 vorkam. In der Leber von 6-7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurde eine veränderte Form von GM2 (2.Form GM2) gebildet, das in CerS2^{+/+} Mäusen vorkommende GM2 konnte in CerS2^{gt/gt} Mäusen nicht mehr nachgewiesen werden. Zur Analyse der veränderten Form von GM2 müsste die Massenspektroskopie eingesetzt werden. Die Gesamtmenge des anionischen Sphingolipids GM2 nahm um 28,7 % ($\pm 2,4$) ab. Zusätzlich wurde eine Erhöhung von GM3 (+20,2 % ($\pm 2,4$)) beobachtet. In den 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen zeigte sich eine Abnahme der GM2 Gesamtmenge um 29,6 % ($\pm 13,0$). Die zweite Form des anionischen Sphingolipids GM2 wurde gebildet, jedoch lag die erste Form des anionischen Sphingolipids in geringerer Menge als in den CerS2^{+/+} Mäusen vor. Zusätzlich konnte GM1 sowie eine Erhöhung von GM3 (100,0 % ($\pm 25,0$)) in CerS2^{gt/gt} Mäusen im Gegensatz zu den CerS2^{+/+} Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.14 A; B und Tab. 4.1).

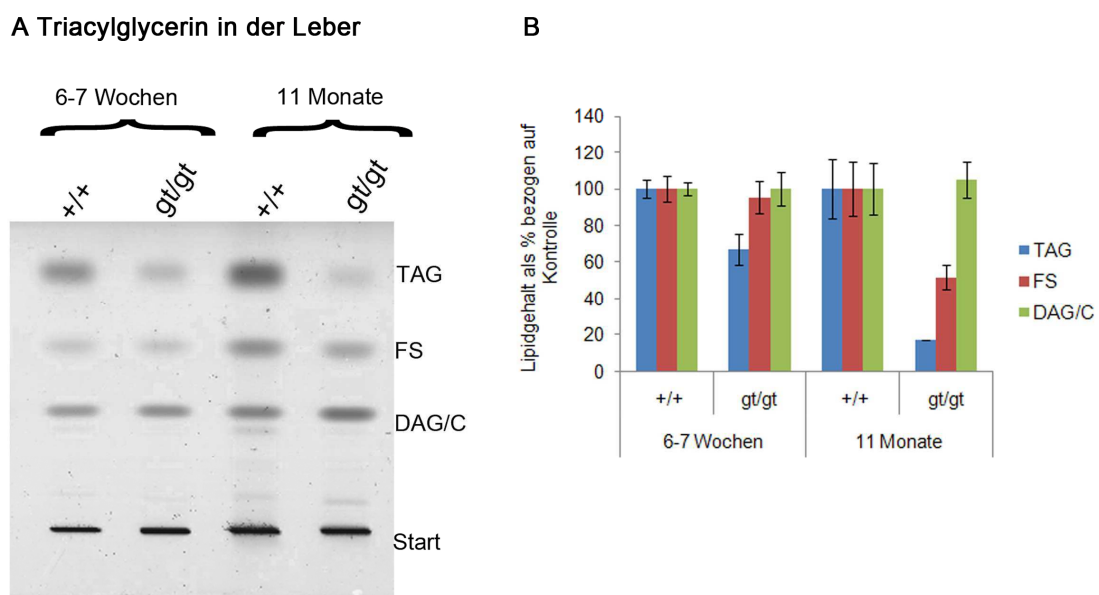


Abb. 4.15: Dünnschichtchromatographie von Triacylglycerin in der Leber von 6-7 Wochen und 11 Monate alten Mäusen. In der Leber der 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäuse (gt/gt) wurde eine Abnahme von Triacylglycerin (TAG) im Vergleich zu CerS2^{+/+} (+/+) beobachtet. Die Menge von Diacylglycerin und Cholesterol (DAG/C) in CerS2^{gt/gt} Mäusen zeigte im Vergleich zu den CerS2^{+/+} Mäusen keinen Unterschied. **B** Graphische Darstellung der Dünnschichtchromatographie. Diese Analyse wurde mit sechs 6-7 alten Wochen Mäusen sowie mit drei 11 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die Standardabweichung war als SEM (Mittelwert des Standardfehlers) dargestellt.

Bei der Betrachtung des Triacylglycerins konnte in 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen im Gegensatz zu den CerS2^{+/+} Mäusen in der Leber eine deutliche Abnahme (-33,1 % (±8,3) und -83,0 % (±0)) festgestellt werden. Zusätzlich konnte eine Abnahme der freien Fettsäuren (-48,2 % (±6,9)) in 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen nachgewiesen werden. Bei der Menge an Diacylglycerin und Cholesterol konnte kein Unterschied in 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 4.15 und Tab. 4.1).

Lipid	Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 6-7 Wochen alten CerS2 ^{gt/gt} zu CerS2 ^{+/+} Mäusen in der Leber	Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 11 Monate alten CerS2 ^{gt/gt} zu CerS2 ^{+/+} Mäusen in der Leber
	[%]	[%]
GM1	0	+100,0 (±25,0)
GM2	-28,7 (±2,4)	-29,6 (±13,0)
GM3	+20,2 (±2,4)	+44,4 (±14,0)
Triacylglycerin	-33,1 (±8,3)	-83,0 (±0)
freie Fettsäure	-4,7 (±9,0)	-48,2 (±6,9)
Diacylglycerin/ Cholesterol	-0,3 (±9,1)	+5,0 (±9,8)

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen zu CerS2^{+/+} Mäusen in der Leber.

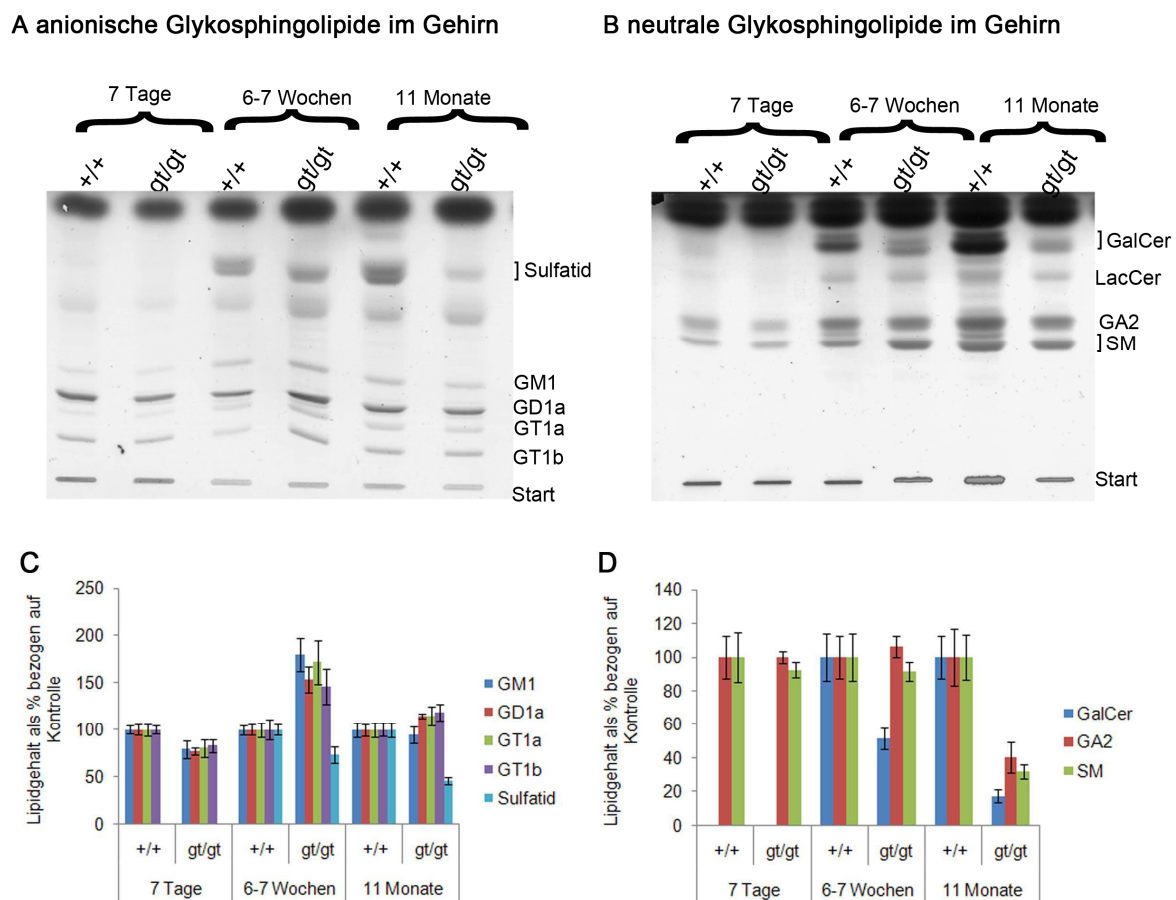


Abb. 4.16: Neutrale und anionische Sphingolipide im Gehirn von 7 Tage, 6-7 Wochen und 11 Monate alten $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. **A** Dünnschichtchromatographie der anionischen Sphingolipide. In 7 Tage alten $CerS2^{gt/gt}$ (gt/gt) Mäusen waren die anionischen Sphingolipide (GM1, GD1a, GD1b und GT1b) schwach erniedrigt, wohingegen sie in 6-7 Wochen alten $CerS2^{gt/gt}$ (gt/gt) Mäusen im Vergleich zu den $CerS2^{+/+}$ Mäusen ($+/+$) erhöht waren. **B** Dünnschichtchromatographie der neutralen Sphingolipide. In 6-7 Wochen und 11 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) wurden im Vergleich zu den $CerS2^{+/+}$ Mäusen ($+/+$) die langkettigen Sphingomyeline (SM), Sulfatide und Galaktosylceramide (GalCer) verringert, wohingegen die kurzkettigen Sulfatide und Galaktosylceramide erhöht wurden. In 11 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen zeigte sich eine Abnahme von langkettigen Galaktosylceramiden, Sphingomyelinen und Sulfatiden sowie eine Abnahme von kurzkettigen Sphingomyelinen, Sulfatiden und Galaktosylceramiden. **C-D** Graphische Darstellung der Dünnschichtchromatographien. Die Analyse der anionischen Sphingolipide wurde mit drei 7 Tage alten Mäusen, vier 6-7 Wochen alten Mäusen und drei 11 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die Analyse der neutralen Sphingolipide wurde mit zwei 7 Tage alten Mäusen, vier 6-7 Wochen alten Mäusen und drei 11 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die Standardabweichung war als SEM (Mittelwert des Standardfehlers) dargestellt.

Bei der Analyse der Dünnschichtchromatographien der anionischen Sphingolipide des Gehirns wurden die Gehirnlipidextrakte der $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse im Alter von 7 Tagen, 6-7 Wochen und 11 Monaten untersucht (Abb. 4.16 A, C und und Tab. 4.2).

Bei 7 Tage alten Mäusen zeigte sich im Gehirn von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen kein Sulfatid, jedoch konnten die anionischen Sphingolipide GM1, GD1a, GD1b und GT1b nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen 7 Tage alten CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen schien eine schwache Abnahme von GM1, GD1a, GD1b und GT1b (-21,0 % ($\pm 9,6$), -23,3 % ($\pm 3,4$), -19,7 % ($\pm 9,5$) und -17,3 % ($\pm 7,0$)) erkennbar zu sein. Im Alter von 6-7 Wochen kam es zu einer Erhöhung der anionischen Sphingolipide GM1, GD1a, GD1b und GT1b (+79,3 % ($\pm 17,3$), +53,7 % ($\pm 13,3$), +71,9 % ($\pm 23,0$) und +60,9 % ($\pm 16,9$)) im Gehirn von CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen. Zusätzlich konnte im CerS2^{gt/gt} Gehirn eine Verschiebung der Fettsäurezusammensetzung von Sulfatid zum CerS2^{+/+} Gehirn beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass sich die Fettsäurezusammensetzung von den langkettigen Sulfatiden zu den kurzkettigen Sulfatiden verschoben hat. In 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurde eine geringfügige Erhöhung der anionischen Sphingolipide GD1a, GT1a und GT1b (+18,6 % ($\pm 8,5$), um +19,1 % ($\pm 2,2$) und +15,2 % ($\pm 2,7$)) bestimmt. Zusätzlich kam es in dieser Altersstufe zur Abnahme von Sulfatid (-54,3 % ($\pm 3,8$)).

Bei der Analyse der Dünnschichtchromatographien der neutralen Gehirn Sphingolipide wurden CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Lipidextrakte im Alter von 7 Tagen, 6-7 Wochen und 11 Monaten untersucht (Abb. 4.16 B, D und Tab. 4.2). Bei 7 Tage alten CerS2^{+/+} Mäusen wurden nur kurzkettige Sphingomyeline und GA2 nachgewiesen. Laktosylceramid und Galaktosylceramid konnte in den 7 Tage alten CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Gehirnen nicht bestimmt werden. Beim Vergleich von CerS2^{+/+} und CerS2^{gt/gt} Mäusen konnten in der Lipidzusammensetzung keine Unterschiede festgestellt werden.

Im Gehirn von 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen konnte eine Abnahme von Galaktosylceramid (-48,2 % ($\pm 6,5$) und -82,7 % ($\pm 4,5$)) festgestellt werden, wohingegen kein Unterschied in der Sphingomyelin Menge in CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen festgestellt werden konnte. Wie in den massenspektroskopischen Analysen von 10 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen (siehe Abb.4.12) konnte eine Erhöhung von kurzkettigen Galaktosylceramiden, sowie die Abnahme von langkettigen Sphingomyelinen und Galaktosylceramiden beobachtet werden. Die Erhöhung bzw. die Abnahme der kurzkettigen bzw. langkettigen Galaktosylceramide zeichnete sich durch eine Verschiebung der Lipidmuster auf den Dünnschichtchromatographien ab. Das anionischen Sphingolipid GA2 nahmen um 59,6 % ($\pm 9,1$) in 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen ab.

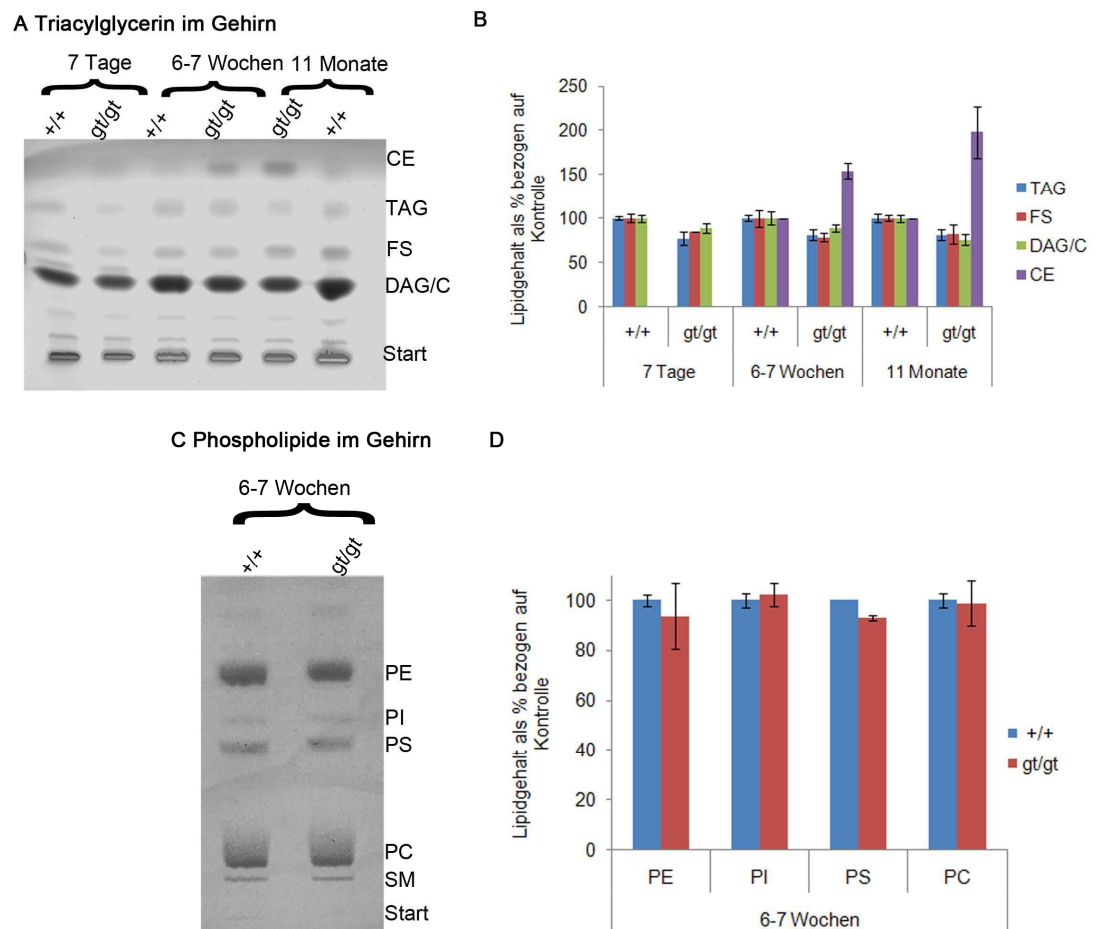


Abb. 4.17: Phospholipide im Gehirn von 7 Tage, 6-7 Wochen und 11 Monate alten $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. **A** Dünnschichtchromatographie der nicht klassischen Phospholipide. Bei den nicht klassischen Phospholipiden kam es zu einer Abnahme von Triacylglycerin (TAG), Diacylglycerin und Cholesterol (DAG/C) sowie der freien Fettsäuren (FS) in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) im Vergleich zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen (+/+). **B** Graphische Darstellung der Triacylglycerin-Dünnschichtchromatographie. **C** Dünnschichtchromatographie der klassischen Phospholipide. Im Vergleich von 6-7 Wochen alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) zu den gleichaltrigen $CerS2^{+/+}$ Mäusen (+/+) konnte keine Veränderung im Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylcholin (PC) beobachtet werden. **D** Graphische Darstellung der Phospholipid-Dünnschichtchromatographie. Die Analyse wurde mit drei 7 Tage alten Mäusen, vier 6-7 Wochen und drei 11 Monate alten Mäusen durchgeführt. Die Standardabweichung war als SEM (Mittelwert des Standardfehlers) dargestellt.

Die Phospholipide teilen sich in die nicht klassischen Phospholipide (Triacylglycerin und Diacylglycerin) und die klassischen Phospholipide auf.

Die nicht klassischen Phospholipide wurden in 7 Tage, 6-7 Wochen und 11 Monate alten $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen untersucht. In allen drei Altersstufen wurde eine Abnahme von Triacylglycerin, freien Fettsäuren sowie Diacylglycerin und Cholesterol in den $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen festgestellt (7 Tage = -23,0 % ($\pm 7,6$), -16,0 % (± 0) und -10,9 % ($\pm 5,8$); 6-7 Wochen =

-17,0 % ($\pm 9,0$), -24,5 % ($\pm 13,5$) und -20,5 % ($\pm 4,5$); 11 Monate = -16,5 % ($\pm 6,2$), -18,0 % ($\pm 10,8$) und -24,6 % ($\pm 6,2$). Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme von Cholesterolester (+56,6 % ($\pm 12,5$) und 98,7 % ($\pm 29,1$)) in CerS2^{gt/gt} Mäusen in einem Alter von 6-7 Wochen und 11 Monaten nachgewiesen werden (Abb. 4.17 A-B).

Bei der Untersuchung der klassischen Phospholipide (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol) konnte bei 6-7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen CerS2^{+/+} Mäusen keine Veränderung bestimmt werden (Abb. 4.17 C-D).

Lipid	Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 7 Tage alten CerS2 ^{gt/gt} Mäusen zu CerS2 ^{+/+} Mäusen im Gehirn	Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 6-7 Wochen alten CerS2 ^{gt/gt} Mäusen zu CerS2 ^{+/+} Mäusen im Gehirn	Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 11 Monate alten CerS2 ^{gt/gt} Mäusen zu CerS2 ^{+/+} Mäusen im Gehirn
	[%]	[%]	[%]
GM1	-21,0 ($\pm 9,6$)	+79,3 ($\pm 17,3$)	-5,7 ($\pm 8,9$)
GD1a	-23,2 ($\pm 3,4$)	+53,7 ($\pm 13,3$)	+18,6 ($\pm 8,5$)
GT1a	-19,7 ($\pm 9,5$)	+71,9 ($\pm 23,0$)	+19,1 ($\pm 2,2$)
GT1b	-17,3 ($\pm 7,0$)	+60,7 ($\pm 16,9$)	+15,2 ($\pm 2,7$)
Sulfatid	0	-27,1 ($\pm 8,8$)	-54,3 ($\pm 3,8$)
Galaktosylceramid	0	-48,2 ($\pm 6,5$)	-82,7 ($\pm 4,5$)
SM	-7,7 ($\pm 6,1$)	-8,4 ($\pm 5,5$)	-67,8 ($\pm 4,2$)
GA2	0 ($\pm 3,2$)	+6,5 ($\pm 6,5$)	-59,6 ($\pm 9,1$)
Triacylglycerin	-23,0 ($\pm 7,6$)	-19,0 ($\pm 9,0$)	-16,5 ($\pm 6,2$)
freie Fettsäure	-16,0 (± 0)	-24,5 ($\pm 13,5$)	-18,0 ($\pm 10,8$)
Diacylglycerin/ Cholesterol	-10,9 ($\pm 5,8$)	-20,5 ($\pm 4,5$)	-24,6 ($\pm 6,2$)
Cholesterolester	n.b.	+56,6 ($\pm 12,5$)	+98,8 ($\pm 29,1$)
Phosphatidyl- ethanolamin	n.b.	-6,3 ($\pm 13,0$)	n.b.
Phosphatidylcholin	n.b.	-1,2 ($\pm 13,0$)	n.b.
Phosphatidylserin	n.b.	-7,0 ($\pm 1,0$)	n.b.
Phosphatidylinositol	n.b.	+2,3 ($\pm 4,5$)	n.b.

Tab. 4.2: Zusammenfassung der Veränderungen der Sphingolipide und Phospholipide in 7 Tage, 6-7 Wochen und 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen zu CerS2^{+/+} Mäusen im Gehirn. n.b = nicht bestimmt, SM = Sphingomyelin.

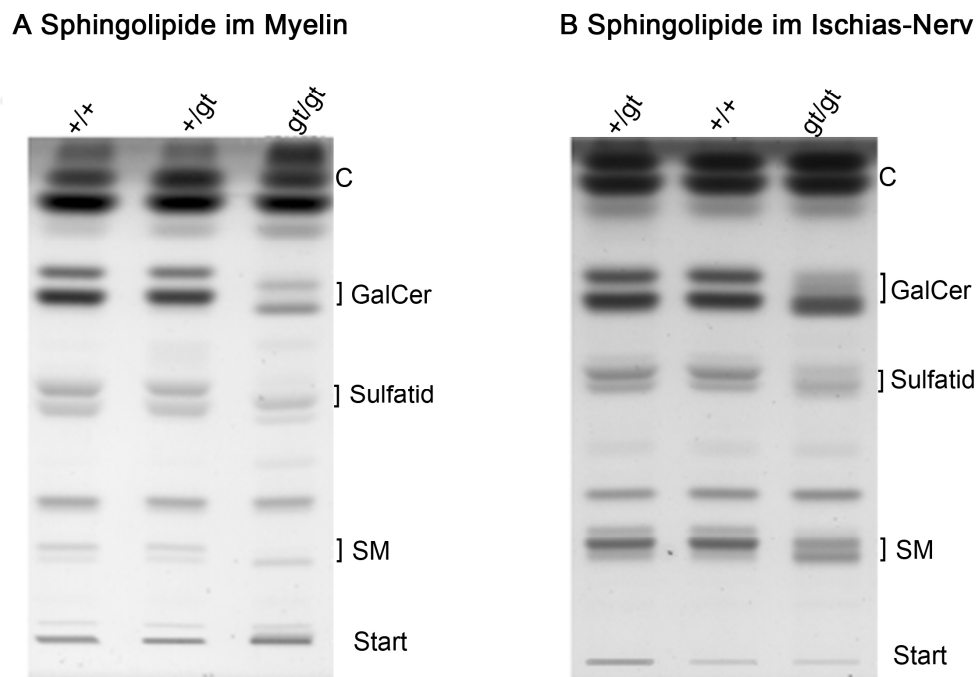


Abb. 4.18: Sphingolipide im Myelin und dem Ischias-Nerv von 10 Wochen alten $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. A Dünnschichtchromatographie der Sphingolipide im Myelin.

B Dünnschichtchromatographie der Sphingolipide im Ischias-Nerv. Bei den langkettigen Galaktosylceramiden (GalCer), Sulfatiden und Sphingomyelinen (SM) im Myelin und im Ischias-Nerv kam es zu einer Abnahme und zur Erhöhung deren kurz-kettigen Sphingolipide in $CerS2^{gt/gt}$ (gt/gt) im Vergleich zu den $CerS2^{+/+}$ (+/+) und $CerS2^{+/gt}$ Mäusen (+/gt). C = Cholesterol. (in Kooperation mit PD Dr. Matthias Eckhardt und Dr. Hany Farawanah).

Die Sphingolipide wurden im aufgereinigten Myelin und im Ischias-Nerv von 10 Wochen alten $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen untersucht (Abb. 4.18 A- B). Im Vergleich der $CerS2^{+/+}$ mit den $CerS2^{+/gt}$ Mäusen konnte kein Unterschied im Lipidmuster festgestellt werden. In den $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen konnte im Vergleich zu den $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{+/gt}$ im aufgereinigten Myelin und im Ischias-Nerv eine Abnahme der langkettigen Galaktosylceramide, Sulfatide und Sphingomyeline festgestellt werden, wohingegen bei den kurz-kettigen Galaktosylceramiden, Sulfatiden und Sphingomyelinen eine Erhöhung nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Menge des kompakten isolierten Myelins von 10 Wochen alten $CerS2^{+/+}$, $CerS2^{+/gt}$ gegenüber $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen signifikant erniedrigt war (Tab. 4.3).

Genotyp	kompaktes Myelin
	[mg Myelin Trockengewicht/ mg Gehirn Feuchtgewicht]
CerS2 ^{+/+}	15,5±1,1
CerS2 ^{+/gt}	15,4±1,0
CerS2 ^{gt/gt}	7,0±1,1

Tab. 4.3: Menge des kompakten Myelins von CerS2^{+/+}, CerS2^{+/gt} und CerS2^{gt/gt} Mäusen. Die Analyse wurde mit jeweils drei Tieren durchgeführt. Angegeben wurde der Mittelwert ± Standardabweichung.

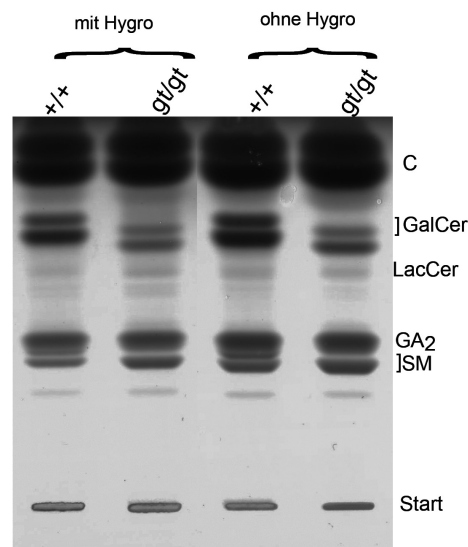


Abb. 4.19: Dünnschichtchromatographie der neutralen Sphingolipide von CerS2^{gt/gt} Hygro und CerS2^{gt/gt del Hygro} Mäusen. Beim Vergleich der beiden „Gene Trap“ Mauslinien konnte im Lipidmuster kein Unterschied festgestellt werden. Langkettige Galaktosylceramide (GalCer) und Sphingomyeline (SM) wurden erniedrigt, wohingegen sich kurzkettige Galaktosylceramide und Sphingomyeline erhöhten. C = Cholesterol, LacCer = Laktosylceramid.

Die Dünnschichtchromatographien von Leber, Gehirn, Myelin und Ischias-Nerv wie auch die massenspektrometrischen Analysen (Kap. 4.1.8.1) wurden an CerS2^{gt/gt} Hygro Mäusen durchgeführt. Es wurde ein Vergleich der neutralen Gehirn Sphingolipide von CerS2^{gt/gt} Hygro Mäusen mit CerS2^{gt/gt del Hygro} Mäusen in einem Alter von 6-7 Wochen durchgeführt, da der PGK-Promotor einen Einfluss auf die Transkriptmenge des *CerS2* Gens und somit auf das Lipidmuster haben könnte. In diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass die langkettigen Galaktosylceramide (GalCer) und Sphingomyeline (SM) sowohl in den CerS2^{gt/gt} Hygro Mäusen als auch in den CerS2^{gt/gt del Hygro} Mäusen erniedrigt werden, wohingegen die kurzkettigen Galaktosylceramide erhöht sind. Das Lipidmuster der neutralen Sphingolipide änderte sich bei den beiden Mauslinien nicht (Abb. 4.19).

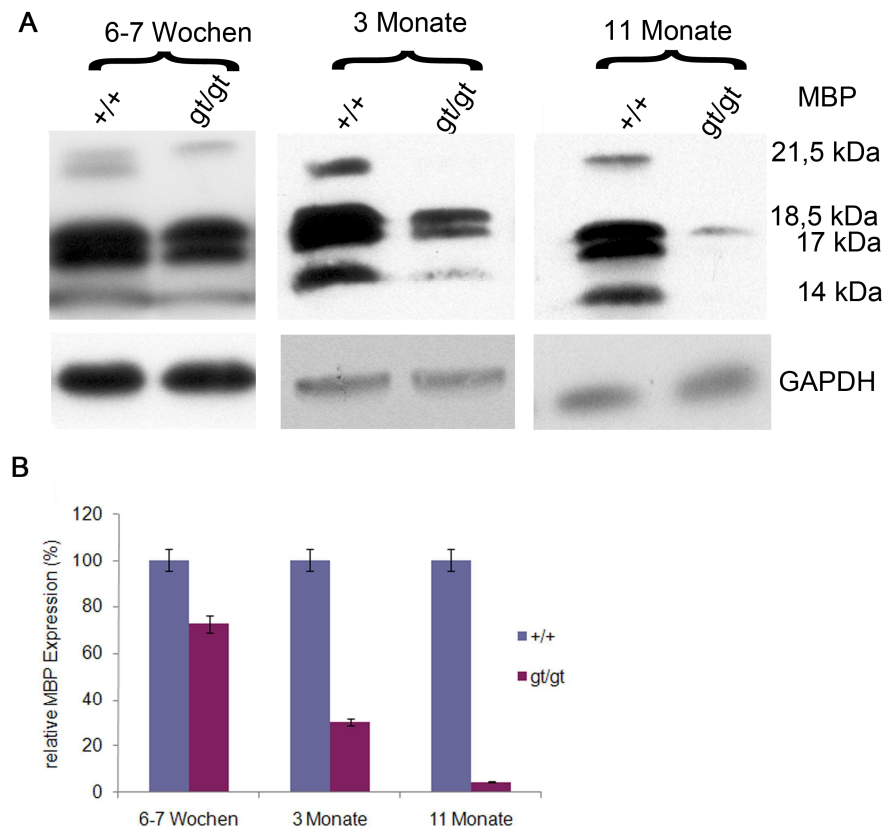
4.1.9 Expression des Myelin basischen Proteins in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen

Abb. 4.20: Die Expression des Myelin basischen Proteins (MBP) in 6-7 Wochen, 3 Monate und 11 Monate alten $CerS2^{+/+}$ und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. **A** Immunoblot Analysen der MBP Expression im Gehirn von 7 Wochen, 3 Monate und 11 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen (gt/gt) im Vergleich zu $CerS2^{+/+}$ Mäusen ($+/+$). Das Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase Protein (GAPDH) wurde als Ladungsabgleich verwendet. **B** Quantitative Analyse zur MBP Expression im Gehirn in $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen. Die Analyse wurde mit drei Tieren durchgeführt, bis auf die 11 Monate alten Gehirne, die nur von zwei $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen stammten. Die Standardabweichung wurde mit SEM (standard error of the mean) dargestellt. Während des Alterns der $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse nahm die MBP Expression bis auf 7 % ab.

In 6-7 Wochen, 3 Monate und 11 Monate alten $CerS2^{+/+}$ Mäusen und $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen wurde die MBP Expression im Gehirn anhand von Immunoblot Analysen untersucht. In $CerS2^{+/+}$ Mäusen konnten die unterschiedlichen MBP Isoformen (14 kDa, 17 kDa, 18,5 kDa und 21,5 kDa) nachgewiesen werden. Im Alter von 6 Wochen kam es zu einer Reduktion der MBP Expression um 35%. Die Reduktion der MBP Expression steigert sich im Alter von 3 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen bis auf 70%. Dabei konnte die 21,5 kDa große MBP Isoform im Gehirn der $CerS2^{gt/gt}$ Mäuse nicht mehr nachgewiesen werden. In 11 Monate alten $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen wurde die MBP Expression bis auf 7% reduziert, die sich auf die

reduzierte 18,5 kDa große Isoform beschränkt. Die MBP Expression nahm mit zunehmendem Alter in CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu den CerS2^{+/+} Mäusen ab (Abb. 4.20 A- B).

4.2 Erzeugung einer nicht konditionalen CerS4 defizienten Mausmutante

4.2.1 Herstellung des CerS4KILacZ nicht konditionalen Vektors

Bei der Herstellung des nicht konditionalen CerS4KILacZ Vektors wurde die Technik des ET clonings angewendet. Dabei lassen sich zwei Abschnitte unterteilen: 1. Erzeugung des Retrievalvektors und das anschließende Rekombinieren mit dem Lass4 BAC, wodurch ein Subklonvektor entsteht. 2. Erzeugung des Minitargetingvektors und anschließendes „Rekombinieren“ mit dem Subklonvektor. Die Klonierungsstrategie bestand aus sechs klassischen Klonierungsschritten sowie zwei Rekombinierungsschritten. Der Endvektor besitzt eine Größe von 19 kb. Der 5' Homologiebereich ist 5 kb lang, der 3' Homologiebereich ist 1,8 kb lang. Die kodierende Region wurde vollständig durch den Zielaustauschvektor ersetzt, da die genaue Funktion der einzelnen Domänen der Ceramidsynthase 4 noch nicht bekannt ist. In Abbildung 4.21 ist der Zielaustauschvektor schematisch dargestellt sowie in Abbildung 4.22 die mögliche homologe Rekombination in ES-Zellen und dem mutierten CerS4 Allel, das nach Flp-Rekombinase vermittelter Deletion in der Maus entsteht.

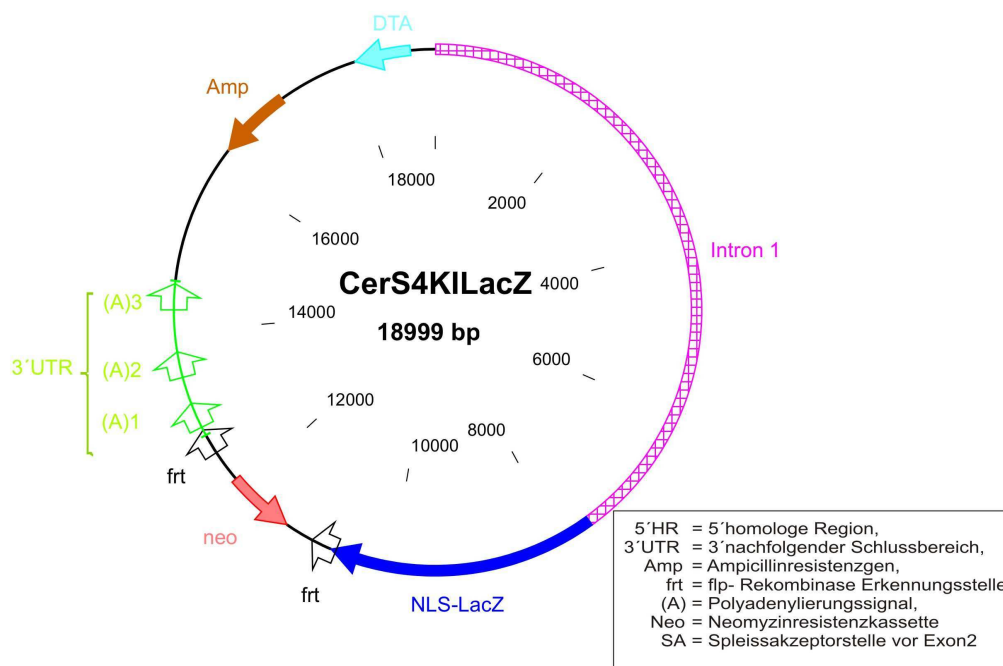


Abb. 4.21: Nicht konditionaler CerS4 Austauschvektor. Der dargestellte Vektor enthält einen 5' homologen Bereich, der 5 kb groß ist und aus einer Teilsequenz des Introns 1 besteht. Es folgt eine Sequenz des Spleissakzeptors vor Exon 2 des CerS4 Gens und die Sequenz des Reportergens NLS-LacZ, an die sich in invertierter Richtung der PGK-Promotor mit der Neomycinresistenzkassette für die positive Selektionierung in den ES-Zellen anschließt, die von 2 frt-Stellen flankiert wird. Nach der 3' frt Stelle folgen die drei Polyadenylierungssignale des CerS4 Gens, die die 3' homologe Region darstellen und 1,8 kb groß sind.

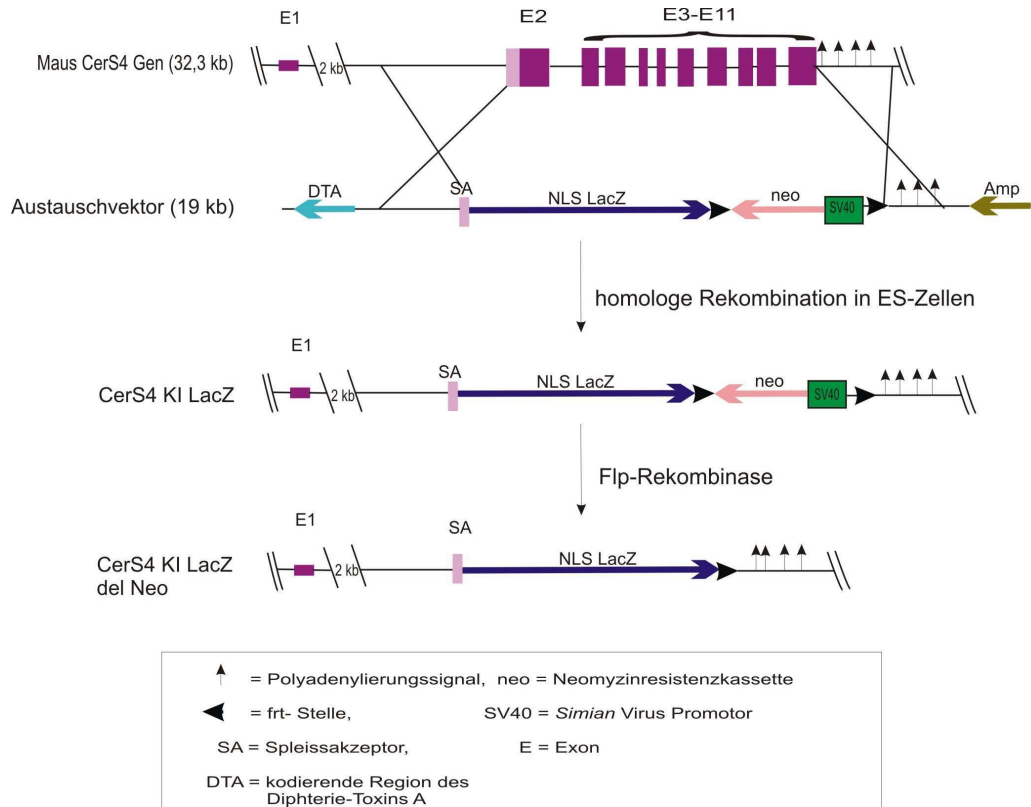


Abb. 4.22: Schematische Darstellung des Zielaustauschvektors sowie die mögliche homologe Rekombination in ES-Zellen und dem CerS4 Allel, das nach Flp-Rekombinase vermittelter Deletion in der Maus entsteht.

4.2.2 Analyse der CerS4 BAC Klone

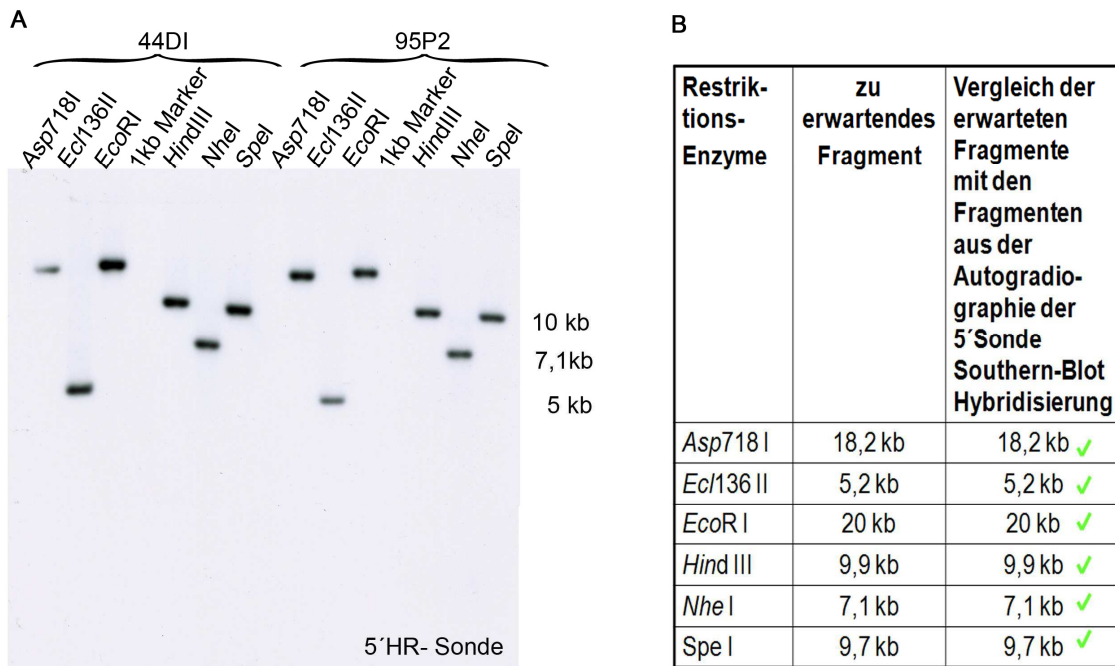


Abb. 4.23: Analyse der 5'Region des CerS4 Gens auf den CerS4 BAC Klonen. A Southern-Blot Hybridisierungen der zwei BAC Klone: 44DI, 95P2. B Zu erwartendes Restriktionsmuster des CerS4 Gens.

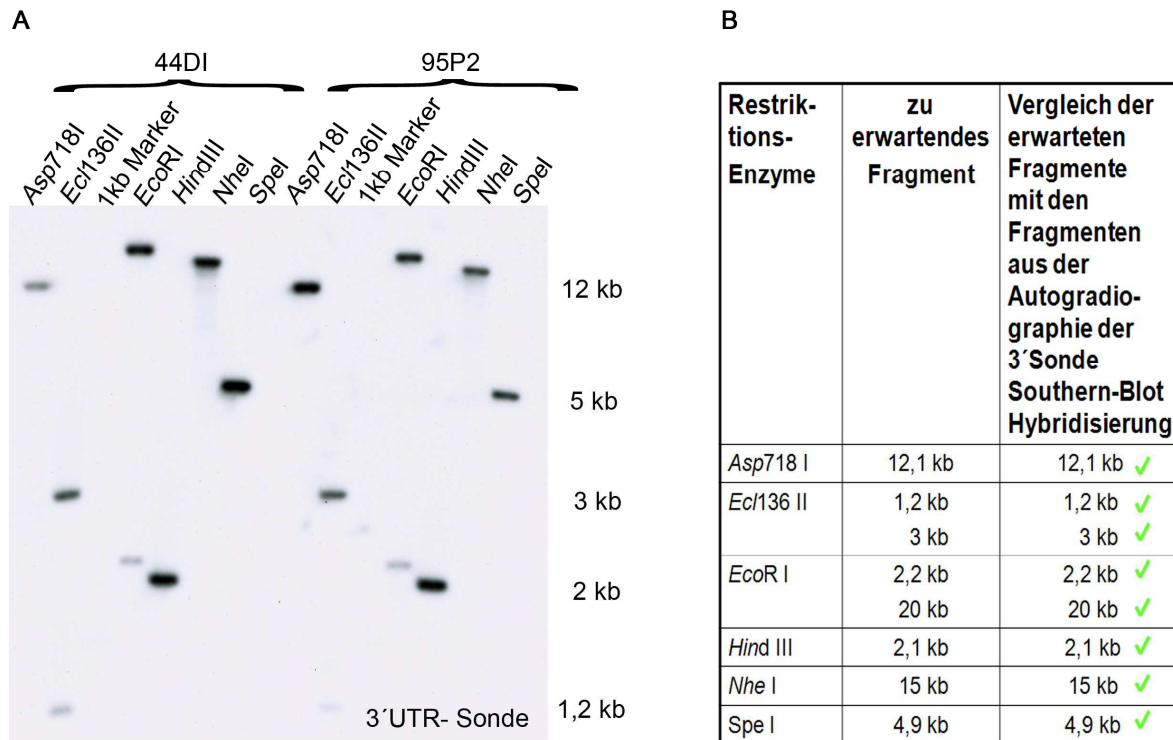


Abb. 4.24: Analyse der 3'Region des *CerS4* Gens auf den *CerS4* BAC Klonen. **A** Southern-Blot Hybridisierungen der zwei BAC Klone: 44DI, 95P2. **B** Zu erwartendes Restriktionsmuster des *CerS4* Gens.

Die zwei BAC Klone, 44DI und 95P2, wurden über Southern-Blot Analysen jeweils mit der 5'HR- und der 3'UTR- Sonde, die auch für die Cosmid-Analyse verwendet worden sind (Diplomarbeit, Imgrund 2007), charakterisiert.

Die 5'HR Southern-Blot Hybridisierung (Abb. 4.23) zeigte bei allen die erwarteten DNS-Fragmente der BAC Klone. Die 5'Southern-Blot Analyse deutete somit an, dass 11,5 kb der 5'homologen Region (Intron1 des *CerS4* Gens) vor der kodierenden Region sowie die kodierende Region des *CerS4* Gens in den BAC Klonen enthalten war.

Bei der 3'UTR Southern-Blot Hybridisierung (Abb.4.24) zeigte sich bei allen Spaltungen die erwarteten DNS-Fragmente der BAC Klone.

Die Charakterisierung der BAC Klone mit der 3'UTR-Sonde zeigte, dass die kodierende Region mit den vier Polyadenylierungssignalen des *CerS4* Gens (*NheI*) sowie ein nachfolgender 9,6 kb großer Sequenzbereich (*Asp718I*) enthalten war. Die beiden BAC Klone stellten sich als identische BAC Klone dar, da sie im Southern-Blot Gel wie auch bei der Hybridisierung ein identisches Fragment-Muster zeigten und konnten somit für die Klonierungsstrategie eingesetzt werden.

4.2.3 Klonierung des Retrievalvektors mit anschließendem „Rekombineering“

Der Retrievalvektor dient dazu, einen bestimmten Bereich, mit dem die Klonierung fortgeführt werden soll, in diesem Fall, einem Teil der Intron1-Sequenz, der kodierenden Region und einem Abschnitt des untranslatierten 3' Bereichs des *CerS4* Gens, aus dem *CerS4* BAC Klon subzuklonieren. Es wird somit ein Subklonvektor erzeugt. Der Retrievalvektor besteht aus zwei kurzen homologen Regionen, einer 5' homologen Region, die am Anfang des gewünschten Bereichs auf dem BAC Klon liegt, der in diesem Fall im Intron 1, 5051 bp vor dem Startkodon in Exon2 des *CerS4* Gens beginnt, und einer 3' homologen Region, die sich am Ende des gewünschten Bereichs auf dem BAC Klon befindet, in diesem Fall hinter dem dritten Polyadenylierungssignal im 3'UTR Bereich des *CerS4* Gens. Für das „Recombineering“ muss der Retrievalvektor zwischen den beiden kurzen homologen Regionen linearisiert werden. Die entsprechende Restriktionsschnittstelle soll am 3' Ende der 5' homologen Region sowie am 5' Ende der 3' homologen Region lokalisiert sein, um Sequenzänderungen zu vermeiden. Eine weitere Voraussetzung des Retrievalvektors ist, dass der Retrievalvektor ein anderes Resistenzgen als der BAC Klon aufweist, da mit diesem die Selektion beim „Recombineering“ durchgeführt wird. Der zukünftige Retrievalvektor kann eine Sequenz des Diphtherie Toxin A Proteins enthalten, die bei einer falschen homologen Rekombination in den ES-Zellen aktiviert wird und somit den Zelltod der ES-Zellen herbeiführt.

Für die Erzeugung des Retrievalvektors wurde eine Fusions-PCR verwendet. Diese bestand aus drei PCR Reaktionen. In der ersten PCR Reaktion wurde das 318 bp große 5'HR Amplikon durch eine PCR 5'HR_RV erzeugt, in der zweiten wurde ein 226 bp großes Amplikon, das dem Abschnitt des 3'UTRs entspricht, durch die PCR 3'HR_RV vervielfältigt. In der dritten PCR Reaktion 5'HR_3'HR_RV wurden die zwei Fragmente vereinigt und amplifiziert.

Dieses PCR Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Psp*OMI und *Sac*I geschnitten und in den pDTA Vektor, der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Psp*OMI und *Sac*I geschnitten und dephosphoryliert worden war, ligiert. Es entstand der Retrievalvektor. Zur Linearisierung des Retrievalvektors wurde das Restriktionsenzym *Nsi*I verwendet. Durch anschließendes „Recombineering“ zwischen dem BAC Klon und dem Retrievalvektor entstand der Subklonvektor (Abb. 4.25).

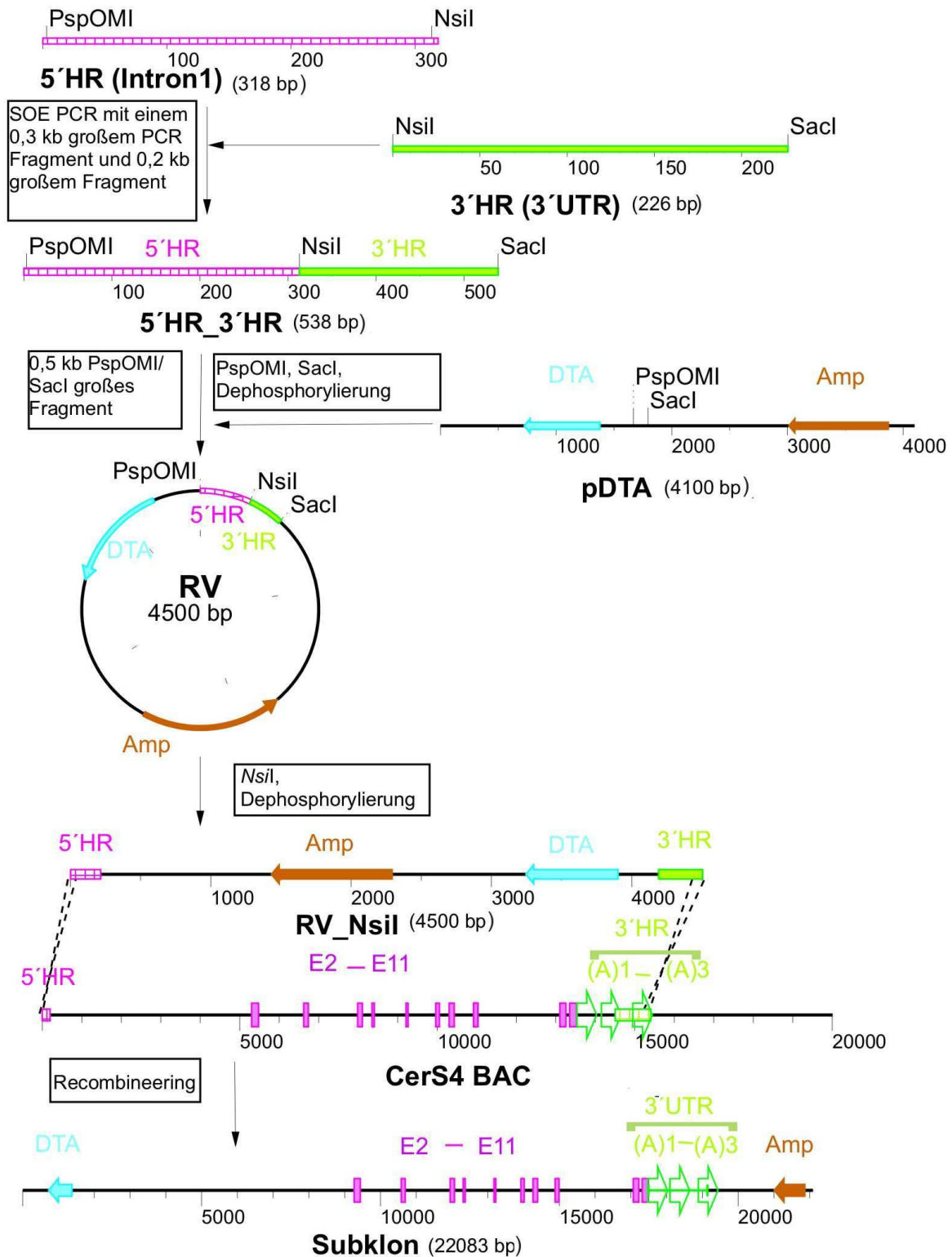


Abb.4.25: Klonierung des Retrievalvektors mit anschließendem „Rekombineering“ zwischen BAC Klon und Retrievalvektor zum Subklonvektor.

Amp = Ampizillin-Resistenzgen, DTA = Diphterie Toxin A, E = Exon, HR = homologe Region, SOE-PCR = Fusions-PCR, UTR = 3'nachfolgender Schlussbereich.

4.2.4 Klonierung des Minitargetingvektors mit anschließendem „Rekombineering“

Für die Klonierung des Minitargetingvektors wurde das *NLS-LacZ* Reporter-gen aus dem Vektor „NLS-LacZ_pBSK“ mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *DraI* ausgeschnitten, das 5'Ende mit der T4 Polymerase aufgefüllt und in den pBlueskript Vektor ligiert, der mit *EcoRI* geschnitten, dessen Enden mit der T4 Polymerase aufgefüllt und dephosphoryliert worden war. Es entstand der Vektor „NLS-LacZ_pBSK (ohne poly(A))“.

Vor das Reporter-gen wurde die Spleissakzeptor Sequenz kloniert, die vor Exon2 des *CerS4* Gens liegt, damit in der transgenen Maus dieselben Bedingungen bei der Expression des *NLS-LacZ* Gens wie auch bei der Expression des *CerS4* Gens herrschen. Desweiteren diente der Spleissakzeptor als 5'Homologie für das spätere „Rekombineering“.

Voraussetzung dabei ist, dass keine Änderung in der Spleissakzeptor Sequenz auftritt. Deshalb wurde eine Fusions-PCR verwendet. Diese bestand aus drei PCR Reaktionen. In der ersten PCR Reaktion wurde der Spleissakzeptor durch eine PCR SA erzeugt, in der zweiten wird ein 1 kb langes Fragment der β -Galactosidase Sequenz hergestellt. In der dritten PCR Reaktion SA_LacZ wurden die zwei Fragmente vereinigt und amplifiziert.

Dieses PCR Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *Asp718I* und *Clal* geschnitten und in den „NLS-LacZ_pBSK (ohne Poly(A))“ ligiert, der ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Asp718I* und *Clal* geschnitten und dephosphoryliert worden war. Es entstand der Vektor „SA_NLS LacZ_pBSK“.

Im nächsten Schritt wurde die *frt*-flankierte Neomycinresistenzkassette mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *BamHI* aus dem Vektor „loxP-*frt*-dual neo-*frt*-loxP“ ausgeschnitten und in den mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *BamHI* linearisierten SA_NLS-LacZ_pBSK“ eingebracht. Durch diese Ligation entstand der „SA_LacZ_neo“ Vektor. Der letzte Schritt für die Klonierung des Minitargetingvektors war die Einführung der kurzen 3'Homologie, die für das „Rekombineering“ erforderlich war.

Für die 3'homologe Region wurde durch eine PCR mit den beiden Oligonukleotidstartermolekülen 4_3'HR_RV_for und 4_3'HR_RV_rev ein 800 bp grosses PCR Fragment aus der 95P2 BAC DNS amplifiziert. Dieses PCR Produkt wurde nach einer *BamHI* und *BglII*- Spaltung in den " SA_LacZ_neo "-Vektor inkloniert, der vorher mit dem Restriktionsenzym *BamHI* gespalten worden war. Es entstand der Minitargetingvektor (Abb. 4.26). Die durch die Homologien flankierte Sequenz des β -Galaktosidasesgens und der Neomycinresistenzkassette wurde durch die Restriktionsenzyme *Asp718I* und *BamHI* vom Vektorrückgrat getrennt und für das anschließende „Rekombineering“ eingesetzt. Das „Rekombineering“ fand zwischen Subklonvektor und Minitargetingvektor ohne Vektorrückgrat statt. Die Selektion beim „Rekombineering“ beruht dabei auf der Kanamycinresistenzkassette des Minitargetingvektors. Es entstand der „Lass4KILacZ" Vektor (Abb. 4.27).

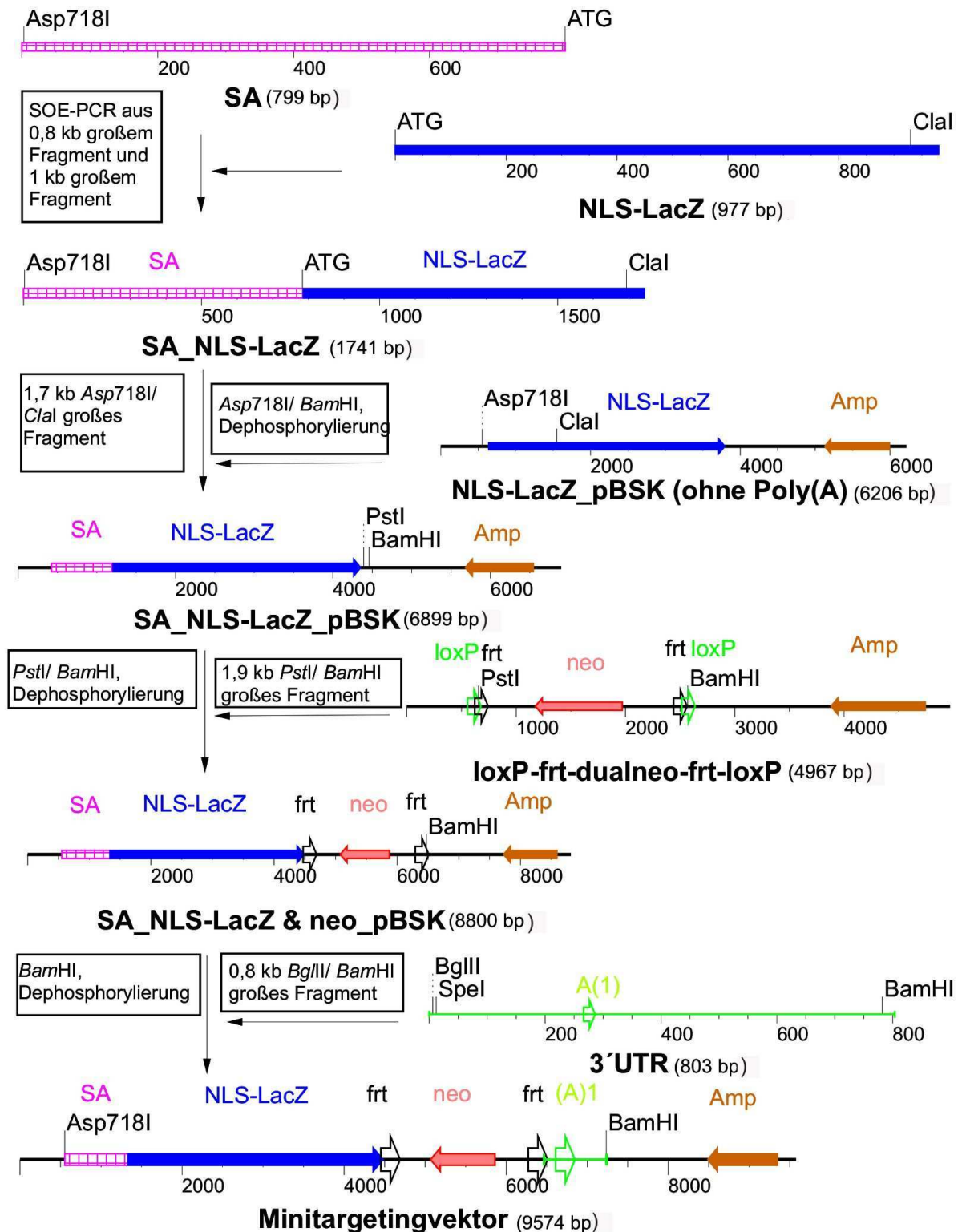


Abb. 4.26: Klonierung des Minitargetingvektors. (A) = Polyadenylierungssignal, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, neo = Neomycinresistenzkassette, frt = flp- Rekombinase Erkennungsstelle, SA = Spliceakzeptorstelle vor Exon2, SOE-PCR = Fusions-PCR, UTR = 3' nachfolgender Schlussbereich.

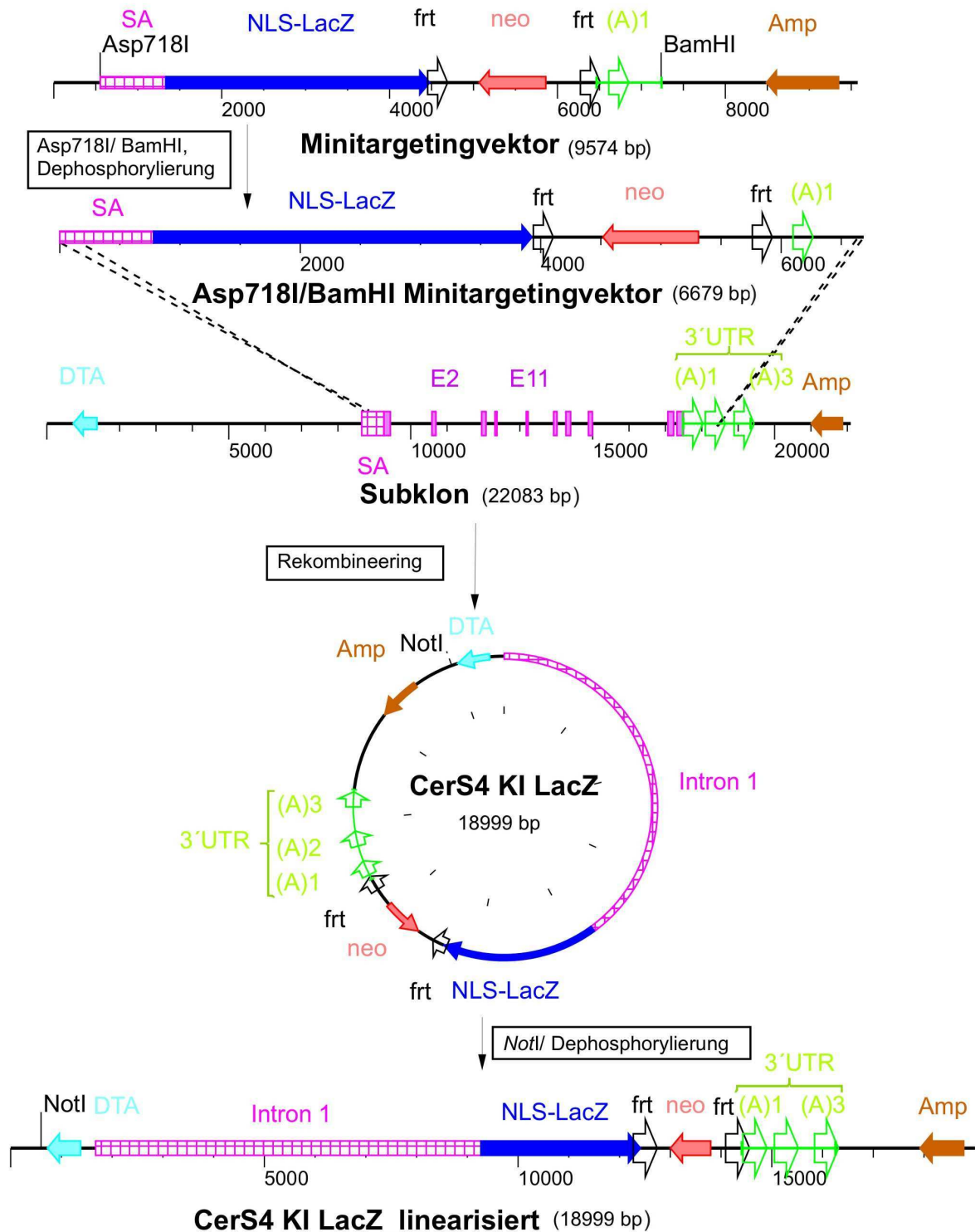
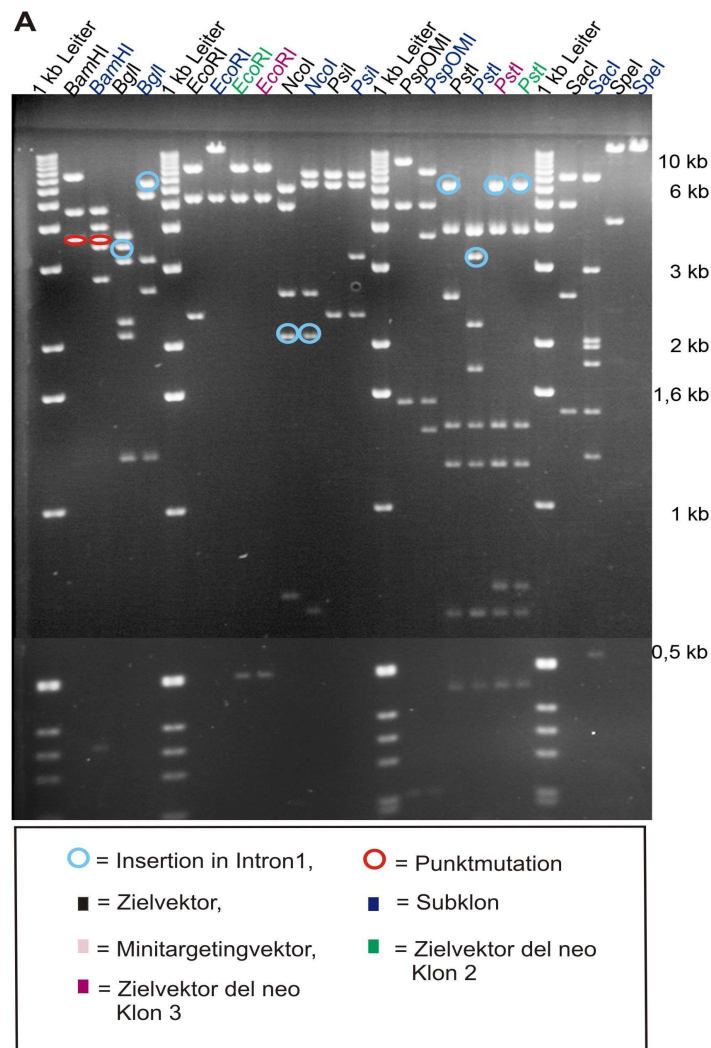


Abb. 4.27: „Rekombineering“ zwischen Minitargetingvektor und Subklonvektor. (A) = Polyadenylierungssignal, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, DTA = Diptherie Toxin A, E = Exon, neo = Neomycinresistenzkassette, frt = flp- Rekombinase Erkennungsstelle, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2, SOE-PCR = Fusions-PCR, UTR = 3' nachfolgender Schlussbereich.

Zur Überprüfung der korrekten Zusammensetzung des hergestellten Zielvektors CerS4KILacZ sowie des Subklonvektors, der als Kontrolle dient, wurden diese mehreren Kontrollrestriktionen unterworfen (Abb. 4.27). Zur Überprüfung der Funktionalität der *frt*-Stellen wurde der Zielvektor CerS4KILacZ in Flp-*E.coli* Bakterien transformiert und die isolierte Plasmid-DNS (CerS4KILacZ del neo) von den *E.coli* Bakterien zur Überprüfung der korrekten Zusammensetzung durch Restriktionsspaltungen nachgewiesen. Die erwarteten Fragmente des Zielvektors CerS4KILacZ, des Subklonvektors sowie der CerS4KILacZ del neo Vektoren stimmten bis auf einige Ausnahmen überein. Die Funktionalität der *frt*-Stelle in den CerS4KILacZ del neo Vektoren wurde somit bestätigt. Bei den *Bam*HI Restriktionsspaltungen des Zielvektors sowie des Subklonvektors war jeweils ein größeres Fragment vorhanden, das auf eine Punktmutation im Vektorrückgrat hindeutete. Bei den Restriktionsspaltungen mit *Bgl*I, *Pst*I und *Nco*I des Zielvektors CerS4KILacZ und des Subklonvektors waren die Fragmente auf dem Agarosegel größer als die erwarteten Fragmente, die in der Tabelle mit blauer Schrift dargestellt worden sind. Diese Fragmente befanden sich im Intron1 in benachbarter Lage. Sie deuteten somit auf eine Insertion im Intron1 hin. Die HM1 DNS besitzt einen 129SV/Ola genetischen Hintergrund, die digitale Sequenz des *CerS4* Gens basiert jedoch auf einem C57BCL/6 Hintergrund. Eine Insertion im 129SV/Ola Hintergrund könnte vorhanden sein, jedoch nicht im C57BCL/6 Hintergrund. Dies wurde anhand einer PCR I überprüft. Bei der PCR I wurde das Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül Lass4_I1 for mit dem Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül Lass4_I1 rev kombiniert. Das Amplikon der Zielvektor-, BAC Klon -, genomischen HM1 DNS mit dem 129 SV/Ola Hintergrund war 1100 bp groß, wohingegen das Amplikon der genomischen DNS mit dem C57BCL/6 Hintergrund nur ungefähr 700 bp groß war (Abb. 4.28). Sequenzierungen wurden im Spleissakzeptor, im 5'Bereich des LacZ Gens (PCR), 3'UTR sowie einem Teilbereich im Intron1 des *CerS4* Gens durchgeführt. Der Spleissakzeptor und der 5'Bereich des LacZ Gens wiesen keine Punktmutationen auf.

**B**

Restriktionsenzyme	Zielvektor CerS4KILacZ [bp]	Subklon [bp]	Zielvektor CerS4KILacZ del Neo [bp]
BamHI	324, 3135, 4746, 7791	324, 359, 2889, 3136, 3540, 4087, 4745	
BglII	147, 1267, 2121, 2268, 3186, 3255, 3752	147, 1267, 2660, 3187, 5320, 6499	
EcoRI	2327, 5652, 8290	5339, 13741	508, 5340, 8297
NcoI	703, 1810, 2599, 4899, 5985	654, 1810, 2600, 3220, 3288, 7508	
PspOMI	220, 1559, 4813, 9371	220, 1379, 1559, 3678, 4807, 7437	
PstI	2316, 6128, 7513	2315, 6128, 10637 (7513 bp+3124 bp)	
PstI	446, 632, 1197, 1409, 2531, 3841, 5940	157, 446, 632, 655, 1198, 1409, 1794, 2193, 2921, 3835, 3840	446, 632, 712, 1203, 1409, 3841, 5902
SacI	1501, 2557, 4946, 6953	17, 515, 1242, 1500, 2028, 2979, 3845, 6954	
SpeI	15957	4251, 14829	

Abb. 4.27: Charakterisierung des CerS4KILacZ Vektors. A Größenabhängige Auftrennung nach Restriktionsspaltungen. **B** Erwartete Fragmente, die mit der größenabhängigen Auftrennung nach den Restriktionsspaltungen übereinstimmen, bis auf die farbmarkierten Fragmente. Die blau markierten Fragmente zeigen eine Insertion im Intron1 des *CerS4* Gens, die rot markierten Fragmente deuten auf eine Punktmutation hin, wodurch ein vergrößertes Fragment bzw. zwei kleinere Fragmente entstehen.

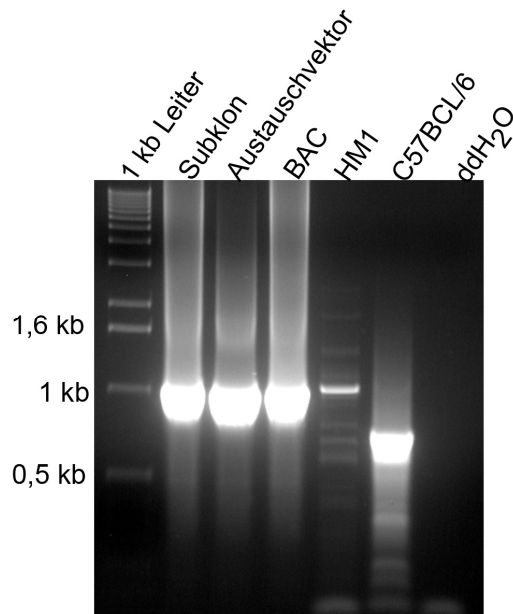


Abb. 4.28: PCR zur Überprüfung der zusätzlichen Insertion in Intron1 des *CerS4* Gens in der Austauschvektor-, BAC Klon-, genomischen HM1 DNS mit einem 129 SV/Ola Hintergrund im Gegensatz zur genomischen DNS mit einem C57BCL/6 Hintergrund.

4.2.5 Erzeugung des *CerS4* Testvektors

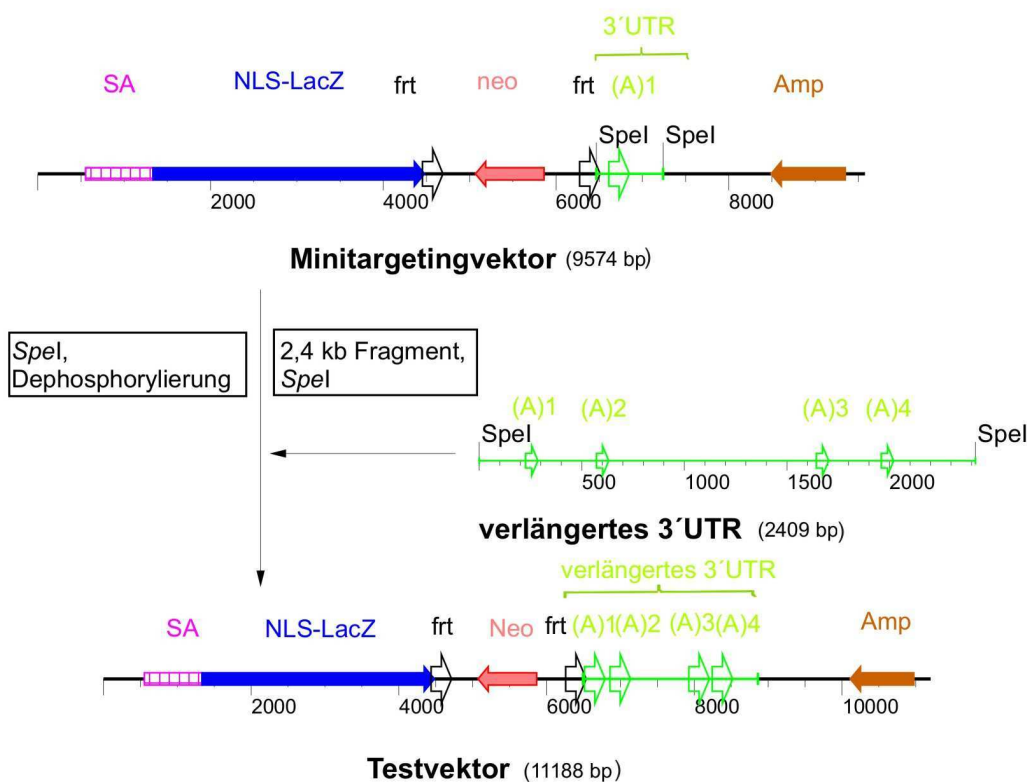


Abb. 4.29: Erzeugung des *CerS4* Testvektors. (A) = Polyadenylierungssignal, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, HR = homologe Region, neo = Neomycinresistenzkassette, frt = flp-Rekombinase Erkennungsstelle, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2, UTR = 3'nachfolgender Schlussbereich.

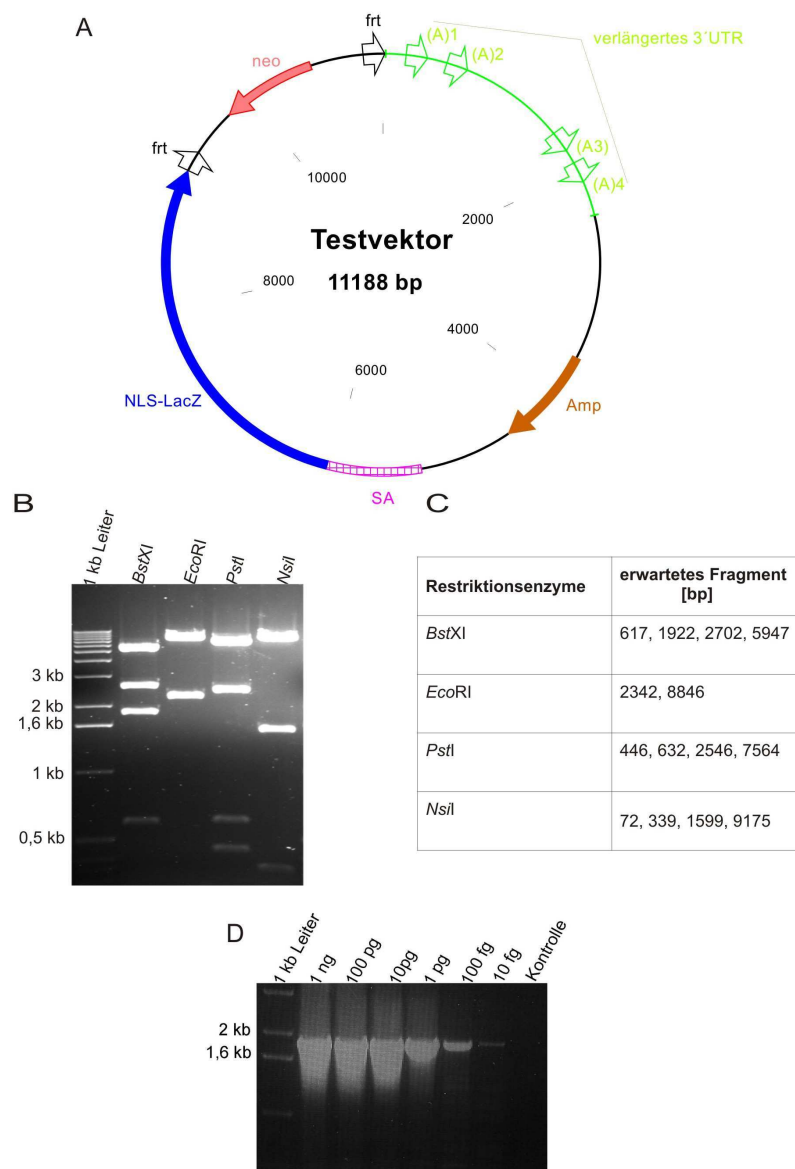


Abb. 4.30: Charakterisierung des PCR Testvektors sowie Etablierung der Test PCR. **A** Schematische Darstellung des „PCR Testvektors“. **B** Größenabhängige Auftrennung nach Restriktionsspaltungen, **C** Erwartete Fragmente, die mit der größenabhängigen Auftrennung nach den Restriktionsspaltungen übereinstimmen. **D** Etablierung der Test PCR. Amp = Ampizillin-Resistenzgen, neo = Neomycinresistenzkassette SA = Spleissakzeptor, (A) = Polyadenylierungssignal.

Mit Hilfe von PCR Analysen soll in den neomycinresistenten ES-Zellklonen die homologe Rekombination des Vektors „*CerS4* Austauschvektor“ mit dem entsprechenden Genlokus in embryonalen Stammzellen überprüft werden. Zur Etablierung einer solchen PCR wurde zunächst ein PCR Testvektor für den jeweiligen Knockout-Vektor hergestellt.

Zur Herstellung des PCR Vektors wurde ein mit Restriktionsschnittstellen versehenes *SpeI* verlängertes 3'HR Fragment mit den Oligonukleotidstärtermolekülen 3'HR_Test for und

3'HR_Test rev aus dem BAC amplifiziert. Das verlängerte 3'UTR Fragment enthält die vier Polyadenylierungssignale und ein Stück der Sequenzen hinter dem vierten Polyadenylierungssignal. Dieses Fragment wurde in den mit dem Restriktionsenzym *SpeI* geschnittenen und dephosphorylierten Minitargetingvektor linearisiert. Es entstand der CerS4 Testvektor (Abb. 4.29).

Zur Etablierung der ES-Zell PCR wurde ein Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül hinter der 3'rt-Stelle der Neomycinresistenzkassette ausgewählt, wohingegen das Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül vor dem vierten Polyadenylierungssignal lokalisiert war. Es sollte ein 2 kb großes Amplikon vervielfältigt werden. Es wurde jedoch nur ein 1,8 kb großes Amplikon vervielfältigt (Abb. 4.30).

4.2.6 Erzeugung und Charakterisierung von homolog rekombinierten CerS4KILacZ HM1 ES-Zellen

HM1 ES-Zellen wurden mit dem Vektorkonstrukt „CerS4KILacZ“ transfiziert und 558 selektionierte Klone wurden durch die CerS4 ES-Zell PCR auf die homologe Rekombination überprüft. Durch die CerS4 ES-Zell PCR wurden 26 positive Klone von 558 Klonen identifiziert (Abb. 4.32 A). Dies entsprach einer Rekombinationsrate von 6,5%. Zehn der positiven PCR Klone wurden weiter durch die Southern-Blot Hybridisierungen charakterisiert. Zur Überprüfung der homologen Rekombination sowie eine Mehrfachintegration auszuschließen, waren drei Southern-Blot Hybridisierungen für jeweils einen positiven ES-Zellklon notwendig (Abb. 4.31).

Nach der Spaltung der genomischen DNS mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* und unter Verwendung einer 3'externen Sonde, die stromabwärts hinter dem vierten Polyadenylierungssignal hybridisierte, wurde für das CerS4 Wildtyp Allel ein 20 kb großes Fragment nachgewiesen, wohingegen für das CerS4KILacZ Allel ein 8,5 kb großes Fragment gefunden wurde.

Durch diese Southern-Blot Analyse wurde die erfolgreiche homologe Rekombination im 3' Bereich überprüft und unterstützte somit die Aussage der CerS4 ES-Zell PCR. Zur Überprüfung der korrekten Insertion des 5' homologen Bereichs des *CerS4* Gens wurde eine interne Sonde (SA) sowie eine 5'externe Sonde verwendet, letztere hybridisierte stromabwärts vor der 5'Homologie. Die genomische DNS wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* gespalten. Im rekombinierten Locus konnte für das homolog rekombinierte Allel ein 8,5 kb langes Fragment nachgewiesen werden, im Wildtyp Allel ein 20 kb langes Fragment. Die dritte Southern-Blot Analyse sollte Aufschluss über Mehrfachintegrationen geben. Die genomische DNS wird mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* gespalten und für die

Hybridisierung des Southern-Blots wurde eine interne LacZ-Sonde verwendet. Beim CerS4KI LacZ Allel war der Nachweis eines 8,5 kb Fragments möglich, beim Wildtyp Allel wurde kein Fragment gefunden (Abb. 4.32 B).

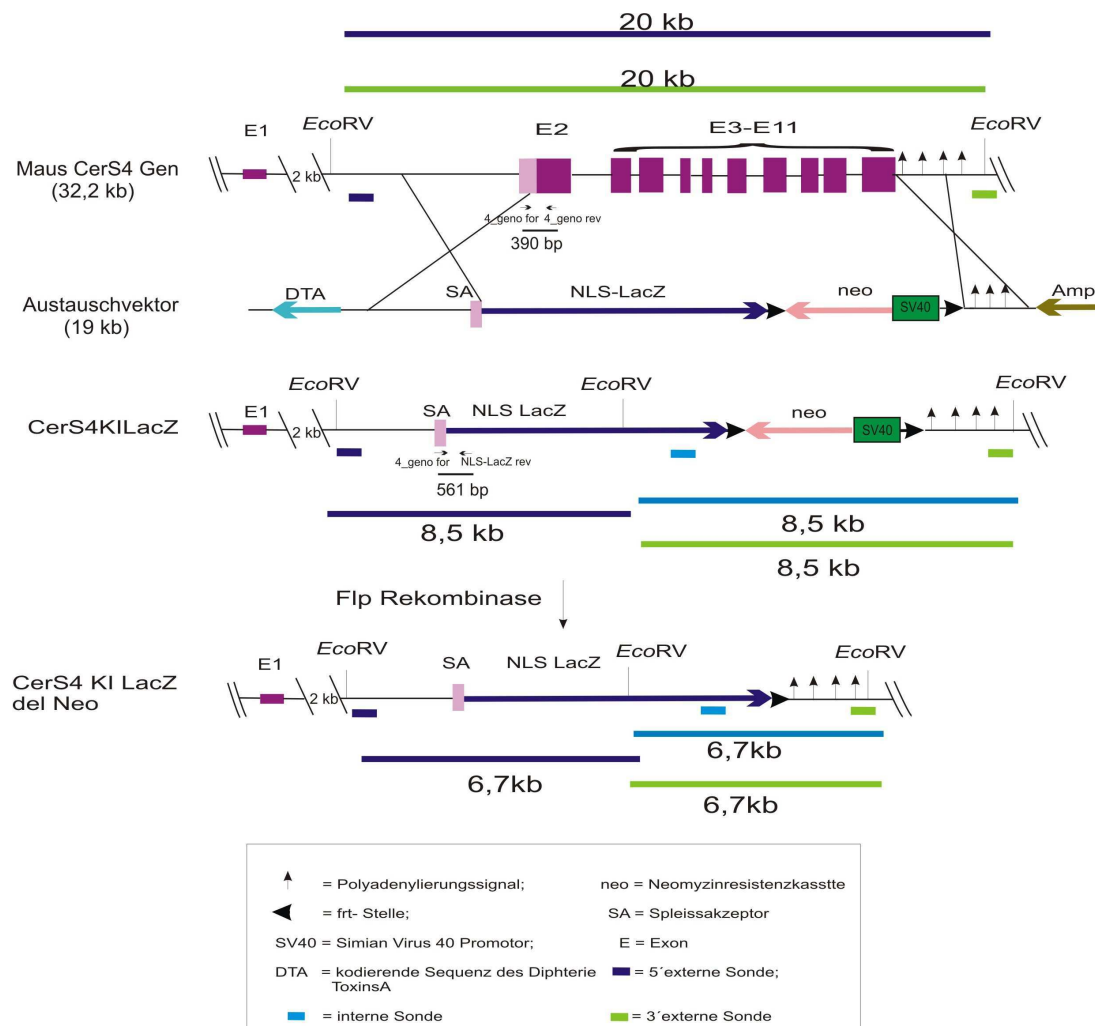


Abb.4.31: Schema der Southern-Blot Strategie sowie der Genotypisierungs-PCR der Wildtyp- ($CerS4^{+/+}$) und heterozygoten ($CerS4^{LacZ/+}$) Mäuse.

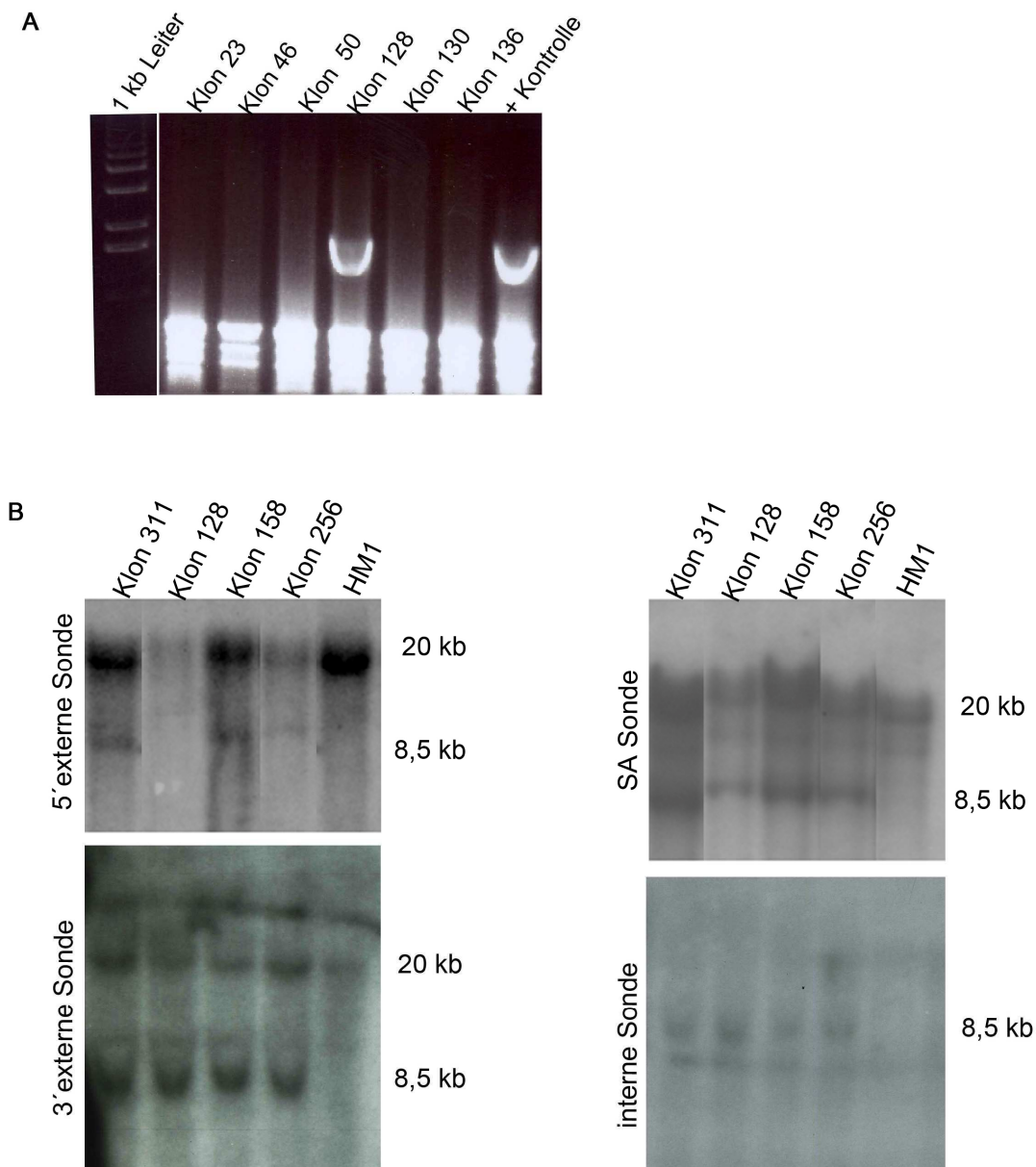


Abb 4.32: PCR und Southern-Blot Analyse einiger ES-Zellklone. **A** PCR Analyse von ES-Zellklonen der ersten sechs Klone. Positive Klone (+) zeigten ein 1,8 kb großes Amplikon. **B** Southern-Blot Analyse der vier ES-Zell positiven Klone 128, 158, 256 und 311.

Nach der Überprüfung der rekombinierten Stammzellen mittels PCR und Southern-Blot Analyse wurde bei den ES-Zellklonen 128, 158, 256 und 311 eine Karyotyp-Analyse durchgeführt, die dabei die Vollständigkeit der Chromosomenanzahl nachweisen sollte. Die ersten drei Klone zeigten, dass 80% der Kerne einen Chromosomensatz von 40 beinhalten. Nur der ES-Zellklon 311 wich mit 20% der Kerne, die einen Chromosomensatz von 40 besaßen, deutlich davon ab (Tab. 4.4).

Klonnummer	Anzahl der gezählten Kerne	Prozentzahl der euploiden Kerne	Chromosomenzahl		
			>40	= 40	>40
128	20	80	3	16	1
158	20	80	3	16	1
256	20	80	2	16	2
311	20	20	8	4	8

Tab. 4.4: Karyotyp-Analyse von vier PCR sowie Southern-Blot getesteten positiven ES-Zellklonen.

4.2.7 Blastozysteninjektion ausgewählter homolog rekombinierter ES-Zellklone, Verpaarungen resultierender Mäuschimären sowie Genotypisierung der heterozygoten CerS4^{+LacZ} Nachkommen

Drei der korrekt homolog rekombinierten ES-Zellklone wurden in Blastozysten von C57BCL/6 Mäusen injiziert und diese in Ammen-Mütter durch Christine Siegmund eingebracht.

Die Blastozysteninjektionen erbrachten vier Chimären. Die ersten beiden Chimären stammten von ES-Zellklon 128 ab, die einen Chimärismusgrad von unter 50 % aufwiesen. Die dritte und die vierte Chimäre von ES-Zellklon 158 wiesen einen Chimärismusgrad von 75% und 95% auf. Die Chimäre aus dem ES-Zellklon 158 wurde mit C57BCL/6 Mäusen verpaart. Aus dieser Verpaarung wurde eine heterozygote Maus CerS4^{LacZ/+} geboren, die über die CerS4KILacZNeo PCR nachgewiesen wurde.

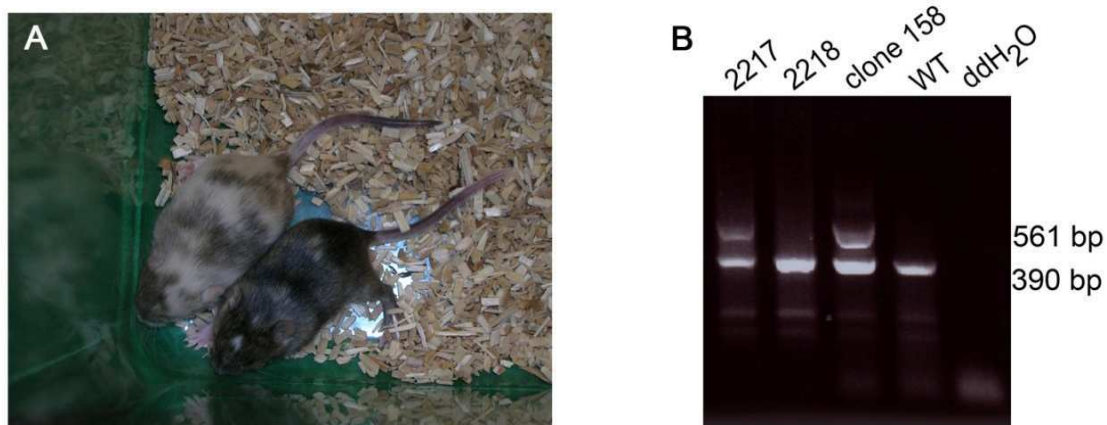


Abb. 4.33: Chimären sowie PCR Analyse von einer CerS4KILacZ/+ Maus A Chimäre 3 und 4 B PCR Analyse von Schwanzspitzen DNS CerS4^{+/+} und CerS4^{LacZ/+}. Die CerS4 spezifische Oligonukleotidstartermolekül-Kombination resultierte in einem 390 bp Amplikon für das CerS4 Wildtyp Allel (Tiernummer: 2218) und einem Amplikon von 561 bp für das CerS4KILacZ Allel (Tiernummer: 2217).

Bei dieser PCR wurde ein Intron1 spezifisches Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül „Lass4 geno for“ mit zwei spezifischen Gegensinnstrang-Oligonukleotidstartermolekülen „NLS-LacZ rev“ im NLS-LacZ Gen und „Lass4 geno rev“ im Exon2 kombiniert. Daraus resultierte ein 390 bp großes Amplikon für das Wildtyp Allel und ein 561 bp großes Amplikon für das CerS4KILacZ Allel (Abb. 4.33).

4.2.8 β -Galaktosidase Expression von Mäusen mit dem Genotyp CerS4^{LacZ/+} Maus in der Haut

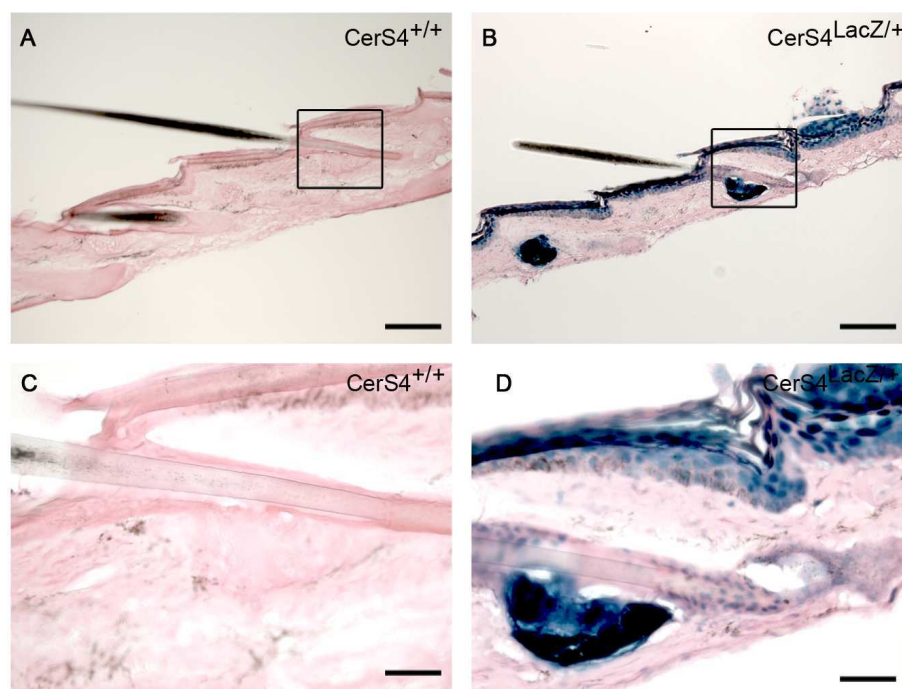


Abb. 4.34: Expressionsanalyse des β -Galaktosidase Reportergens in der Haut einer CerS4^{+/+}- (A, C) und einer CerS4^{LacZ/+}-Maus (B, D). Die β -Galaktosidase Reportergen Expression in der Haut der CerS4^{LacZ/+} Maus war im Haartrichter, im Haarbalg, in der Epidermis sowie in Zellen der Dermis lokalisiert. Größenstandard in A und B 200 μ m, C und D 50 μ m

Zur Überprüfung der β -Galaktosidase Reportergen Expression wurden von der Schwanzspitzenhaut der CerS4^{LacZ/+} Maus Kryoschnitte angefertigt und diese einer LacZ Färbung unterzogen.

Die β -Galaktosidase Reportergen Expression in der Haut der CerS4^{LacZ/+} Maus war im Haartrichter, im Haarbalg, in der Epidermis sowie in Zellen der Dermis lokalisiert. In der Haut der CerS4^{+/+} Kontroll-Maus konnten keine LacZ Signale beobachtet werden (Abb. 4.34).

5 Diskussion

Die Maus Ceramidsynthase (CerS) Genfamilie besteht aus sechs Mitgliedern, *CerS1-CerS6*, die für sechs Enzyme mit gewebespezifischer und vermutlich Fettsäureacyl-CoA abhängiger Ceramidsynthase Aktivität kodieren. Diese Ceramidsynthasefunktion und deren phänotypischen Auswirkungen sollte anhand transgener Mäuse detaillierter untersucht werden. Die Entscheidung, welche Ceramidsynthasen anhand von transgenen Mäusen analysiert werden sollten, fiel auf die CerS Gene, *CerS2* und *CerS4*, da sie langkettige Fettsäureacyl-CoAs (C22:0-C24:0) verwenden. Beide CerS Mitglieder weisen anhand von mRNA Untersuchungen neben ihrer nahezu ubiquitären Transkription eine erhöhte Transkriptmenge in bestimmten Organen auf - *CerS2* in Leber und Niere, *CerS4* in der Haut, Lunge, Herz und Leber (Mizutani et al., 2005; 2006; Laviad et al., 2007). Über die Funktion der Spezifität für die Ceramidsynthase mit langkettigen Fettsäureacyl-CoAs in unterschiedlichen Geweben ist noch sehr wenig bekannt. Erste Befunde deuten darauf hin, dass langkettige Lipide bei der Membranfluidität eine wichtige Rolle spielen können (Doherty et al., 2009). Im Gehirn tragen die langkettigen Sphingolipide (zusammen mit Cholesterol) zu den Packeigenschaften der Myelin Membranen bei. Zusätzlich kann die Fluidität der Membran Endozytose, Exozytose, die Sortierung der Lipide und Proteine sowie die Rezeptoreigenschaften regulieren. Eine Funktion des C24:0 Ceramids könnte eine Rolle in der Regulation der Restriktionspunkte bei der Zellproliferation spielen (Doherty und McMahon, 2009; Pan et al., 2001; Mesicek et al., 2010). Das Expressionslevel der Ceramidsynthasen verändert sich in Säugerzelllinien, aber es konnte noch keine funktionelle Bedeutung der Ceramidsynthase im lebenden Tier bestimmt werden (Pewner-Jung et al., 2010 b).

Ausschlaggebend für die Entscheidung zur Erzeugung einer *CerS2* Knockout Mauslinie war, dass ein kommerziell hergestellter „Gene Trap“ ES-Zellklon des Soriano Labors erhältlich war. Die Arbeitsgruppe Futerman verwendete die gleichen kommerziellen *CerS2* „Gene Trap“ ES-Zellen und erzeugte somit die gleiche *CerS2* „Gene Trap“ Mauslinie. Die beiden Veröffentlichungen wurden ein halbes Jahr später als die Ergebnisse dieser Arbeit mit nahezu denselben Daten publiziert (vgl. Abschnitt 5.5).

Neben den *CerS2^{gt/gt}* Mäusen wurden noch für zwei weitere Organismen (*C.elegans*, *Drosophila*) Deletionen der Ceramidsynthase Gene veröffentlicht. *Drosophila* besitzt die Ceramidsynthase schlank (vgl. Abschnitt 5.3). Die schlank Mutanten zeigen, dass sie eine Rolle im Larvenwachstum spielen, da sie kleiner sind als die Kontrolllarven (vgl. Abschnitt 5.2).

C.elegans besitzt drei potentielle Ceramidsynthasen hyl-1 (homologes Hefe Langlebigkeitsgen), hyl-2 und lagr-1. Mindestens eine der drei potentiellen

Ceramidsynthasen wurde in *C.elegans* ausgeschaltet. *Hyl-1* oder *lagr1* Mutanten rufen in Keimzellen keine Apoptose hervor, jedoch wird in *hyl-1* und *lagr-1* Ceramidsynthasen defizienten Mutanten Apoptose eingeleitet, wenn diese zuvor mit Röntgenstrahlung bestrahlt worden sind. *Hyl-2* Mutanten besitzen diese Eigenschaft nicht (Deng et al., 2008). Ebenso spielen CerS 2, 5 und 6 unterschiedliche Rollen in der durch Röntgenstrahlung ausgelösten Apoptose in Hela-Zellen. Dabei können sie anti-apoptotische und pro-apoptotische Auswirkung aufweisen (Mesicek et al., 2010). *Hyl-2* Mutanten besitzen die Fähigkeit eine erhöhte Sensivität gegen Sauerstoffverlust zu entwickeln, wohingegen *hyl-1* Mutanten eine erhöhte Sauerstoffresistenz im Gegensatz zum Wildtyp aufweisen. Durch Erzeugung von Mutanten von *hyl-1* unter dem Promotor von *hyl-2* konnte nachgewiesen werden, dass die Ceramidsynthase *hyl-1* *hyl-2* teilweise ersetzen kann, jedoch kann *hyl-1* nur einen Teil der Sauerstoffentzugsresistenz wie in Wildtypwürmern ausbilden. Diese Resistenz wird durch die Produktion von C20:0-C22:0 Ceramid und Sphingomyelinen erzeugt, die hauptsächlich von *hyl-2* gebildet werden (Menez et al., 2009).

5.1 Charakterisierung von CerS2 deletierten Mäusen, die durch einen kommerziellen „Gene Trap“ ES-Zellklon erzeugt wurden

$CerS2^{gt/gt}$ Mäuse wurden durch kommerzielle „Gene Trap“ ES-Zellen erzeugt. Der „Gene Trap“ ist in Intron1 des *CerS2* Gens inseriert (Diplomarbeit, Silke Imgrund, 2007). Die Integration der „Gene Trap“ Sequenz führt zu einem Verlust der Expression des *CerS2* Gens, das mittels Northern-Blot Analyse von $CerS2^{gt/gt}$ Mäusen mit und ohne Hygromycinresistenzkassette nachgewiesen werden konnte. Theoretisch sollte in $CerS2^{gt/gt}$ $Hygro^R$ Mäusen ein Transkript gebildet werden, das aus der Hygromycinresistenzkassette und Exon2-Exon11 besteht, jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für diesen Verlust des Transkripts könnte eine Mutation des Phosphoglycerate Kinase Promotors sein, der unabhängig von der *CerS2* Promotoraktivität für die Transkription der Hygromycinresistenz und Exon2-Exon11 sorgt. Der *CerS2* Promotor erzeugt das Transkript, das aus Exon1 und dem Fusionsprotein β geo besteht, einer Sequenz der Neomycinresistenzkassette und der β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase Expression ermöglicht die Lokalisation des Fusionsproteins im Gewebe. Da kein funktioneller, kommerzieller Antikörper gegen das *CerS2* Protein vorhanden ist, konnte kein Expressionsvergleich vom β -Galaktosidase Reporter gen mit dem *CerS2* Protein in $CerS2^{+gt}$ Mäusen durchgeführt werden. Es wurde deshalb nur die Lokalisation der β -Galaktosidase in bestimmten Geweben in dieser Arbeit bestimmt. In der Niere, der Nebenniere, der Leber, dem Gehirn, dem Ischias-Nerv, der Haut, der Bauchspeicheldrüse, dem Thymus, der Milz, den Hoden und dem Darm konnte eine LacZ Färbung nachgewiesen werden. Dies wird

durch die Real-Time PCR von Mizutani et al., (2005) und durch die Northern-Blot Analyse von Laviad et al., (2007) bestätigt. Die Analyse der einzelnen Zelltypen der unterschiedlichen Gewebe könnte durch spezifische Marker über Koimmunfluoreszenzen nachgewiesen werden. Zum Beispiel könnte in der Bauchspeicheldrüse die Glukagon produzierenden A-Zellen durch Chromogranin dargestellt werden, die Insulin produzierenden B-Zellen durch Insulin, die Somatostatin produzierenden D-Zellen durch Somatostatin sowie das Endothel der Blutgefäße durch Pecam-1. Der Zelltyp kann durch die überlappende Expression der β -Galaktosidase mit dem spezifischen Marker dargestellt werden.

Die Allelverteilung der CerS2^{gt/gt} Mäuse mit und ohne Hygromylinresistenzkassette nach heterozygoten Verpaarungen entsprach nicht der erwarteten Allelverteilung nach Mendel. Die gleichen CerS2^{gt/gt} Mäuse mit Hygromylinresistenz aus dem Futerman Labor wiesen jedoch die erwartete Allelverteilung nach Mendel auf. In beiden Publikationen aus dem Futerman Labor wurde beschrieben, dass die Tiere unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) gehalten wurden, jedoch sind sonst keine weiteren Angaben bezüglich Futtermittel oder anderer Streßfaktoren ersichtlich. Somit ergibt sich ein Unterschied zwischen den beiden Laboren in der Haltung der Mäuse, denn die in dieser Arbeit präsentierten Daten wurden von Tieren gewonnen, die in einem Tierstall mit offener Käfighaltung ohne SPF-Status und während eines Zeitraumes gehalten wurden, in dem durch Umbau- und Umstrukturierungsarbeiten mit einem erhöhten Streß der Tiere zu rechnen ist. Die erhöhte Sterblichkeit könnte somit etwa in einer erhöhten Anfälligkeit von Infektionen erklärbar sein, die nach der Geburt auftreten könnten.

5.1.1 Biochemische Charakterisierung der CerS2^{gt/gt} Mäuse

Bis fast zum Ende dieser Arbeit konnte die Abwesenheit des CerS2 Proteins aufgrund fehlender Antikörper nicht bestimmt werden. Der Ceramidsynthase Aktivitätstest wie auch die massenspektrometrischen Analysen bestätigten neben der RNS Analyse die Abwesenheit des CerS2 Proteins bzw. der CerS2 mRNA.

In der Leber von 10 Wochen alten CerS2^{+/+} Mäusen war die Enzymaktivität um das 50-fache höher als im Gehirn von 10 Wochen alten CerS2^{+/+} Mäusen. In CerS2^{gt/gt} Lebern kam es im Vergleich zu CerS2^{+/+} Lebern zu einer fast vollständigen Abnahme von C18:0-, C20:0-, C22:0- und C24:1 Ceramid. C16:0 Ceramid wurde nicht verändert. Dies zeigt, dass CerS2 in der Leber eine Substratspezifität von C18:0 – C24:1 Fettsäureacyl-CoAs besitzt, wobei die Präferenz jedoch auf den langkettigen Fettsäureacyl-CoAs besteht. Im Gehirn nahm im Vergleich von CerS2^{gt/gt} Mäusen zu CerS2^{+/+} Mäusen die Ceramidsynthase Aktivität gegen C24:1 Ceramid fast vollständig ab, wohingegen eine Verringerung der Aktivität von 44% bei

C22:0 Ceramid stattfand. Dies zeigt, dass CerS2 im Gehirn eine Substratspezifität von C22:0-C24:1 ausübt.

Durch massenspektroskopische Analysen wurde gezeigt, dass C16:0, C22:0, C24:0 und C24:1 Ceramid hauptsächlich in der Leber und der Niere von CerS2^{+/+} Mäusen vorkamen, wohingegen das C18:0 Ceramid im Gehirn von CerS2^{+/+} Mäusen am häufigsten repräsentiert wurde und C22:0, C24:0 und C24:1 Ceramid nur in geringen Mengen nachgewiesen werden konnten.

In der Leber und der Niere wurden Ceramide hauptsächlich in die langkettigen Hexosylceramide und Sphingomyeline umgesetzt, wohingegen im Gehirn hauptsächlich langkettige Hexosylceramide gebildet wurden. Die Verlängerung des C18:0 Ceramids könnte durch Elongasen vollzogen werden. Die langkettigen Hexosylceramide werden hauptsächlich von Oligodendrozyten gebildet, die für die Bildung des Myelins notwendig sind. Die Menge an Hexosylceramid ist im Myelin um das 10-fache stärker enthalten als in der grauen Substanz (Bauman und Pham-Dinh, 2001).

Neben der Bildung von langkettigen Hexosylceramiden und Sphingomyelinen entstanden C16:0 Sphingomyelin in der Leber und der Niere sowie C18:0 und C24:1 Sphingomyeline im Gehirn. In der Leber, der Niere und im Gehirn von CerS2^{gt/gt} Mäusen kam es bei den langkettigen Ceramiden, den Sphingomyelinen und den Hexosylceramiden zur Abnahme, wohingegen die Zunahme von C16:0 Ceramid, Hexosylceramid und Sphingomyelin in der Leber und der Niere stattfand sowie eine 5,5-fache Erhöhung von C20:0 Ceramid und C18:0 Hexosylceramid im Gehirn. Die erhöhte Menge des C16:0 Ceramids wird durch CerS6 in der Leber gebildet, deren Transkriptmenge in den CerS2^{gt/gt} Mäusen erhöht vorliegt (Pewzner-Jung et al., 2010). Die erhöhte Menge des C20:0 Ceramids könnte im Gehirn durch CerS4 synthetisiert werden, die eine Präferenz für C18:0-C20:0 bzw. C22:0-C24:0 Fettsäureacyl-CoAs besitzt. Der Einbau der Fettsäureacyl-CoAs könnte vom Zelltyp abhängen (Mizutani et al., 2005; Laviad et al., 2007). Die Konzentration von C16:0 und C18:0 Ceramid wurde nicht verändert. Dies konnte durch die unveränderte Transkriptmenge der *CerS1* und *CerS6* Gene begründet werden. Jedoch wurde das *CerS5* Transkript herunterreguliert. Es wird spekuliert, dass *CerS5* nicht für die Synthese des C16:0 Ceramids zuständig ist (Mullen et al., 2010). Die langkettigen Ceramide, Sphingomyeline und Hexosylceramide wurden in CerS2^{gt/gt} Mäusen nicht ersetzt. Dies zeigt, dass keine redundanten Ceramidsynthasen neben CerS2 für langkettige Fettsäureacyl-CoAs vorhanden sind.

Die Befunde der Ceramidsynthase Aktivität und der massenspektrometrischen Analysen von Ceramid in der Leber, der Niere und des Gehirns der CerS2^{gt/gt} Mäuse werden partiell durch *in-vitro* Daten der Fettsäureacyl-CoA Spezifität bestätigt. In allen Veröffentlichungen wird eine Abnahme der langkettigen Ceramide beschrieben. Je nach Zelltyp kommt es zu leichten Veränderungen. Mizutani et al (2005) verwenden siRNA transfizierte CerS2 HEK 293 T-

Zellen, bei denen es zu keinem Anstieg des C16:0 Ceramids kam. In siRNS CerS2 herunterregulierten Neuroblastoma Zellen und menschlichen Brustadenomzellen (MCF-7) konnte ein Anstieg des C16:0 Ceramids sowie zusätzlich in den siRNS CerS2 herunterregulierten menschlichen Brustadenomzellen eine Erhöhung von C18:0 und C20:0 Ceramid nachgewiesen werden (Spassieva et al., 2009; Mullen et al., 2010). Die unterschiedlichen Veränderungen im Bereich der C16:0-C20:0 Fettsäureacyl-CoAs könnten durch die unterschiedliche Expression der anderen Ceramidsynthasen bzw. Ceramidasen erklärt werden.

5.1.2 Charakterisierung der Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen

In dieser Arbeit konnte keine eindeutige LacZ Färbung in der Leber von 7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen nachgewiesen werden. Es war lediglich ein „blauer Schleier“ vorhanden. Der blaue Schleier deutet zunächst nicht darauf hin, dass die LacZ Färbung spezifisch wäre. In dieser Arbeit konnte neben der Abnahme von Ceramid, Sphingomyelin und Hexosylceramid eine Verringerung von Triacylglycerin in der Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen bestimmt werden. Eine Abnahme des Triacylglycerins wurde bereits in den schlank Mutanten von *Drosophila* beschrieben (Bauer et al., 2009). Wie auch die Ceramidsynthasen in der Maus besitzt die Ceramidsynthase in *Drosophila* eine Homöodomäne. Sie könnte eine potentielle Funktion als Regulator zwischen den Genen der Lipolyse und Lipogenese darstellen. In den schlank Mutanten werden die lip3 und bmm Lipasen hochreguliert, die dadurch die Abnahme der Triacylglycerine fördern. Wie der Name schlank schon angibt, kommt es zu geringeren Fettablagerungen in den Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Larven. Neben der Hochregulierung der Lipolyse werden die Gene, die für die Lipolyse z.B. die Fettsäuresynthase sowie die Kontrolle der Lipolyse (SREBP) zuständig sind, in den schlank Mutanten herunterreguliert (Bauer et al., 2009; Voelzmann und Bauer, 2010). Es wäre dabei auch möglich, dass in der Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen CerS2 als Regulator zwischen den Genen der Lipolyse sowie der Lipogenese agiert. Dies müsste jedoch durch weitere Studien bestätigt werden. Eine Fehlregulation des Gleichgewichts zwischen Lipolyse und Lipogenese kann zu Insulinresistenz und Fettleibigkeit führen (Kahn et al., 2006; Bauer et al., 2009). Insulinresistenz kann durch eine erhöhte Konzentration von Triacylglycerin entstehen, wobei Triacylglycerin einen Marker für die Insulinresistenz darstellen könnte (Nagle et al., 2009). Neben der Erhöhung des Triacylglycerins kommt es auch zu einer Erhöhung der Ceramid- und der Sphingolipidkonzentration (vgl. Abb. 1.1). Bei der Insulinresistenz kann Insulin seine normale physiologische Funktion wie die Regulation der Glukoseproduktion nicht mehr steuern (Zick, 2004). Dabei wird auf Insulin in seinen Hauptwirkungsstätten wie Muskel, Leber und Bauchspeicheldrüse nicht ausreichend reagiert, wodurch eine erhöhte

Insulinausschüttung durch die Bauchspeicheldrüse erfolgt. Neben der erhöhten Insulinmenge sind hohe Konzentrationen von Glukagon und Glukose vorhanden. Die Ursache der Insulinresistenz könnte ein defekter oder veränderter Insulinsignalweg sein (Capeau, 2005), der durch eine veränderte Membran Fluidität ausgelöst werden kann.

Die Abnahme der Triacylglycerin- sowie Sphingolipidmengen (Sphingomyelin, Hexosylceramid und das anionische Sphingolipid GM2) in der Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen sprechen dafür, dass vermutlich keine Insulinresistenz entsteht, jedoch müsste dies noch durch einen Glukose und einen Insulin Toleranz Test nachgewiesen werden. Jedoch wick das anionische Sphingolipid GM3 durch eine schwache Erhöhung (um 20 %) in der Leber ab. GM3 inhibiert die Signaltransduktion der Tyrosinkinase-Rezeptoren, zu denen die Insulinrezeptoren und die EGF Rezeptoren gehören (Bremer et al., 1984). Dabei ersetzt es innerhalb der Mikrodomänen der Plasmamembran die Insulinrezeptoren, machen so den Insulinrezeptor zum Gegenspieler des Insulin-Rezeptorsubstrat Proteins (Kabayama et al., 2005; Inokuchi, 2006). Dies wird durch Mäuse, in denen die GM3 Synthase deletiert worden ist, unterstützt. In diesen Mäusen wird die Tyrosin-Phosphorylierung der Insulinrezeptoren im Muskel erhöht (Yamashita et al., 2003). Da sich dies auf eine Erhöhung der gesamten anionischen Sphingolipide bezieht, könnte die Erhöhung von GM3 in CerS2^{gt/gt} Mäusen nur eine kompensatorische Wirkung auf die Abnahme von GM2 (-28%) besitzen. GM3 wird nur in sehr geringen Mengen von Hepatozyten synthetisiert, hauptsächlich wird es von Endothel-Zellen und Kupffer-Zellen gebildet (Gabellec et al., 1983). Es könnte eine Rolle bei der Zelladhäsion über Protein-Lipid-Interaktion zwischen Hepatozyten und Endothelzellen spielen (Marchase, 1977).

Einen weiteren Hinweis für eine Insulinsensitivität zeigten die CerS2^{gt/gt} Mäuse aus der AG Futerman. Der Blutzuckerspiegel ist bei 4 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen erniedrigt (Pewner-Jung et al., 2010 b). Eine konkrete Aussage über die Insulinresistenz kann erst getroffen werden, wenn die Mäuse einer fetthaltigen und/oder kohlenhydrathaltigen Fütterung und anschließenden Glukose- und Insulinmessungen unterzogen werden.

In dieser Arbeit zeigten sich in 7 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen Vorstufen des hepatozellulären Karzinoms in Form einer Zirrhose, die durch lipidhaltige und glykogenreiche knotenförmige Bereiche charakterisiert sind. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten der Disse-Raum und die Gallengänge von den Hepatozyten in CerS2^{gt/gt} Mäusen nicht mehr voneinander getrennt identifiziert werden.

In der Leber von 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen konnten Bereiche beobachtet werden, die nach LacZ Färbung einen „blauen Schleier“ aufwiesen, deren Größe jedoch in den Lebern der einzelnen Tiere variierte und große Bereiche, in denen keine LacZ Färbung vorhanden war. Jedoch wiesen die LacZ gefärbten Bereiche gegenüber den LacZ freien

Bereichen in 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Lebern eine gewisse Spezifität auf. In den CerS2^{gt/gt} Mäusen aus dem Futerman Labor zeigte sich, dass sich in den Lebern von CerS2^{gt/gt} Mäusen eine Zirrhose entwickelt hat, die durch knotenförmige Areale charakterisiert wurde. Diese knotenförmigen Areale zeigten sich lipid- und glykogenreich, jedoch konnte in diesen Bereichen keine LacZ Expression nachgewiesen werden. LacZ Färbung konnte nur in den Wildtyp-Hepatozyten beobachtet werden (Pewzner-Jung, 2010 a). Dies ist ein Hinweis, dass CerS2 an der frühen Tumorentstehung beteiligt ist.

In der Leber von 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen konnte ein niedriger Triacylglyceringehalt festgestellt werden, der auf einen Übergang der Zirrhose ins hepatozelluläre Karzinom hindeuten und somit ein Fortschreiten der Tumorgenese bewirken könnte. Das Zirrhose artige Gewebe besitzt eine hohe Anzahl von Fetttropfchen (Esser, 1967), die auf einen hohen Triacylglyceringehalt schließen lassen. Die proliferierenden hepatozellulären Karzinomzellen können Cytokine wie TNF α , Interleukin1 und Interleukin 6 produzieren (Tracey et al., 1988; Langstein und Norton, 1991). Interleukin1 könnte die Synthese von Triacylglycerin hemmen (Jiang et al., 2006) und somit könnte sich nur wenig Triacylglycerin bzw. keine Fetttropfchen bilden.

Neben der erniedrigten Triacylglycerin Konzentration konnten in dieser Arbeit zusätzlich die anionischen Sphingolipide GM1 und GM3 in einer erhöhten Konzentration nachgewiesen werden. Studien von tumorhaltigen Ratten-Lebern bestätigten die Erhöhung der Konzentration der anionischen Sphingolipide GM1 und GM3. Zusätzlich konnte in diesen tumorhaltigen Ratten-Lebern eine Erhöhung von GD1a nachgewiesen werden, wohingegen die GT Gangliosid-Gruppe (GT1a; GT1b) erniedrigt wurde (Dristrian et al., 1977). Das anionische Sphingolipid GM1 führt zu einer erhöhten Expressionsstärke des vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor (VEGF) Rezeptors (Manfredi et al., 1999), das in hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen ist (Ng et al., 2001). Der vaskuläre Endothel-Wachstumsfaktor wird für die Angiogenese des Tumors benötigt (Whittaker et al., 2010). Die GM1 Anhäufung wird innerhalb der Lysosomen lokalisiert, wodurch es zu vergrößerten Hepatozyten und Kupffer-Zellen kommt, die eine tumorhaltige Leber auszeichnen (Mari und Fernández-Checa, 2010).

Wenn GM3 mit CD9 oder mit Caveolin2 komplexiert ist, soll dieser Komplex die Zellbeweglichkeit und Gefäßinvasion hemmen (Ono et al., 1999; Prinetti et al., 2009; Mukherjee et al., 2009). Die bisherige bekannte Funktion der anionischen Sphingolipide GM1 und GM3 ist die Förderung bzw. eine Hemmung der Gefäßinvasion. Morphologisch wurde in dieser Arbeit eine Gefäßinvasion nicht untersucht. Im Labor Futerman wurden 12 Monate und ältere CerS2^{gt/gt} Mäuse untersucht, jedoch konnte in den Lebern dieser Mäuse keine Gefäßinvasion festgestellt werden (Pewzner-Jung et al., 2010 b). Das könnte daraufhin

deuten, dass die beiden anionischen Sphingolipide eine gegenseitige, aufhebende Wirkung besitzen.

Das anionische Sphingolipid GM2 besitzt zwei Formen. Es deutet daraufhin, dass eine Form die hydroxylierte und kurzkettige Form präsentiert, wohingegen die zweite eine langkettige Form darstellt. Zur Klärung des Vorkommens dieser beiden Formen sollte eine massenspektroskopische Analyse an Lebern von 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen durchgeführt werden. Jedoch ist keine Funktion von GM2 in der Leber bekannt.

Hepatozelluläre Karzinome werden auch in Lebern von Mäusen entdeckt, die Fumonisin B1 (FB1) erhalten. FB1 ist ein potentieller spezifischer Inhibitor gegen Ceramidsynthesen, der eine erhöhte Sphinganinkonzentration in Mäusen auslöst (Merril et al., 1996). Bei zweiwöchiger Verabreichung von FB1 wird Apoptose, Anisozytosis und ein leicht erhöhtes Lebergewicht festgestellt. Bei Verabreichung über 90 Tage kommt es zur erhöhten Proliferation, die durch eine Entzündungsreaktion begleitet wird. Zentrilobuläre Apoptose, Nekrose, Hypertrophie, zytoplasmatische Vakuolisierung und Kupffer-Zellen Hyperplasie werden in FB1 behandelten Männchen nachgewiesen (Howard, 2001; Voss et al., 2001). Diese Morphologie konnte im Labor Futerman auch bei CerS2^{gt/gt} Mäusen festgestellt werden (Pewzner-Jung et al., 2010 b).

5.1.3 Ursache des hepatozellulären Karzinoms

Für die Entstehung des hepatozellulären Karzinoms gibt es zwei Hypothesen: Die Dedifferenzierungs-Hypothese und die Differenzierungsstop-Hypothese. Bei der Dedifferenzierungs-Hypothese entwickelt sich das hepatozelluläre Karzinom durch die Dedifferenzierung von reifen Hepatozyten zu unreifen Hepatozyten. Diese besitzen eine erhöhte Teilungsfähigkeit und können knotenförmige Areale, einer Vorstufe des hepatozellulären Karzinoms, bilden (siehe Kap. 1.6) (Tirnitz-Parker und Olynyk, 2009). Hierbei können zum Beispiel die Reaktionswege der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP)-, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)- und des Tumor-Nekrose Faktors alpha (TNF- α) eine Rolle spielen.

Bei der Differenzierungsstop-Hypothese entsteht das hepatozelluläre Karzinom durch eine Blockierung der Differenzierung der proliferierenden LeberVorläuferzellen ohne dass die LeberVorläuferzellen in die Apoptose eintreten (Potter, 1978; Tirnitz-Parker und Olynyk, 2009). In dieser Hypothese können zum Beispiel der Wingless/ β -Catenin- und der Notch Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen.

Die Signaltransduktionswege können durch angehäuften Lipide auf unterschiedlichen Ebenen in Hepatozyten oder LeberVorläuferzellen beeinflusst werden. In CerS2^{gt/gt} Mäusen kommt es zur Anhäufung von kurzkettigen Sphingolipiden sowie Sphinganin (Pewzner-Jung et al., 2010

a). Die angehäuften Komponente, insbesondere Sphinganin, könnte eine Veränderung der Enzymaktivität innerhalb eines Signaltransduktionsweges hervorrufen oder als Ligand eines Rezeptors fungieren (Ballabio und Gieselmann, 2009). Ein Beispiel zum letzteren stammt aus deletierten Galaktosylceramidase Mäusen, die ein Modell für die Krabbe Erkrankung sind. In diesen Mäusen kommt es zur Anhäufung von Psychosinen (Galaktosylsphingosin). Dieses bindet an den TDAG8 Rezeptor (T-Zell assoziiertes Gen 8) und hemmt die Zytokinese der Mikroglia Zellen, die sich in der weissen Substanz befinden (Im et al., 2001). Zusätzlich könnte der Verlust von C22:0 und C24:0 Ceramid in Lebervorläuferzellen einen positiven Effekt auf ein Proliferationskontroll-Protein ausüben, der in CerS2^{gt/gt} Mäusen durch das Fehlen des C22:0 und C24:0 Ceramids nicht mehr möglich ist. Diese Ceramide könnten als Repressoren fungieren. Ein Beispiel dafür ist, dass Ceramid bei der Repression der menschlichen Telomerase reverse Transkriptase durch die Deacetylierung von SP3 eine Rolle spielt (Wooten-Blanks et al., 2007).

5.1.4 Vergleich von CerS2 „Gene Trap“ Mäusen aus den Laboren Futerman und Willecke

Die Arbeitsgruppe Futerman erzeugte aus den gleichen kommerziellen CerS2 „Gene Trap“ ES-Zellen die gleichen CerS2 „Gene Trap“ Mäuse und verwendete für ihre beiden Publikationen den gleichen C57BL/6-Gehalt von 50%. Beim Vergleich der massenspektrometrischen Analysen der Leber sowie der Niere zeigten sich keine Unterschiede.

Zusätzlich wurde im Futerman Labor zu der Ceramidsynthese Aktivität parallel die CerS2 Transkriptmenge ermittelt. Die Ceramidsynthese Aktivität sowie die Transkriptmenge erreichten zwei Höhepunkte in 1-3 Monate und in 10 Monate alten Mäusen. Auffällig war, dass das C16:0 Ceramid sowie das C16:0 Sphingolipid ab dem 120. Tag nicht mehr anstiegen. Bei der Geburt zeigten sich keine Unterschiede in der Sphinganinmenge von CerS2^{gt/gt}- und CerS2^{+/+} Mäusen. Ab dem 21. Tag stieg die Menge von Sphinganin, um das 50-fache im Gegensatz zu CerS2^{+/+} Mäusen an. Es ließ sich keine Veränderung in der Menge bei Sphingosin-1-Phosphat sowie Sphinganin-1-Phosphat feststellen.

Neben den Sphingolipiden wurden die Phospholipide im Labor Futerman nachgewiesen. Bei den Phospholipiden konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung von C18:1 und C18:2 Phosphatidylethanolamin, wohingegen es bei C18:0 und C20:4 Phosphatidylethanolamin zu einer signifikanten Erniedrigung kam. Bei *in-vitro* Experimenten ist die Membranfluidität verändert, die einen Hinweis darauf gibt, dass viele zelluläre Prozesse wie Endozytose beeinflusst sein könnten.

Das Labor Futerman zeigte eine erhöhte Proliferation nach 21 Tagen und eine erhöhte Apoptose nach 30 Tagen in CerS2^{gt/gt} Mäusen. Zusätzlich waren die Serum Alanin Aminotransferase, die Aspartat Aminotransferase und alkaline Phosphatase erhöht, die auf Leberschädigungen schließen lassen. Ab einem Alter von 4 Monaten wurde bei CerS2^{gt/gt} Mäusen eine starke Reduktion der Körpergröße sowie der Fettpolster gefunden. Das Lebervolumen nahm um das 4-fache zu. Bei 4-6 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen bildeten sich Zirrhosen aus, die durch knotenförmige Areale mit schwachen Kollagen Ablagerungen charakterisiert werden konnten. In diesen knotenförmigen Arealen konnten entweder große Hepatozyten oder große, vakuolisierte Hepatozyten nachgewiesen werden. Die großen, vakuolisierten Hepatozyten waren mit Glykogen und Fetttröpfchen angereichert und exprimierten nicht das Fusionsprotein β geo. In der Leber von 4 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurden Entzündungsreaktionen beobachtet, die durch Cluster von Lipofuscin geladenen Makrophagen in den Portal Triade charakterisiert waren. In 10 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen hatten sich die knotenförmigen Areale mit großen, vakuolisierten Hepatozyten vergrößert.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls die Bildung einer Leberzirrhose bei 7-9 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine Übereinstimmung der LacZ Färbung in den Vorstufen der tumorhaltigen Leber von CerS2^{gt/gt} Mäusen gefunden. Zwischen den knotenförmigen Arealen existierten nur noch einige Hepatozyten mit normaler Morphologie.

Im Futerman Labor wurden zusätzlich noch 12 Monate alte oder ältere Mäuse untersucht, die die ersten hepatozellulären Karzinome zeigten. Die Hepatozyten waren in den hepatozellulären Karzinomen in festen, trabekulären oder adenoiden Mustern angeordnet. Zusätzlich konnte das Futerman Labor über einen Mikroarray Test hochregulierte Gene nachweisen, die an der Zellzyklus Regulation, dem Proteintransport, der Zell-Zell-Interaktion und der Apoptose beteiligt waren. Die herunterregulierten Gene spielten eine Rolle im Lipid- und Steroid-Metabolismus, im Aminosäure-Metabolismus sowie in Signaltransduktionswegen von Fettzellen (Pewzner-Jung et al., 2010 a; b).

5.1.5 Charakterisierung der Niere von CerS2^{gt/gt} Mäusen

Die β -Galaktosidase Expression in CerS2^{+/gt} Mäusen zeigte in der Niere eine starke Expression in den Sammelrohren und in den proximalen Tubuli, sowie eine schwache LacZ Expression in den Nierenkörperchen und den weiteren Tubuli. Die starke β -Galaktosidase Expression spiegelt die hohe Transkriptmenge des CerS2 Gens in der Niere wider (Laviad et al., 2007). In den Nieren von 9 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurden leere Zysten im Nierenparenchym gefunden, die in der Nähe von den Nierenkörperchen und Blutgefäßen

lagen. Dies entsprach nicht der β -Galaktosidase Expression, die am stärksten in den proximalen Tubuli lokalisiert war. Diese leeren Zysten deuten daraufhin, dass sie aus den Tubuli stammten anstatt aus den Sammelrohren. Ein gestörtes Proliferations- bzw. Apoptoseverhalten könnte der Auslöser dieser leeren Zysten sein, jedoch konnte bislang noch kein Vergleichsmausmodell gefunden werden. Nieren von 11 Monate alten CerS2 defizienten Mäusen aus dem Futerma Labor weisen diese leeren Zystenstrukturen nicht auf (Pewzner-Jung et al., 2010 b).

5.1.6 Charakterisierung des Gehirns von CerS2^{gt} Mäusen

CerS2^{gt} Mäuse zeigten eine β -Galaktosidase Reportergen Expression in Neuronen und Oligodendrozyten, wie auch in Ependymzellen und Epithelzellen des Choroid Plexus. Die β -Galaktosidase Reportergen Expression variierte in den unterschiedlichen Typen von Neuronen. Im Großhirn wurde die höchste Expression der β -Galaktosidase Färbung in der CA1 Pyramidenzellschicht beobachtet. Zusätzlich konnte die LacZ Expression im Gyrus dentatus gezeigt werden. Am stärksten scheint diese in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus zu sein. In dieser Zone entwickeln sich neuronale Vorläuferzellen und wandern in die Granulärzellschicht ein und differenzieren sich dort zu reifen Neuronen, die Körnerzelleigenschaften annehmen können (Kaplan und Hinds, 1977; Cameron et al., 1993). Ein geringer Anteil der neuronalen Stammzellen entwickeln sich zu Gliazellen (Cameron et al., 1993). Neben dieser neuronalen LacZ Expression im Großhirn konnte ebenfalls eine neuronale LacZ Expression in der Körnerschicht und Purkinje-Zellschicht festgestellt werden. Dieses Expressionsmuster stimmt nur teilweise mit den *in-situ* Experimenten des CerS2 Transkripts im Gehirn überein. Das CerS2 Transkript wurde ausschließlich in Oligodendrozyten nachgewiesen (Becker et al., 2007). Durch einen CerS2 Antikörper konnte gezeigt werden, dass CerS2 im Mark exprimiert wird. Vereinzelt Signale konnten in der Körnerschicht und Purkinje-Zellen nachgewiesen werden (Christiane Kremser, Diplomarbeit, 2011). Eine mögliche Erklärung für die LacZ Färbung in den Neuronen wäre, dass das Fusionsprotein β geo einen anderen 3'UTR besitzt als das CerS2 Gen. Im 3'UTR könnten Bindungsstellen für neuronale mikroRNS enthalten sein, die das CerS2 Transkript in Neuronen herunterregulieren (Christiane Kremser, Diplomarbeit, 2011).

Während der Myelinisierung, die von P0 bis Tag 60 nach der Geburt andauert, konnte in dieser Arbeit kein offensichtlicher Phänotyp der CerS2^{gt} Maus gefunden werden, obwohl das CerS2 Transkript in dieser Phase am stärksten transkribiert wird (Becker et al., 2007).

C22:0 und C24:0 Ceramid sind die Vorstufen der langkettigen Sphingolipide (Galaktosylceramide, Sphingomyeline und Sulfatide) und bilden ein wichtiges Kriterium für

die Bildung des Myelins, da langkettige Sphingolipide in hohem Ausmass im Myelin vorhanden sind (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Zu Beginn der Myelinisierung wurde in 7 Tage alten CerS2^{gt/gt} Mäusen im Vergleich zu CerS2^{+/+} Mäusen eine Erniedrigung der anionischen Sphingolipide GM1, GD1b, GT1b und GD1a nachgewiesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Sphingolipide nur eine Fettsäurekettenlänge bis C20:0 enthalten, erst ab der zweiten Woche kommt es zur Produktion von Lipiden mit langkettigen Fettsäuren (Heape et al., 1987). Es konnten keine weiteren Lipidunterschiede in CerS2^{gt/gt} Mäusen festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass das CerS2 Protein entweder eine andere Präferenz für Fettsäureacyl-CoAs aufweisen könnte, oder dass eine andere Ceramidsynthase (wie z.B. CerS4), die für die Synthese von C20:0 Ceramid zuständig ist, herunterreguliert sein könnte.

Am Ende der Myelinisierung (6-7 Wochen) konnten die ersten Anzeichen einer Veränderung bzw. eines Abbaus im Myelin in CerS2^{gt/gt} Mäusen festgestellt werden. Neben der Abnahme der langkettigen Ceramide konnte eine Abnahme der langkettigen Hexosylceramide und Sphingomyeline nachgewiesen werden, wohingegen neben dem Anstieg des C20:0 Ceramids ein Anstieg bei den kurzkettigen C18:0 Hexosylceramiden gefunden wurde. Das C20:0 Ceramid deutete darauf hin, dass es nicht in das Hexosylceramid oder Sphingomyelin eingebaut worden ist. Es könnten weitere C20:0 Verbindungen akkumulieren, wie z.B. Eikosanoide. Eikosanoide spielen eine Rolle bei der Entzündungsreaktion und könnten die ersten Hinweise der Demyelinisierung sein. Hexosylceramid ist ein Vorläufer der komplexen, anionischen Glykosphingolipide (Ganglioside). Die Fettsäure Zusammensetzung der Ganglioside besteht hauptsächlich aus C18:0 Fettsäuren und verändert sich nicht von der Geburt bis ins hohe Alter im menschlichen Gehirn (Sastry, 1985). Eine Erhöhung des C18:0 Hexosylceramids könnte einen kompensatorischen Effekt darstellen, da der Gehalt des Gesamt-Hexosylceramids erniedrigt war. Es könnten somit weniger Lipid-Protein Interaktionen ausgebildet werden, die wichtig für die Axon-Oligodendrozyten Interaktion während der Myelinisierung sind. Die anionischen Sphingolipide GD1a und GT1a können mit dem Myelin assoziierten Protein (MAG) interagieren, die für die Myelininstabilität sorgen soll (Lopez und Schnaar, 2009). Die Anhäufung von GM1 wird auch bei der GM1-Gangliosidose beobachtet. Diese Akkumulation äußert sich in der Bildung von neuen Neuriten am Axonhügel, und es kommt damit zu einer Vergrößerung des Axonhügels, der als Meganeurit bezeichnet wird (Walkely, 1998). Die Ausbildung der Meganeuriten wurde nicht nachgewiesen, jedoch wäre dies mit einer PAS Färbung im Gehirn von CerS2^{gt/gt} Mäusen möglich.

Der Cholesterolester-Gehalt steigt im Gehirn von 6-7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen. Diese Erhöhung des Cholesterolesters dient als Entgiftungsmechanismus für das Übermaß von freiem Cholesterol (Yao und Tabas, 2001). Das Enzym, das für die Cholesterol-Veresterung

zuständig ist, heisst Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase und wird nur in geringer Stärke exprimiert (Uelmen et al., 1995). Cholesterolester liegen somit im Gehirn nicht vor, dagegen jedoch Cholesterol (Bjorkhem und Meaney 2004). Die Freisetzung eines Übermaßes von freiem Cholesterol, das in Cholesterolester umgewandelt werden kann, könnte ein Zeichen für den Abbau von Myelin sein (Mutka et al., 2010).

Bei Betrachtung der neutralen Lipide konnte festgestellt werden, dass Triacylglycerin sowie die freien Fettsäuren in CerS2^{gt/gt} Mäusen abnehmen. Triacylglycerin ist eine Energiequelle in einigen Organen, jedoch nicht für das Nervensystem. Hier dienen hauptsächlich Glukose und Ketonkörper als Energiequellen. Triacylglycerin ist deshalb in geringen Mengen im Gehirn vorhanden (Macala et al. 1983). Die Abnahme von Triacylglycerin könnte bei der Bildung des Cholesterolesters eine Rolle spielen. Die freien Fettsäuren könnten für die Bildung des Cholesterolesters notwendig sein (Mutka et al., 2010). Jedoch ist zu beachten, dass die Menge der freien Fettsäuren nicht mit der Menge des Cholesterolesters korreliert.

In dieser Arbeit konnte bei den Phospholipiden kein Unterschied festgestellt werden. In der Literatur sind Phospholipide die Hauptstruktur von neuronalen Membranen (Futerman und Banker, 1996) und sind für das axonale Wachstum notwendig (de Chaves et al., 1995).

Phosphatidylinositol kann zusätzlich in Oligodendrozyten zu einer Lipid-Interaktion und somit als Adhäsionsmolekül fungieren. An Phosphatidylinositol bindet sich das Myelin basische Protein (MBP) (Musse et al., 2008). MBP besitzt 4 Isoformen (14 kDa, 17 kDa, 18,5 kDa und 21,5 kDa), die eine unterschiedliche Funktion und Lokalisation in den Oligodendrozyten besitzen können (Boggs, 2006). Im Laufe des Alterns der CerS2^{gt/gt} Mäuse nahm die MBP Expression ab. Die 18,5 kDa Isoform interagiert mit Phosphatidylinositol an der Myelinmembran und befindet sich zwischen den dichtgewundenen Myelinscheiden (Ishiyama et al., 2001). In dieser Arbeit wurde eine geringfügige Abnahme von MBP in 6-7 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen gefunden, jedoch ist die Synthese von Phosphatidylinositol nicht beeinträchtigt. Aufgrund der verminderten MBP Expression, insbesondere der 18,5 kDa Isoform, konnte die Protein-Lipid-Interaktion nicht mehr vollständig ausgebildet werden. Die fehlende MBP Expression könnte auf eine geringe MBP Transkriptmenge hindeuten.

Diese fehlende Protein-Lipid Interaktion sowie eventuelle weitere unbekannt, fehlende Protein-Lipid Interaktionen könnten die 50%ige Abnahme des kompakten Myelins von 10 Wochen alten CerS2^{gt/gt} Mäusen, das aus Dichtgradientenzentrifugation stammt, erklären. Die Abnahme des MBP Proteins sowie eventuell weiterer unbekannter Proteine und die Abnahme von Sulfatiden zeigten eine Veränderung im Myelin an, die durch den Verlust der Anfärbbarkeit des Myelins nachgewiesen werden konnte.

Im Kleinhirn von 9 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen wurde die Bildung von leeren Mikrozysten in der weissen als auch in der grauen Schicht nachgewiesen. Dies deutet auf eine Demyelinisierung hin. Zusätzlich konnten leere Mikrozysten in der CA1 Zellschicht im

Hippokampus beobachtet werden, die jedoch nicht mit der starken LacZ Expression in der CA1 Zellschicht korrelierten. Im zentralen und peripheren Nervensystem kam es zu Anomalien bei 20% der Gesamtaxone. Insbesondere im peripheren Nervensystem kam es zu Ablagerungen in einzelnen oder mehreren inneren Myelinlamellen, die sich in den periaxonalen Raum schieben und in das Axon drücken. In einzelnen Fällen konnten diese Ablagerungen von Myelinlamellen zwischen äußerer und innerer Myelinscheide die gesamte Fläche einer Myelinscheide einnehmen, wie es auch bei den Schmidt-Lantermann Einkerbungen der Fall ist. Unterstützend kommt es zur weiteren Abnahme des MBP Proteins. Von den 4 Isoformen des MBP Proteins ist nur noch die reduzierte 18,5 kDa Isoform vorhanden. Eine Deletion des MBP Proteins in den *shiverer* Mäusen zeigte eine Dekompaktierung des Myelins (Inoue et al., 1981; Shine et al., 1992), jedoch konnte kein Myelinabbau sowie kein Axonverlust festgestellt werden (Rosenbluth et al., 1980). Eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien sowie ein gestauchtes axonales Zytoskelett konnte nachgewiesen werden (Brady, 1999; Andrews et al., 2006). Die Myelinlamellenablagerung schädigt die Insulatorfunktion nicht, jedoch könnte es einen toxischen Defekt auf das myelinisierte Axon hervorrufen (Nave, 2010). Im Gegensatz zu den *shiverer* Mäusen deutet es jedoch daraufhin, dass eine axonale Degeneration in den CerS2^{gt/gt} Mäusen stattgefunden hat, da sich „leere“ Mikrozysten gebildet haben. Eine axonale Degeneration konnte in den Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT)- oder in den 2'-3'-zyklische-Nukleotid-Phosphatase (CNP) deletierten Mäusen nachgewiesen werden (Dupree et al., 1998; Lappe-Siefke et al., 2003). Die Ceramid-Galaktosyltransferase deletierten Mäuse konnten kein Galaktosylceramid sowie kein Sulfatid mehr bilden, wodurch die dichte Kompaktierung des Myelins nicht mehr aufrechterhalten werden konnte und zu einer axonalen Degeneration führt (Bosio et al., 1996; Dupree et al., 1998). Zusätzlich konnten Anomalitäten im Bereich der Ranvierschen Schnürringe und in der benachbarten Region, den Paranodien festgestellt werden (Dupree et al., 1998). In CGT deletierten Mäusen konnte eine Hinterbein Lähmung beobachtet werden, die auf einen motorischen Defekt hinweisen. Motorische Defekte zeigten auch CerS2^{gt/gt} Mäuse, die sich jedoch nicht durch Zittern sowie Ataxien der Vorderläufe und Hinterläufe wie in CGT deletierten Mäusen kennzeichnen. Die CerS2^{gt/gt} Mäuse zeigten eine kurzfristige Lähmung der Hinterläufe bzw. des gesamten Körpers, Phasen des Kopfnickens sowie eine umklammerte Stellung der Hinterbeine beim Hochheben der Mäuse (claspig Verhalten). Eine umklammerte Stellung der Hinterbeine wurde auch in konditionalen Glukosylceramidsynthase (Ugcg Gen) defizienten Mäusen beobachtet, die in Nestin markierten Neuronen deletiert wurden. Dabei konnte die starke Deletion von Purkinje-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine starke Abnahme der Ganglioside beobachtet (Yamashita et al., 2005). Der Verhaltensphänotyp ähnelt dem Verhaltensphänotypen der CerS2^{gt/gt} Mäuse. Jedoch kam es in 11 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen zu einer

geringfügigen Erhöhung von GD1a, GD1b und GT1a. Dies widerspricht den Ugcg Gen defizienten Mäusen. Anstelle der Ganglioside GD1a, GD1b und GT1a nahmen die neutralen Sphingolipide (Sphingomyelin, Galaktosylceramid) und Sulfatid weiter ab. Durch die Abnahme dieser Sphingolipide könnte ein langsamer Abbau des Myelins erklärt werden, da die Oligodendrozyten der Hauptproduzent dieser Lipide sind.

Die kurzfristigen Lähmungen sowie die Phase des Kopfnickens könnten auf epileptische Anfälle hindeuten. Nidogen 1 deletierte Mäuse mit heterozygoten Nidogen 2 deletierten Mäusen (NID1^{-/-}/NID2^{+/-}) weisen einen ähnlichen Verhaltensphänotyp auf. Sie zeigen zittern-ähnliche Phänotypen mit Vorderbeinkrämpfen, Kopfnickungsphasen sowie kurzfristigen Lähmungserscheinungen (Dong et al., 2002; Vasudevan et al., 2010), die eine frühe Form der Epilepsie darstellen. Die Epilepsie ist definiert als wiederholtes und spontanes Auftreten von Anfällen. Die Entstehung der Epilepsie geht mit zahlreichen plastischen Veränderungen des Nervensystems einher. Plastische Veränderungen können strukturell und synaptisch erfolgen. Synaptische Plastizität ist die Änderung einer Stärke der synaptischen Übertragung von Neuron zu Neuron (Malenka et al., 2002). Die Grundlagen der plastischen Veränderung gehen strukturell mit der Aussprossung von Moosfasern im Hippokampus sowie einer Astrogliose einher.

Nidogen 1 und 2 sind ein Hauptbestandteil der Basallamina, die als eine spezialisierte extrazelluläre Matrix unterhalb von Epithelien liegt oder Zellschichten wie z.B. Muskel-, Fett- und Schwannzellen umschließt (Köhling et al., 2006). Im Gehirn befinden sich die beiden Nidogene in der Basallamina der Mennigen und der Blutgefäße. In EEG-Aufnahmen von Hippokampi der NID1^{-/-}/NID2^{+/-} Mäuse konnten epilepsieartige Aktivitäten nachgewiesen werden. Morphologisch waren die NID1^{-/-}/NID2^{+/-} Mäuse unauffällig. Sie zeigten keine Aussprossung der Moosfasern, jedoch konnte eine Astrogliose im Hilus und der CA3 Region des Hippokampus beobachtet werden. Ebenso konnte in diesen Mutanten eine Veränderung in der synaptischen Plastizität sowie eine Hyperexzitabilität in der CA1 Region des Hippokampus nachgewiesen werden (Dong et al., 2002; Vasudevan et al., 2010). Ein möglicher Mechanismus der veränderten Hyperexzitabilität und der synaptischen Plastizität in NID1^{-/-}/NID2^{+/-} Mäusen könnte Veränderungen auf die zellulären Laminin Rezeptoren besitzen, die eine Veränderung in der Regulation von Kalzium bewirkt oder eine synaptische strukturelle Änderung hervorrufen kann (Chan et al., 2003; Vasudevan et al., 2010).

Die CerS2^{gt/gt} Mäuse könnten ebenfalls an epileptischen Anfällen leiden. Die β -Galaktosidase Reportergen Expression, die unter dem CerS2 Promotor steht, wurde in Ependymzellen bestimmt. Die erzeugten C22:0 und C24:0 Ceramide bzw. Sphingolipide könnten bei der Zusammensetzung der Basallamina eine Rolle spielen, wodurch die Abwesenheit dieser Sphingolipid Rezeptoreigenschaften der Laminine wie Integrin oder Nidogen1 verändert sein könnte.

5.1.7 Vergleich der *CerS2^{gt/gt}* Mäuse mit und ohne Hygromylinresistenz auf der Grundlage der neutralen Glykosphingolipide

Neben den Northern-Blot Hybridisierungen und der Allelverteilung nach Mendel wurden die neutralen Sphingolipide der *CerS2^{gt/gt}* Mäuse mit und ohne Hygromylinresistenzkassette verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass kein Unterschied im Lipidmuster zwischen den neutralen Sphingolipiden der *CerS2^{gt/gt}* Mäuse mit und ohne Hygromylinresistenzkassette auftrat.

5.2 Nicht konventioneller *CerS4KILacZ* Vektor

Durch die Erzeugung von *CerS4KILacZ* Mäusen sollte die Funktion des *CerS4* Gens untersucht werden. Bislang ist bekannt, dass *CerS4* ubiquitär transkribiert wird. Die stärkste gefundene Transkriptmenge ist abhängig von der Nachweismethode. Durch eine Northern-Blot Analyse wurde die meiste *CerS4* mRNA in der Haut und in der Lunge nachgewiesen, wohingegen durch Real-Time PCR Analysen zusätzlich eine hohe Transkriptmenge im Herz und der Leber nachgewiesen wurde (Mizutani et al., 2005; Laviad et al., 2007).

Die Funktion des *CerS4* Proteins ist bislang in den Organen, in denen es transkribiert wird, nicht bekannt. Aufgrund der Vitalität der *CerS2^{gt/gt}* Mäuse, die am Anfang dieser Arbeit sichtbar war und der ebenfalls ubiquitären *CerS2* Expression, wurde sich für die Klonierung eines nicht konditionalen Austauschvektors von *CerS4* entschieden.

Da die Funktion der beiden potentiell funktionellen Domänen (TLC-Domäne und Homöobox-Domäne) des *CerS4* Proteins unbekannt sind (Pewzner-Jung et al., 2006), sollte die vollständige kodierende Region von *CerS4* ausgeschaltet werden. Die gesamte kodierende Region des *CerS4* wurde durch ein kernlokalisiertes β -Galaktosidase Reporter gen und eine frt-flankierte Neomycinresistenzkassette ersetzt. Das kernlokalisierte β -Galaktosidase Reporter gen wurde verwendet, da die Transkriptmenge des *CerS4* Gens teilweise sehr gering ist. Bei einem schwachen endogenen Promotor könnte es zu einer schwachen Transkriptmenge des *CerS4* Gens kommen, die aufgrund der Sensitivität der LacZ Färbung jedoch gut nachweisbar wäre. Beim Einsatz von Reporter genen der GFP-Familie könnte die geringe Transkriptmenge des *CerS4* Gens nicht erkannt werden. Zusätzlich sollte das Reporter gen NLS-LacZ an den endogenen Spleissakzeptor vor Exon2 des *CerS4* Gens gekoppelt werden, um ein korrektes Spleissen des untranslatierten Exon1 an die β -Galaktosidase zu ermöglichen.

Das Neomycinresistenzgen wird von zwei frt-Elementen flankiert, die eine Deletion des Gens durch die FLP-Rekombinase erlauben. Dies ist notwendig, um einen möglichen Einfluss des PGK-Promotors auf benachbarte Sequenzen zu vermeiden (Pham et al., 1996).

Die 5' Homologie besteht aus einem Teil des Introns 1, wohingegen die 3' Homologie aus dem Bereich der ersten drei Polyadenylierungssignale des *CerS4* Gens besteht. Die beiden homologen Regionen werden in den ES-Zellen für die homologe Rekombination in den nativen Genlokus benötigt. Die Erhaltung der vier endogenen Polyadenylierungssignale, von denen drei in der 3' Homologie vorhanden sind, wurde aufgrund von Datenbank-Recherchen bei der Erzeugung des nicht konditionalen Austauschvektors miteinbezogen, da in der Haut (10 Tage alter Mäuse) Transkripte unterschiedlicher Länge identifiziert worden sind, die nach dem 2., 3. oder 4. Polyadenylierungssignal enden. Transkripte, die nach dem 1. Polyadenylierungssignal enden, wurden in der Datenbank angezeigt, jedoch ist die Herkunft nicht angegeben. Es ist nicht bekannt, welchen Einfluss diese unterschiedlichen Längen auf die Stabilität der *CerS4* mRNA besitzen. Die Stabilität der mRNA kann die Genexpression positiv oder negativ regulieren (Tilmar et al., 2002; Balmer et al., 2001; Day und Tuite, 1998). Zur Erleichterung der ES-Zellkultur enthält der Austauschvektor CerS4KILacZ als Negativ-Selektionskassette die Sequenz des Diphtherien Toxin A Proteins (vgl. 4.2.3), die bei einer falschen homologen Rekombination in den ES-Zellen aktiviert wird und somit den Zelltod der ES-Zellen herbeiführt.

Bei der Charakterisierung des Endvektors CerS4KILacZ durch Restriktionsspaltungen wurde eine Insertion eines Fragments im Intron 1 nachgewiesen. Die Sequenz des Ausgangsvektors stammt aus dem BAC Klon 95P2, der den genetischen Hintergrund der genomischen HM1 DNS besitzt, wohingegen die Sequenz aus der Datenbank einen genetischen Hintergrund von C57BL/6 besitzt. Eine Insertion konnte aufgrund der Amplifikation eines 1,1 kb großen Fragments der genomischen HM1 DNS im Gegensatz zur Amplifikation eines 0,7 kb großen Fragments der genomischen C57BL/6 in der „Intron1“ PCR Reaktion nachgewiesen werden und zeigt somit die Herkunft des Inserts auf. Aufgrund der Restriktionsanalyse mit der anschließenden Sequenzierung sowie dem Nachweis der Insertion durch die PCR „Intron1“ bestätigte sich die Richtigkeit der Vektorsequenz.

Der *NotI* linearisierte Austauschvektor wurde in ES-Zellen transfiziert. Die erste Analyse der transfizierten ES-Zellen, die überprüft, ob eine erfolgreiche homologe Rekombination an der 3' Homologie stattgefunden hat, ist die ES-Zell PCR. Das Amplikon der ES-Zell PCR soll ein 2 kb großes Fragment nachweisen, es zeigte jedoch nur ein 1,8 kb großes Amplikon. Bei der Überprüfung des Testvektors konnten keine Abweichungen in den erwarteten Fragmentmustern festgestellt werden. Das Sinnstrang-Oligonukleotidstartermolekül befindet sich jedoch direkt hinter der zweiten *frt*-Stelle. *frt*-Stellen sind dafür bekannt, dass sie Sekundärstrukturen ausbilden können, wodurch die nachfolgende Sequenz verkürzt vorliegen kann.

Eine weitere Charakterisierung der erfolgreich rekombinierten transfizierten ES-Zellklone wurde durch Southern-Blot- und Karotyp-Analysen vervollständigt. Drei der erfolgreich

homolog rekombinierten ES-Zellklone wurden für die Blastozysteninjektion eingesetzt. Alle daraus resultierenden Chimären wurden mit C57BL/6 verpaart. Jedoch stammen die ersten heterozygoten Tiere nicht von der Chimäre mit dem höchsten Chimärismusgrad, sondern mit einem Chimärismusgrad von nur 75 %. Zur Überprüfung der Expression des β -Galaktosidase Reportergens wurden LacZ gefärbte Hautschnitte verwendet. Die β -Galaktosidase Reportergen Expression in der Haut der $CerS4^{LacZ/+}$ Maus wurde im Haartrichter, im Haarbalg, in der Epidermis sowie in Zellen der Dermis nachgewiesen. Dies zeigt, dass das Reportergen unter dem Promotor des *CerS4* Gens funktionell vorliegt. Es bestätigt die Northern-Blot Analysen und Real-Time PCR Analysen (Mizutani et al., 2005; Laviad et al., 2007).

6 Ausblick

6.1 Charakterisierung von CerS2^{gt/gt} Mäusen

In der Leber der CerS2^{gt/gt} Mäuse könnte die Insulinresistenz bei fetthaltiger Nahrung überprüft werden. Die Insulinresistenz könnte durch Messung der Blutglukose sowie des Insulinspiegels nachgewiesen werden. Zusätzlich könnte das Lipidmuster bei Aufnahme von fetthaltiger Nahrung in CerS2^{gt/gt} Mäusen bestimmt werden. Neben der Bestimmung des Insulinspiegels könnte die Bauchspeicheldrüse, an dem Ort wo die Insulinproduktion stattfindet, auf Anomalien untersucht werden. Diese Anomalien können sich auf eine erhöhte Anzahl und Größe von Langerhans-Inseln äussern, da bei einer Insulinresistenz mehr Insulin erzeugt wird. Zusätzlich könnte die Auswirkung von Insulininjektion auf dem Insulin-Signaltransduktionsweg durch Immunoblotanalysen weiterhin untersucht werden, indem die Menge von phosphoryliertem AKT und die Gesamtmenge an AKT in der Leber und dem Muskel bestimmt wird. Bei einer Insulininjektion in CerS2^{+/+} Mäusen würde die Phosphorylierung von AKT unterdrückt. In CerS2^{gt/gt} Mäusen könnte eine Insulininjektion die Unterdrückung der Phosphorylierung der AKT z.B. durch den Anstieg der C16:0 Sphingolipide verhindern, wodurch eine Insulinsensitivität hervorgerufen werden könnte. Eine ähnliche Situation lag in den Elongase 6 deletierten Mäusen vor, die eine Insulinsensitivität aufwiesen (Matsuzaka et al., 2007).

In der Leber konnte die Vorstufe eines hepatozellulären Karzinoms in 7-9 Monate alten CerS2^{gt/gt} Mäusen nachgewiesen werden. Zur Analyse des Mechanismus der hepatozellulären Karzinomgenese könnten SILAC Experimente mit anschließenden massenspektroskopischen Analysen in Hepatozyten durchgeführt werden. Bei SILAC Experimenten wird das gesamte Proteom von Hepatozyten mit stabilen Isotopen z.B. L-Lysin ¹³C₆ und mit natürlichen Isotopen z.B. L-Lysin ¹²C₆ markiert und gemischt. Die Proteine werden in Peptide gespalten und können massenspektroskopisch quantitativ analysiert werden (Krüger und Mann, 2006). SILAC kann auch in Mäusen durchgeführt werden (Krüger et al., 2008). Diese Experimente könnten Hinweise liefern, welche Proteine herauf- oder herunterreguliert sein könnten, die dann in bestimmte Signaltransduktionswege zugeordnet würden. Diese Proteine könnten einen Hinweis geben, welche Funktion langkettige Sphingolipide auf Membranrezeptoren in der Leber besitzen könnten. Zur Bestätigung der Funktion könnten sogenannte Aktivitätstest durchgeführt werden. Bei der Vermutung des Einflusses auf Rezeptoren, die durch Bindung des Liganden phosphorylieren und dadurch aktiviert werden, könnte in diesen Aktivitätstests, unter Zugabe des Liganden, ein unterschiedliches Mengenverhältnis zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem

Rezeptor erzeugt werden, das durch Einsatz von phospho-spezifischen Antikörpern in Immunoblot Analysen nachgewiesen werden könnte (Liu et al., 2008).

Die CerS2^{gt}-Mauslinie lässt nicht den Schluss zu, ob die TLC-Domäne oder die CerS2 Homöodomäne für die Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms verantwortlich ist. Zwei neue Mauslinien, die nur die Aktivität der TLC-Domäne oder die CerS2 Homöodomäne exprimiert, könnten zeigen, welche der beiden Domänen an der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms beteiligt ist.

In der Niere wurden leere Zysten in 9 Monate alten CerS2^{gt/gt} gefunden (Imgrund et al., 2009), das jedoch nicht mit den Resultaten der Arbeitsgruppe Futerman übereinstimmt, die keine Anomalien in alten CerS2^{gt/gt} Mäusen nachweisen konnten (Pewner-Jung et al., 2010 b). Dieser Widerspruch könnte durch eine Elektronenmikroskopie Analyse behoben werden. Die Entstehung der leeren Zysten könnte durch eine erhöhte Proliferation, die durch eine quantitative Immunfluoreszenz mit den Antikörpern dargestellt werden kann, und Apoptose, die über einen TUNEL Test ermittelt wird, zustande kommen.

Die CerS2^{gt/gt} Mäuse weisen einen Lähmungsphänotyp auf. Diese Einschränkungen der Motoraktivität könnte durch einen Test im freien Gelände (open field assay) weiteranalysiert werden. Ebenso könnten *in vivo* EEG-Aufnahmen sowie elektrophysiologische Aufnahmen *in vitro* für die Analyse des Lähmungsphänotyps verwendet werden. Die *in vivo* EEG-Aufnahmen könnten nachweisen, ob die CerS2^{gt/gt} Mäuse an epileptischen Anfällen leiden, wohingegen elektrophysiologische Aufnahmen (wie Feldpotential-Aufnahme von Hippokampus-Schnitten, input/output- und paired-pulse Experimente) die Stärke der Erregbarkeit sowie eine Veränderung in der synaptischen Plastizität an Hippokampuschnitten nachweisen können.

Immunfluoreszenz Analysen von Lamininen sowie Nidogen 1 könnten in CerS2^{gt/gt} Mäusen reduziert vorliegen. Zusätzlich könnten elektronenmikroskopische Analysen über eine Schädigung der Basallamina Auskunft geben. Evans Blue Experimente könnten Aufschluss über eine intakte Bluthirn-Schranke geben.

Die Demyelinisierung könnte durch Entzündung hervorgerufen werden. Entzündungsfaktoren könnten die Eikosanoide sein, die hauptsächlich aus C20:0 Verbindungen bestehen. Diese werden von Mikroglia ausgeschüttet. Die Zunahme der Mikroglia über immunhistochemische Analysen sowie die erhöhte Synthese der Eikosanoide durch HPTLC könnten nachgewiesen werden. Die Infiltration von B- und T-Zellen könnte durch immunhistochemische Färbung mit

B-zellspezifischen (anti CD-45R) und T-zellspezifischen (anti-CD3) Antikörpern nachgewiesen werden.

Im Gehirn der CerS2^{gt/gt} Mäuse ist die Transkription des *CerS4* Gens hochreguliert. Es würde sinnvoll sein, die CerS2^{gt/gt} Mäuse und CerS4KILacZ Mäuse untereinander zu verpaaren. Diese Mutanten könnten auf die Anomalien im Gehirn untersucht werden. Dabei könnte das Gehirn auf axonale Degeneration sowie Entzündungen im Gehirn untersucht werden. Die Interpretation der Lipidspektren dieser Mutanten könnte dazu beitragen, welche Funktion langkettige Fettsäuren im Gehirn einnehmen könnten.

6.2 Erzeugung von Ceramidsynthase 4 defizienten Mäusen

Die Ceramidsynthase 4 defizienten Mäuse sollten weiter mit deleter Flp Mäusen verpaart werden. Die CerS4^{LacZ/+; Flp} Nachkommen aus dieser Verpaarung sollten weiterverpaart werden mit C57BL/6 zur Deletion der Flp-Rekombinase. Es entstehen CerS4^{+LacZ del neo} Mäuse, die untereinander verpaart werden können. Es würden CerS4^{LacZ/LacZ} Mäuse erzeugt. Zur Überprüfung der genomischen Lokalisation des Austauschvektors sollten Southern-Blot Hybridisierungen aus CerS4^{LacZ/LacZ} Mäusen mit und ohne Neomycinresistenzkassette, CerS4^{+/+} Mäusen sowie CerS4^{+LacZ} mit und ohne Neomycinresistenzkassette durchgeführt werden. Ebenso sollte die Deletion des CerS4 Gens mit den Genotypen CerS4^{+LacZ del neo}, CerS4^{LacZ del neo/LacZ del neo} Mäusen über Northern-Blot Hybridisierungen und Immunoblot Analysen nachgewiesen werden. In Northern-Blot Analysen sind auf die vier Isoformen zu achten, die von Gewebe zu Gewebe variieren. Zu Immunoblot Analysen könnten kommerzielle Antikörper sowie neu erzeugte Antikörper getestet werden. Zusätzlich könnte die Hochregulierung bzw. die Herunterregulierung der anderen Ceramidsynthase Mitglieder über Northern-Blot Hybridisierungen und/oder Immunoblot Analysen nachgewiesen werden. Durch das Reporter gen NLS-LacZ könnte die Lokalisierung im Gewebe vorgenommen werden. Die Fettsäureacyl-CoA Aktivität wurde durch Überexpression der CerS4 cDNS in HEK 293 T-Zellen bzw. durch siRNA Transfektion in MCF-7 Zellen ermittelt. Es wurde die Synthese von C18:0-C20:0 Ceramid bzw. die Synthese von C22:0-C24:0 Ceramid durch die Ceramidsynthase 4 nachgewiesen (Riebeling et al., 2003; Mizutani et al., 2005; Mullen et al., 2010). Dies sollte an den unterschiedlichen Organen bestimmt werden. Ebenso sollte über Dünnschichtchromatographien und massenspektroskopische Analysen die Lipidzusammensetzung insbesondere der Haut ermittelt werden. Die Analysen von Anomalien sollte ebenfalls histologisch vorgenommen werden. Eine Anomalie könnte in der Haut auftreten, da dort die höchste Transkriptmenge des *CerS4* Gens vorhanden ist sowie auch eine starke NLS-LacZ Expression in der Epidermis, im Haarbalg und in einzelnen

Zellen der Dermis. Falls die Mäuse mit schweren Hautdefekten geboren werden, könnte die Wasserbarriere gestört sein, was durch eine Toluidin Blaufärbung nachgewiesen werden könnte (Hardman et al., 1998). An isolierten Kerantinozyten könnte das Migrations-, Adhäsions-, Proliferations- und Apoptoseverhalten untersucht werden. Dies könnte Hinweise geben, an welchen Signaltransduktionswegen CerS4 beteiligt sein könnte. Falls kein Phänotyp in der Haut auftritt, könnte die CerS4 Expression während einer Wundheilung analysiert werden.

7 Zusammenfassung

Die Genfamilie der Maus Ceramidsynthese besteht aus sechs Mitgliedern, *CerS1-CerS6*, die für gewebespezifische und Fettsäureacyl-CoA abhängige Ceramidsynthasen kodieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Charakterisierung einer transgenen Mauslinie mit einem defektem *CerS2* Gen sowie die Erzeugung einer neuen transgenen Mauslinie mit einer Deletion der kodierenden Region des *CerS4* Gens durchgeführt werden.

Die Erzeugung der transgenen Mauslinie mit der Deletion des *CerS2* Gens wurde mittels eines kommerziellen „Gene Trap“ ES-Zellklons ausgeführt. Eine erhöhte Letalität trat in den ersten 3-6 Wochen nach der Geburt bei 9 % des homozygoten Nachwuchses auf. Mit dem überlebten homozygoten Nachwuchs erfolgte die anschließende Charakterisierung mit einer Southern-Blot Analyse zur Überprüfung der Lokalisation des „Gene Traps“ sowie mit einer Northern-Blot Analyse zur Überprüfung der Abwesenheit der mRNA. Da bis zum Ende dieser Arbeit keine funktionellen Antikörper zur Verfügung standen, wurde ein Ceramidsynthese Aktivitätstest sowie massenspektrometrische Analysen durchgeführt, die die Abwesenheit des *CerS2* Proteins in der Leber und des Gehirns bestätigen. *CerS2* ist für die Synthese von langkettigen (C22:0-C24:0) Ceramiden verantwortlich. Sphingolipide mit einer Kettenlänge von C16:0 (Leber-, Nieren- und Gehirn-Ceramid) oder C18:0 (Gehirn Hexosylceramid) waren in *CerS2^{gt/gt}* Mäusen stark erhöht. Im Gehirn von *CerS2^{gt/gt}* Mäusen konnten Anomalitäten des Myelins festgestellt werden, die von einem 70 %igen Verlust des Myelin Basischen Proteins (MBP) begleitet wurden. Die Anomalitäten des Myelins äußerten sich in partiellen Lähmungserscheinungen, Kopfnickungsphasen und beim Hochheben der Maus durch eine umklammerte Stellung der Hinterbeine ab 6 Monate alten *CerS2^{gt/gt}* Mäusen. Desweiteren konnte die Entwicklung von dysplastischen Vorstufen des hepatozellulären Karzinoms und die Bildung von leeren Zysten in der Niere festgestellt werden.

Zur Erzeugung einer *CerS4* transgenen Mauslinie sollte ein nicht-konditionaler *CerS4* Deletionsvektor fertiggestellt werden, der anschließend durch homologe Rekombination in ES-Zellen eingebracht werden sollte. Es wurde die kodierende Region des *CerS4* Gens durch das Reporter gen NLS-LacZ ersetzt, welches an die endogene Spleissakzeptor-Sequenz des Exon1 fusioniert ist. Diese Fusion soll ein korrektes Spleissen des Exon1 an das Reporter gen NLS-LacZ ermöglichen, wodurch nach erfolgreicher homologer Rekombination das Reporter gen NLS-LacZ unter Kontrolle des endogenen *CerS4* Promotors steht. Drei Klone wurden durch eine PCR, Southern-Blot sowie Karyotyp Analyse auf eine erfolgreiche homologe Rekombination in den ES-Zellen überprüft und anschließend zur Blastozysteninjektion eingesetzt. Die daraus resultierenden Chimären erbrachten heterozygote *CerS4^{+LacZ}* Mäuse. Die Funktionalität des Reporter gens von *CerS4^{+LacZ}* Mäusen konnte in der Haut bestätigt werden.

8 Literaturverzeichnis

Andrews H, White K, Thomson C, Edgar J, Bates D, Griffiths I, Turnbull D, Nichols P (2006) Increased axonal mitochondrial activity as an adaptation to myelin deficiency in the Shiverer mouse. *J Neurosci Res* 83:1533-1539

Anzola M (2004) Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 11:383-393

Athenstaedt K, Daum G (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci* 63:1355-1369

Ballabio A, Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793:684-696

Balmer LA, Beveridge DJ, Jazayeri JA, Thomson AM, Walker CE, Leedman PJ (2001) Identification of a novel AU-Rich element in the 3' untranslated region of epidermal growth factor receptor mRNA that is the target for regulated RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 21:2070-2084

Bansal R, Winkler S, Bheddah S (1999) Negative regulation of oligodendrocyte differentiation by galactosphingolipids. *J Neurosci* 19:7913-7924

Basnakian AG, Ueda N, Hong X, Galitovsky VE, Yin X, Shah SV (2005) Ceramide synthase is essential for endonuclease-mediated death of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F308-F314

Bauer R, Voelzmann A, Breiden B, Schepers U, Farwanah H, Hahn I, Eckardt F, Sandhoff K, Hoch M (2009) Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in *Drosophila*. *EMBO J* 28:3706-3716

Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81:871-927

Becker I, Wang-Eckhardt L, Yaghootfam A, Gieselmann V, Eckhardt M (2008) Differential expression of (dihydro)ceramide synthases in mouse brain: oligodendrocyte-specific expression of CerS2/Lass2. *Histochem Cell Biol* 129:233-241

Bertolani C, Marra F (2008) The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiology* 15:91-101

Bjorkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:806-815

Bodennec J, Pelled D, Riebeling C, Trajkovic S, Futerman AH (2002) Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by glucosylceramide. *FASEB J* 16:1814-1816

Boggs JM (2006) Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* 63:1945-1961

Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* 82:405-414

Bosio A, Binczek E, Stoffel W (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13280-13285

Bradley A, Zheng B, Liu P (1998) Thirteen years of manipulating the mouse genome: a personal history. *Int J Dev Biol* 42:943-950

- Brady ST, Witt AS, Kirkpatrick LL, de Waegh SM, Readhead C, Tu PH, Lee VM (1999) Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *J Neurosci* 19:7278-7288
- Bremer EG, Hakomori S (1984) Gangliosides as receptor modulators. *Adv Exp Med Biol* 174:381-394
- Breslow DK, Weissman JS (2010) Membranes in balance: mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Mol Cell* 40:267-279
- Bullock W.O. FFMSJM (2011) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5:376-380
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337-344
- Capeau J, Magre J, Lascols O, Caron M, Bereziat V, Vigouroux C, Bastard JP (2005) Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. *Biochem Soc Trans* 33:1073-1077
- Chan C, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD, Davis RL (2003) Integrin Requirement for Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *J Neurosci* 23:7107-7116
- Chrast R, Saher G, Nave KA, Verheijen MH (2011) Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res* 52:419-434
- Copeland N, Jenkins NA, Court D (2001) Recombineering: A powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Genet* 2:769-779
- Cowart LA (2009) Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab* 20:34-42
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075
- D'Angelo G, Polishchuk E, Di TG, Santoro M, Di CA, Godi A, West G, Bielawski J, Chuang CC, van der Spoel AC, Platt FM, Hannun YA, Polishchuk R, Mattjus P, De Matteis MA (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* 449:62-67
- D'mello NP, Childress AM, Franklin DS, Kale SP, Pinswasdi C, Jazwinski SM (1994) Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast. *J Biol Chem* 269:15451-15459
- Day DA, Tuite MF (1998) Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* 157:361-371
- de Chaves EP, Bussiere M, Campenot R, Vance D, Vance J (1998) Inhibition of neurite growth by ceramide in rat sympathetic neurons. *Ann N Y Acad Sci* 845:405
- de FF, Engh H, Hudson L, Kamholz J, Puckett C, Molineaux S, Lazzarini RA (1985) Alternative splicing accounts for the four forms of myelin basic protein. *Cell* 43:721-727
- Del Bigio MR (2010) Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:55-73
- Deng X, Yin X, Allan R, Lu DD, Maurer CW, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Shaham S, Kolesnick R (2008) Ceramide biogenesis is required for radiation-induced apoptosis in the germ line of *C. elegans*. *Science* 322:110-115
- Deshmukh G, Radin N, Gattone V, Shayman J (1994) Abnormalities of glycosphingolipid, sulfatide, and ceramide in the polycystic (cpk/cpk) mouse. *J Lipid Res* 35:1611-1618
- Devaux J, Alcaraz G, Grinspan J, Bennett V, Joho R, Crest M, Scherer SS (2003) Kv3.1b is a novel component of CNS nodes. *J Neurosci* 23:4509-4518

- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 268:15523-15530
- Dod B, Gray M (1968) The lipid composition of rat-liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 150:397-404
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78:857-902
- Dong L, Chen Y, Lewis M, Hsieh JC, Reing J, Chaillet JR, Howell CY, Melhem M, Inoue S, Kuszak JR, DeGeest K, Chung AE (2002) Neurologic defects and selective disruption of basement membranes in mice lacking entactin-1/nidogen-1. *Lab Invest* 82:1617-1630
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343-1351
- Eckhardt M (2008) The Role and Metabolism of Sulfatide in the Nervous System. *Mol Neurobiol* 37:93-103
- Dupree JL, Suzuki K, Popko B (1998) Galactolipids in the formation and function of the myelin sheath. *Microsc Res Tech* 41:431-440
- Farazi PA, DePinho RA (2006a) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6:674-687
- Farazi PA, DePinho RA (2006b) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6:674-687
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T (2000) Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* 106:1-29
- Friedel RH, Seisenberger C, Kaloff C, Wurst W (2007) EUCOMM--the European conditional mouse mutagenesis program. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6:180-185
- Futerman AH, Banker GA (1996) The economics of neurite outgrowth--the addition of new membrane to growing axons. *Trends Neurosci* 19:144-149
- Futerman AH, Riezman H (2005) The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* 15:312-318
- Gabellec MM, Steffan AM, Dodeur M, Durand G, Kirn A, Rebel G (1983) Membrane lipids of hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 113:845-853
- Gault C, Obeid L, Hannun YA (2010) An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv Exp Med Biol* 688:1-23
- Gehring WJ (1993) Exploring the homeobox. *Gene* 135:215-221
- George J, Liddle C (2008) Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and potential for nuclear receptors as therapeutic targets. *Mol Pharm* 5:49-59
- Gibbons G, Wiggins D, Brown A, Hebbachi A (2004) Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 32:59-64
- Gould RM, Byrd AL, Barbarese E (1995) The number of Schmidt-Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths. *J Neurocytol* 24:85-98
- Gulbins E, Grassme H (2002) Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* 1585:139-145

- Halter D, Neumann S, van Dijk SM, Wolthoorn J, de Maziere AM, Vieira OV, Mattjus P, Klumperman J, van MG, Sprong H (2007) Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J Cell Biol* 179:101-115
- Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T (2009) CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* 1791:684-691
- Hao CM, Breyer MD (2007) Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. *Kidney Int* 71:1105-1115
- Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C (1998) Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development* 125:1541-1552
- Heape A, Boiron F, Cassagne C (1987) A developmental study of fatty acyl group contents in the peripheral nervous system of normal and trembler mice. *Neurochem Pathol* 7:157-167
- Henry SH (1999) Policy forum: public health. Reducing liver cancer--global control of aflatoxin. *Science* 286:2453-2454
- Hirschberg K, Rodger J, Futerman AH (2011) The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem J* 290:751-757
- Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W (2000) Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5895-5900
- Holthuis JC, Luberto C (2010) Tales and mysteries of the enigmatic sphingomyelin synthase family. *Adv Exp Med Biol* 688:72-85
- Howard PC, Eppley RM, Stack ME, Warbritton A, Voss KA, Lorentzen RJ, Kovach RM, Bucci TJ (2001) Fumonisin b1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 2:277-282
- Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM, Tai MH (2003) Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97:1929-1940
- Huwiler A, Boddingtonhaus B, Pautz A, Dorsch S, Franzen R, Briner VA, Brade V, Pfeilschifter J (2001) Superoxide potently induces ceramide formation in glomerular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284:404-410
- Ikonen E (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:125-138
- Im D, Heise C, Nguyen T, O'Dowd B, Lynch K (2001) Identification of a molecular target of psychosine and its role in globoid cell formation. *J Cell Biol* 153:429-434
- Imgrund S (2007) Vorversuche zur Erzeugung von Mäusen mit Defekten in zwei Genen zur Ceramidsynthese (Lass2 und Lass4). Diplomarbeit
- Inokuchi J (2006) Insulin resistance as a membrane microdomain disorder. *Biol Pharm Bull* 29:1532-1537
- Inoue Y, Nakamura R, Mikoshiba K, Tsukada Y (1981) Fine structure of the central myelin sheath in the myelin deficient mutant Shiverer mouse, with special reference to the pattern of myelin formation by oligodendroglia. *Brain Res* 219:85-94
- Ishiyama N, Bates IR, Hill CM, Wood DD, Matharu P, Viner NJ, Moscarello MA, Harauz G (2001) The effects of deimination of myelin basic protein on structures formed by its interaction with phosphoinositide-containing lipid monolayers. *J Struct Biol* 136:30-45

- Jackman N, Ishii A, Bansal R (2009) Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology (Bethesda)* 24:290-297
- Jenkins GM, Cowart LA, Signorelli P, Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA (2002) Acute activation of de novo sphingolipid biosynthesis upon heat shock causes an accumulation of ceramide and subsequent dephosphorylation of SR proteins. *J Biol Chem* 277:42572-42578
- Jennemann R, Sandhoff R, Wang S, Kiss E, Gretz N, Zuliani C, Martin-Villalba A, Jager R, Schorle H, Kenzelmann M, Bonrouhi M, Wiegandt H, Grone HJ (2005) Cell-specific deletion of glucosylceramide synthase in brain leads to severe neural defects after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12459-12464
- Jiang J., Nilsson-Ehle P., Xu N. (2006) Influence of liver cancer on lipid and lipoprotein metabolism.
- Jiang JC, Kirchman PA, Zagulski M, Hunt J, Jazwinski SM (1998) Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and human. *Genome Res* 8:1259-1272
- Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13678-13683
- Kageyama-Yahara N, Riezman H (2006) Transmembrane topology of ceramide synthase in yeast. *Biochem J* 398:585-593
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094
- Kalshorn T, Zager R (1999) Renal cortical ceramide patterns during ischemic and toxic injury: assessments by HPLC-mass spectrometry. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F723-F733
- Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, Brugger B, Mildner A, Werner HB, Natt O, Michaelis T, Prinz M, Frahm J, Nave KA (2007) Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 39:969-976
- Kent C (1995) Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 64:315-343
- Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G (1999) Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 112:387-401
- Köhling R, Nischt R, Vasudevan A, Ho M, Weiergräber M, Schneider T, Smyth N (2006) Nidogen and Nidogen-Associated Basement Membrane Proteins and Neuronal Plasticity. *Neurodegenerative Dis* 3:56-61
- Koybasi S, Senkal CE, Sundararaj K, Spassieva S, Bielawski J, Osta W, Day TA, Jiang JC, Jazwinski SM, Hannun YA, Obeid LM, Ogretmen B (2004) Defects in cell growth regulation by C18:0-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas. *J Biol Chem* 279:44311-44319
- Kremser C (2011) Analysen zur Bedeutung der Homöodomäne der Ceramidsynthase 2 in der Maus. Diplomarbeit
- Krüger M, Mann M (2006) Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse. *BIOspektrum* 12:378-380

- Krüger M, Moser M, Ussar S, Thievensen I, Lubert C, Forner F, Schmidt S, Zanivan S, Faessler R, Mann M (2008) SILAC Mouse for Quantitative Proteomics Uncovers Kindlin-3 as an Essential Factor for Red Blood Cell Function. *Cell* 134:353-364
- Lahiri S, Futerman AH (2007) The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 64:2270-2284
- Lahiri S, Lee H, Mesicek J, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Kolesnick R, Futerman AH (2007) Kinetic characterization of mammalian ceramide synthases: Determination of Km values towards sphinganine. *FEBS Letters* 581:5289-5294
- Langstein HN, Norton JA (1991) Mechanisms of cancer cachexia. *Hematol Oncol Clin North Am* 5:103-123
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave KA (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33:366-374
- Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, Epstein S, Park H, Merrill AH, Jr., Futerman AH (2008) Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 283:5677-5684
- Lee AG (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1-40
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G (2007) Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773:1196-1212
- Lewandoski M (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2:743-755
- Liu B, Hannun YA (1997) Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* 272:16281-16287
- Liu P, Jenkins NA, Copeland N (2003) A Highly Efficient Recombineering-Based Method for Generating Conditional Knockout Mutations. *Genome Research* 13:476-484
- Liu Y, Su Y, Wiznitzer M, Epifano O, Ladisch S (2008) Ganglioside depletion and EGF responses of human GM3 synthase-deficient fibroblasts. *Glycobiology* 18:593-601
- Lopez PH, Schnaar RL (2009) Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* 2009 19:549-557
- Lund P, Schubert D, Niketeghad F, Schirmacher P (2004) Autocrine inhibition of chemotherapy response in human liver tumor cells by insulin-like growth factor-II. *Cancer Lett* 206:85-96
- Macala LJ, Yu RK, Ando S (1983) Analysis of brain lipids by high performance thin-layer chromatography and densitometry. *J Lipid Res* 24:1243-1250
- Magin TM, McWhir J, Melton DW (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20:3795-3796
- Magness ST, Bataller R, Yang L, Brenner DA (2004) A dual reporter gene transgenic mouse demonstrates heterogeneity in hepatic fibrogenic cell populations. *Hepatology* 40:1151-1159
- Malenka R (2002) Synaptic Plasticity . *Neuropsychopharmacology* 147-156
- Manfredi MG, Lim S, Claffey KP, Seyfried TN (1999) Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res* 59:5392-5397

- Marchase RB (1977) Biochemical investigations of retinotectal adhesive specificity. *J Cell Biol* 75:237-257
- Mari M, Fernandez-Checa JC (2007) Sphingolipid signalling and liver diseases. *Liver Int* 27:440-450
- Martini R, Zielasek J, Toyka KV, Giese KP, Schachner M (1995) Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat Genet* 11:281-286
- Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N., Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hasty AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H., Yamada N (2007) Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 13:1193-1202
- Mendez-Sanchez N, Arrese M, Zamora-Valdes D, Uribe M (2007) Current concepts in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 27:423-433
- Menuz V, Howell KS, Gentina S, Epstein S, Riezman I, Fornallaz-Mulhauser M, Hengartner MO, Gomez M, Riezman H, Martinou JC (2009) Protection of *C. elegans* from anoxia by HYL-2 ceramide synthase. *Science* 324:381-384
- Merrill AH, Jr., 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* 261:3764-3769
- Merrill AH, Jr., Wang E, Vales TR, Smith ER, Schroeder JJ, Menaldino DS, Alexander C, Crane HM, Xia J, Liotta DC, Meredith FI, Riley RT (1996) Fumonisin toxicity and sphingolipid biosynthesis. *Adv Exp Med Biol* 392:297-306
- Mesicek J, Lee H, Feldman T, Jiang X, Skobeleva A, Berdyshev EV, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R (2010) Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. *Cell Signal* 22:1300-1307
- Mesika A, Ben-Dor S, Laviad EL, Futerman AH (2007) A new functional motif in Hox domain-containing ceramide synthases: identification of a novel region flanking the Hox and TLC domains essential for activity. *J Biol Chem* 282:27366-27373
- Michiel DF, Oppenheim JJ (1992) Cytokines as positive and negative regulators of tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol* 3:3-15
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y (2005) Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J* 390:263-271
- Mizutani Y, Kihara A, Igarashi Y (2006) LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem J* 398:531-538[^]
- Mukherjee P, Faber A, Baek RC, Chiles TC, Seyfried TN (2008) Thematic review series: sphingolipids. Ganglioside GM3 suppresses the proangiogenic effects of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1a. *J Lipid Res* 49:929-938
- Mullen TD, Spassieva S, Jenkins RW, Kitatani K, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM (2011) Selective knockdown of ceramide synthases reveals complex interregulation of sphingolipid metabolism. *J Lipid Res* 52:68-77
- Muller G, Ayoub M, Storz P, Rennecke J, Fabbro D, Pfizenmaier K (1995) PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 14:1961-1969

- Musse AA, Gao W, Homchaudhuri L, Boggs JM, Harauz G (2008a) Myelin basic protein as a "PI(4,5)P2-modulin": a new biological function for a major central nervous system protein. *Biochemistry* 47:10372-10382
- Musse AA, Gao W, Homchaudhuri L, Boggs JM, Harauz G (2008b) Myelin basic protein as a "PI(4,5)P2-modulin": a new biological function for a major central nervous system protein. *Biochemistry* 47:10372-10382
- Mutka AL, Haapanen A, Kakela R, Lindfors M, Wright AK, Inkinen T, Hermansson M, Rokka A, Corthals G, Jauhainen M, Gillingwater TH, Ikonen E, Tynnela J (2010) Murine cathepsin D deficiency is associated with dysmyelination/myelin disruption and accumulation of cholesteryl esters in the brain. *J Neurochem* 112:193-203
- Nagle CA, Klett EL, Coleman RA (2009) Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res* 50 Suppl:S74-S79
- Nagy A. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Natoli TA, Smith LA, Rogers KA, Wang B, Komarnitsky S, Budman Y, Belenky A, Bukanov NO, Dackowski WR, Husson H, Russo RJ, Shayman JA, Ledbetter SR, Leonard JP, Ibraghimov-Beskrovnyaya O (2010) Inhibition of glucosylceramide accumulation results in effective blockade of polycystic kidney disease in mouse models. *Nat Med* 16:788-792
- Nave KA (2010) Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 11:275-283
- Nave KA, Trapp BD (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* 31:535-561
- Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK (2001) Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 116:838-845
- Norton WT, Poduslo SE (1973a) Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem* 21:759-773
- Norton WT, Poduslo SE (1973b) Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J Neurochem* 21:749-757
- Omlin FX, Webster HD, Palkovits CG, Cohen SR (1982) Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *J Cell Biol* 95:242-248
- Ono M, Handa K, Withers DA, Hakomori S (1999) Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation. *Cancer Res* 59:2335-2339
- Osawa Y, Uchinami H, Bielawski J, Schwabe RF, Hannun YA, Brenner DA (2005) Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 280:27879-27887
- Pan H, Qin WX, Huo KK, Wan DF, Yu Y, Xu ZG, Hu QD, Gu KT, Zhou XM, Jiang HQ, Zhang PP, Huang Y, Li YY, Gu JR (2001) Cloning, mapping, and characterization of a human homologue of the yeast longevity assurance gene LAG1. *Genomics* 77:58-64
- Pankova-Kholmyansky I, Flescher E (2006) Potential new antimalarial chemotherapeutics based on sphingolipid metabolism. *Chemotherapy* 52:205-209
- Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Futerman AH (2006) When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* 281:25001-25005

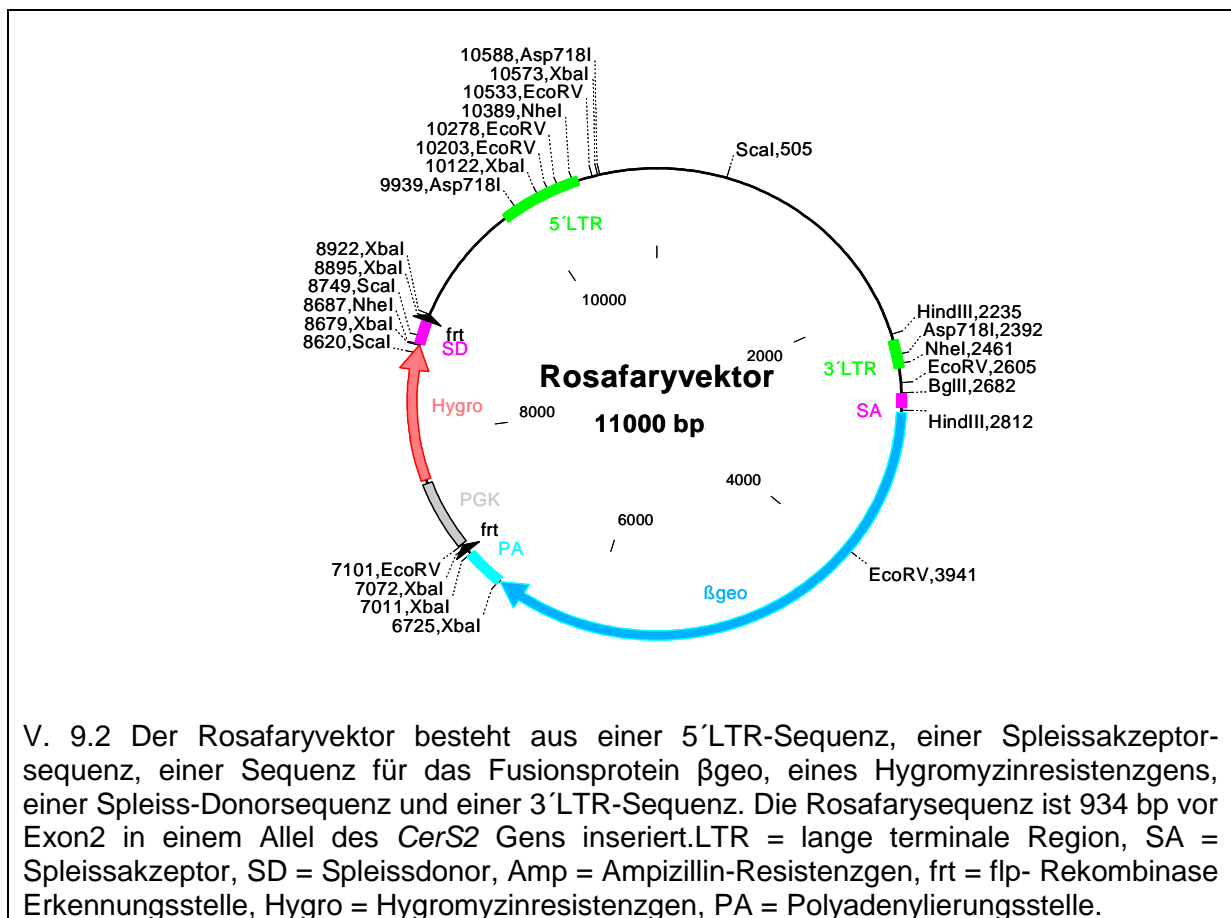
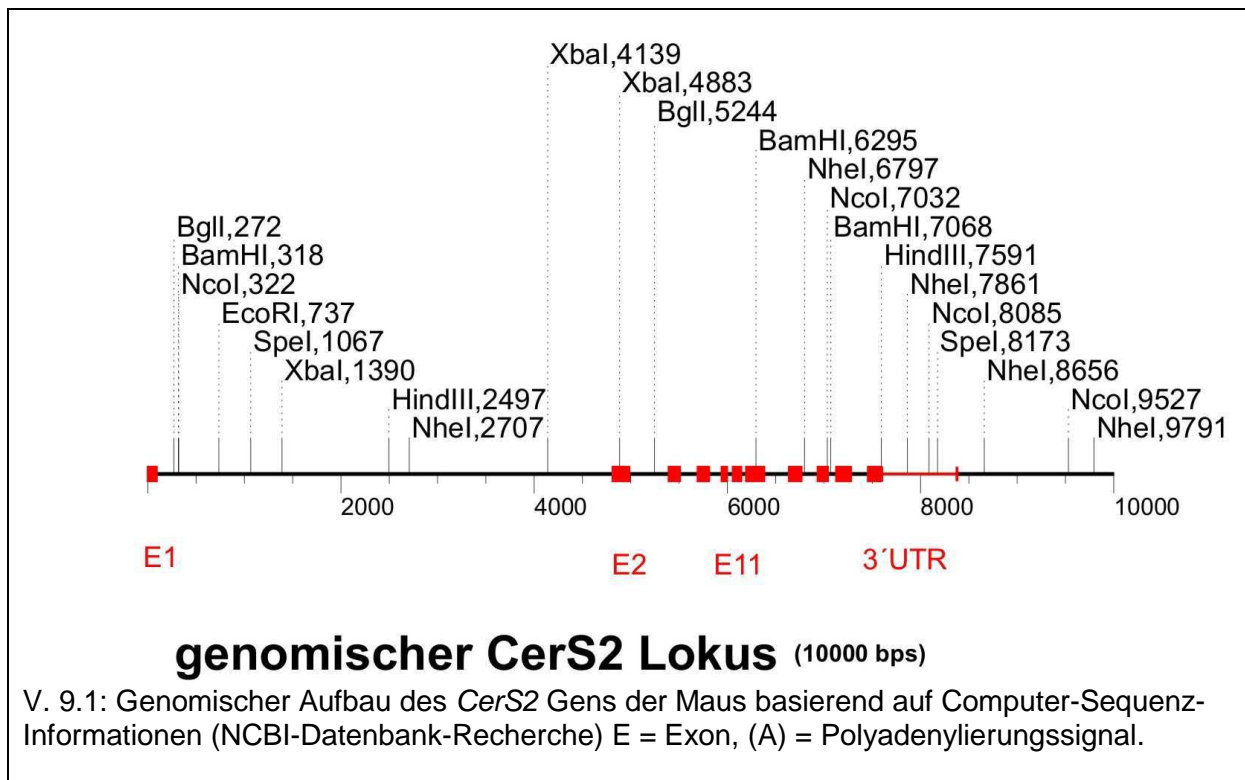
- Pewzner-Jung Y, Brenner O, Braun S, Laviad EL, Ben-Dor S, Feldmesser E, Horn-Saban S, mann-Zalcenstein D, Raanan C, Berkutzi T, Erez-Roman R, Ben-David O, Levy M, Holzman D, Park H, Nyska A, Merrill AH, Jr., Futerman AH (2010a) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: II. insights into molecular changes leading to hepatopathy. *J Biol Chem* 285:10911-10923
- Pewzner-Jung Y, Park H, Laviad EL, Silva LC, Lahiri S, Stiban J, Erez-Roman R, Brugger B, Sachsenheimer T, Wieland F, Prieto M, Merrill AH, Jr., Futerman AH (2010b) A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. *J Biol Chem* 285:10902-10910
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R (1993) The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3:191-197
- Pham CT, MacIvor DM, Hug BA, Heusel JW, Ley TJ (1996) Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13090-13095
- Potter VR (1978) Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. *Br J Cancer* 38:1-23
- Prentki M, Madiraju SR (2008) Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29:647-676
- Prinetti A, Aureli M, Illuzzi G, Prioni S, Nocco V, Scandroglio F, Gagliano N, Tredici G, Rodriguez-Menendez V, Chigorno V, Sonnino S (2010) GM3 synthase overexpression results in reduced cell motility and in caveolin-1 upregulation in human ovarian carcinoma cells. *Glycobiology* 20:62-77
- Proia RL (2004) Gangliosides help stabilize the brain. *Nat Genet* 36:1147-1148
- Ranscht B, Clapshaw PA, Price J, Noble M, Seifert W (1982) Development of oligodendrocytes and Schwann cells studied with a monoclonal antibody against galactocerebroside. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:2709-2713
- Renert AF, Leprince P, Dieu M, Renaut J, Raes M, Bours V, Chapelle JP, Piette J, Merville MP, Fillet M (2009) The proapoptotic C16-ceramide-dependent pathway requires the death-promoting factor Btf in colon adenocarcinoma cells. *J Proteome Res* 8:4810-4822
- Riebeling C, Allegood JC, Wang E, Merrill AH, Jr., Futerman AH (2003) Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, *trh1* and *trh4*, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors. *J Biol Chem* 278:43452-43459
- Rodríguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM (2000) High-efficiency deleter mice show that *FLPe* is an alternative to *Cre-loxP*. *Nat Genet* 25:139-140
- Rosenbluth J (1980) Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol* 194:639-648
- Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R (2005) Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* 280:26425-26434
- Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B (2008a) Roles of Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapeutics. *Subcell Biochem* 49:413-440
- Saher G, Quintes S, Mobius W, Wehr MC, Kramer-Albers EM, Brugger B, Nave KA (2009) Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* 29:6094-6104
- Sandhoff K, Kolter T (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:847-861

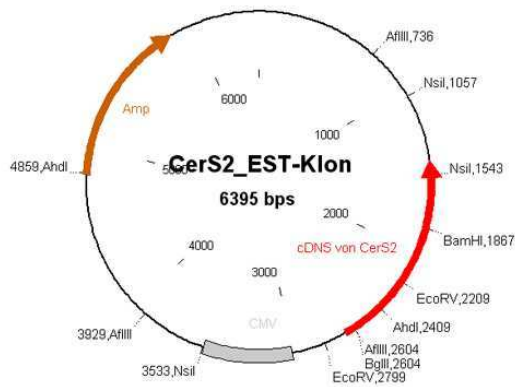
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN (2001) Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192
- Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176
- Schedl A (2007) Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* 8:791-802
- Schirmacher P, Held WA, Yang D, Chisari FV, Rustum Y, Rogler CE (1992) Reactivation of insulin-like growth factor II during hepatocarcinogenesis in transgenic mice suggests a role in malignant growth. *Cancer Res* 52:2549-2556
- Schmidt VA, Chiariello CS, Capilla E, Miller F, Bahou WF (2008) Development of hepatocellular carcinoma in Iqgap2-deficient mice is IQGAP1 dependent. *Mol Cell Biol* 28:1489-1502
- Schnaar RL, Lopez PH (2009) Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J Neurosci Res* 87:3267-3276
- Schorling S, Vallee B, Barz WP, Riezman H, Oesterhelt D (2001) Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 12:3417-3427
- Seisenberger C, KCFTWW (2006) EUCOMM: The european conditional mouse mutagenesis program. *BIOspektrum* 12:83-87
- Senkal CE, Ponnusamy S, Bielawski J, Hannun YA, Ogretmen B (2010) Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways. *FASEB J* 24:296-308
- Shi Y, Cheng D (2009) Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E10-E18
- Shimamura T, Saito S, Morita K, Kitamura T, Morimoto M, Kiba T, Numata K, Tanaka K, Sekihara H (2000) Detection of vascular endothelial growth factor and its receptor expression in human hepatocellular carcinoma biopsy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 15:640-646
- Shimeno H, Soeda S, Sakamoto M, Kouchi T, Kowakame T, Kihara T (1998) Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids* 33:601-605
- Shine HD, Readhead C, Popko B, Hood L, Sidman RL (1992) Morphometric analysis of normal, mutant, and transgenic CNS: correlation of myelin basic protein expression to myelinogenesis. *J Neurochem* 58:342-349
- Small RK, Riddle P, Noble M (1987) Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328:155-157
- Sornmayura P, Boonsakan P, Sobhonslidsuk A, Sriphojanart S, Euanorasetr C, Bunyaratvej S (2007) Dysplastic nodules and small primary carcinoma of the liver: a study detecting the early morphological changes during hepatocarcinogenesis. *J Med Assoc Thai* 90:352-362
- Spassieva S, Seo JG, Jiang JC, Bielawski J, varez-Vasquez F, Jazwinski SM, Hannun YA, Obeid LM (2006) Necessary role for the Lag1p motif in (dihydro)ceramide synthase activity. *J Biol Chem* 281:33931-33938
- Spassieva S, Mullen T, Townsend DM, Obeid L (2009) Disruption of ceramide synthesis by CerS2 down-regulation leads to autophagy and the unfolded protein response. *Biochem J* 424:273-283
- Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397-407

- Takenaka T, Hiruma H, Hori H, Hashimoto Y, Ichikawa T, Kawakami T (2003) Fatty acids as an energy source for the operation of axoplasmic transport. *Brain Res* 972:38-43
- Takiar V, Caplan MJ (2010) Telling kidneys to cease and decyst. *Nat Med* 16:751-752
- Tamura S, Shimomura I (2005) Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1139-1142
- Thorgeirsson SS, Grisham JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31:339-346
- Tillmar L, Welsh N (2002) Hypoxia may increase rat insulin mRNA levels by promoting binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the pyrimidine-rich insulin mRNA 3'-untranslated region. *Mol Med* 8:263-272
- Tirnitz-Parker J, Olynyk J (2009) Liver Carcinogenesis. *Cancer Forum* 33:
- Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A (1988) Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *J Infect Dis* 157:413-420
- Trauner M, Arrese M, Wagner M (2010) Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1801:299-310
- Truman JP, Gueven N, Lavin M, Leibel S, Kolesnick R, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A (2005) Down-regulation of ATM protein sensitizes human prostate cancer cells to radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:23262-23272
- Uelmen PJ, Oka K, Sullivan M, Chang CC, Chang TY, Chan L (1995) Tissue-specific expression and cholesterol regulation of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in mice. Molecular cloning of mouse ACAT cDNA, chromosomal localization, and regulation of ACAT in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 270:26192-26201
- van Rensburg SJ, Cook-Mozaffari P, Van Schalkwyk DJ, van der Watt JJ, Vincent TJ, Purchase IF (1985) Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. *Br J Cancer* 51:713-726
- Vasudevan A, Ho MS, Weiergraber M, Nischt R, Schneider T, Lie A, Smyth N, Kohling R (2010) Basement membrane protein nidogen-1 shapes hippocampal synaptic plasticity and excitability. *Hippocampus* 20:608-620
- Verheijen MH, Camargo N, Verdier V, Nadra K, de Preux Charles AS, Medard JJ, Luoma A, Crowther M, Inouye H, Shimano H, Chen S, Brouwers JF, Helms JB, Feltri ML, Wrabetz L, Kirschner D, Chrast R, Smit AB (2009) SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21383-21388
- Voelzmann A, Bauer R (2010) Ceramide synthases in mammals, worms, and insects: emerging schemes. *BioMol Concepts* 1:411-422
- Voss KA, Riley RT, Norred WP, Bacon CW, Meredith FI, Howard PC, Plattner RD, Collins TF, Hansen DK, Porter JK (2001) An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 2:259-266
- Walkley SU, Siegel DA, Dobrenis K, Zervas M (1998) GM2 ganglioside as a regulator of pyramidal neuron dendritogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 845:188-199
- Wallace K, Burt D, Wright M (2008) Liver fibrosis. *Biochem J* 411:1-18
- Wang G, Silva J, Dasgupta S, Bieberich E (2008) Long-chain ceramide is elevated in presenilin 1 (PS1M146V) mouse brain and induces apoptosis in PS1 astrocytes. *Glia* 56:449-456

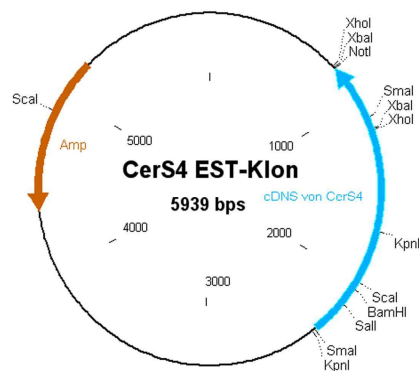
- Watanabe S, Horie Y, Suzuki A (2005) Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 33:161-166
- Waxman SG, Ritchie JM (1993) Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol* 33:121-136
- White-Gilbertson S, Mullen T, Senkal C, Lu P, Ogretmen B, Obeid L, Voelkel-Johnson C (2009) Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* 28:1132-1141
- Whittaker S, Marais R, Zhu AX (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29:4989-5005
- Wilson PD (2002) The genes and proteins associated with poly-cystic kidney diseases. *Minerva Urol Nefrol* 54:201-211
- Winter E, Ponting CP (2002) TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem Sci* 27:381-383
- Wong CM, Ng IO (2008) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 28:160-174
- Wooten-Blanks L, Song P, Senkal C, Ogretmen B (2007) Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase. *FASEB J* 21:3386-3397
- Yamashita T, Allende ML, Kalkofen DN, Werth N, Sandhoff K, Proia RL (2005) Conditional LoxP-flanked glucosylceramide synthase allele controlling glycosphingolipid synthesis. *Genesis* 43:175-180
- Yamashita T, Hashiramoto A, Haluzik M, Mizukami H, Beck S, Norton A, Kono M, Tsuji S, Daniotti JL, Werth N, Sandhoff R, Sandhoff K, Proia RL (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3445-3449
- Yao PM, Tabas I (2001) Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J Biol Chem* 276:42468-42476
- Yin X, Baek RC, Kirschner DA, Peterson A, Fujii Y, Nave KA, Macklin WB, Trapp BD (2006) Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol* 172:469-478
- Yu R, Bieberich E, Xia T (2011) Regulation of Ganglioside Biosynthesis in the Nervous System. *J Lipid Res* 9:50-58
- Yu RK (1994) Development regulation of ganglioside metabolism. *Prog Brain Res* 101:31-44
- Zick Y (2004) Molecular basis of insulin action. *Novartis Found Symp* 262:36-50

Vektorkarten:

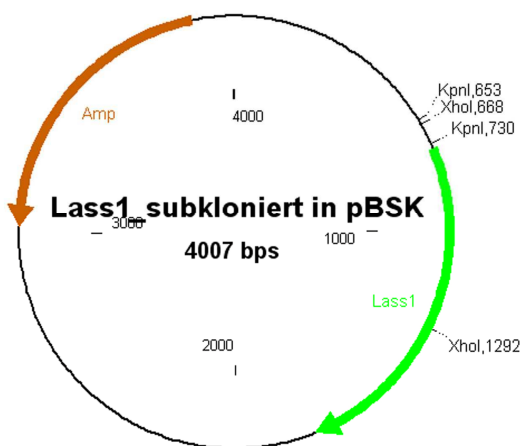




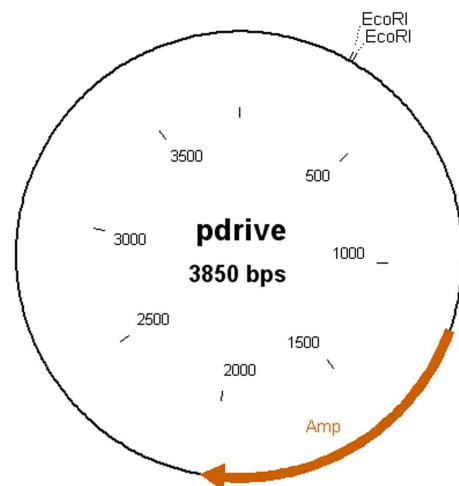
V. 9.3: Enthält die kodierende Sequenz des *CerS2* Gens. Amp = Ampizillin-Resistenzgen, CMV = Encephalomyokarditis Virus.



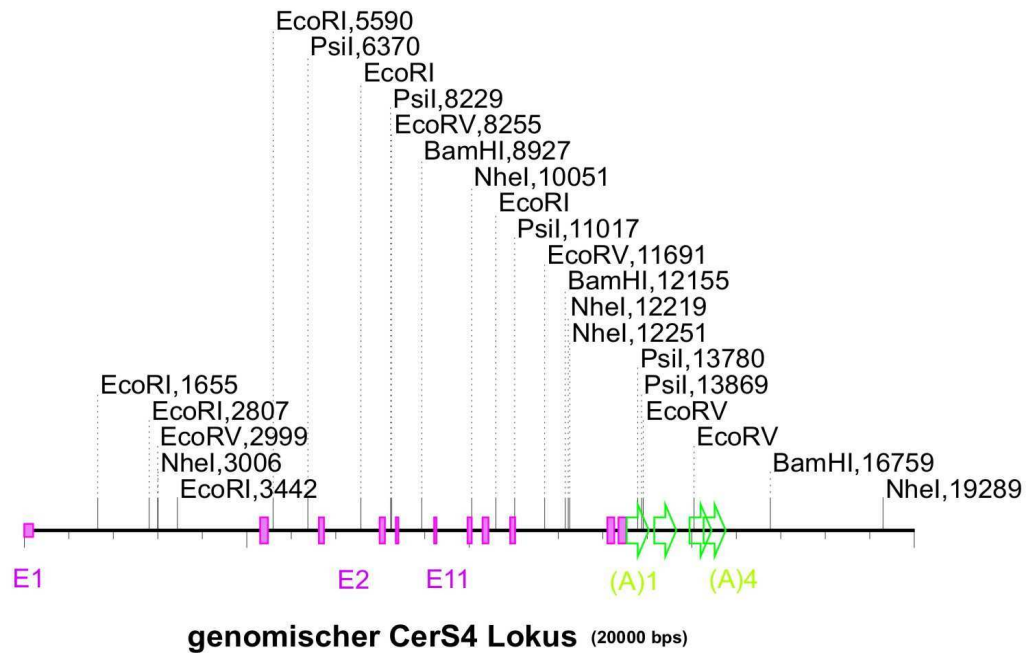
V. 9.4: Enthält die kodierende Sequenz des *CerS4* Gens. Amp = Ampizillin-Resistenzgen



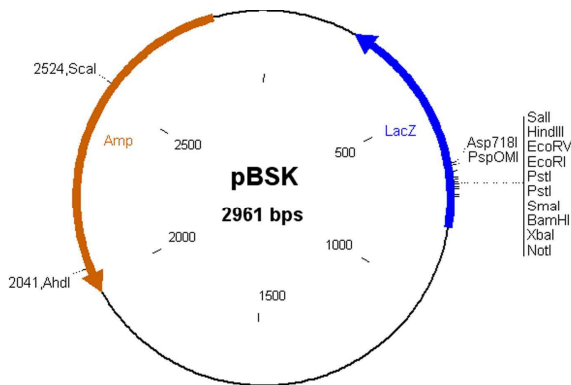
V. 9.5: Lass1-cDNS_subkloniert in pBSK. Amp = Ampizillin-Resistenzgen (von Christina Ginkel).



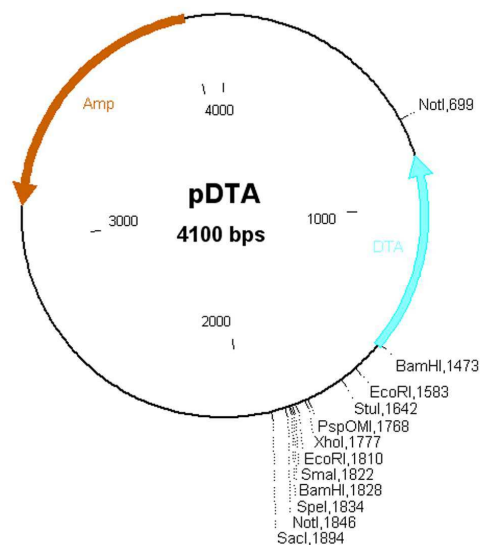
V. 9.6: pdrive (Qiagen). Amp = Ampizillin-Resistenzgen.



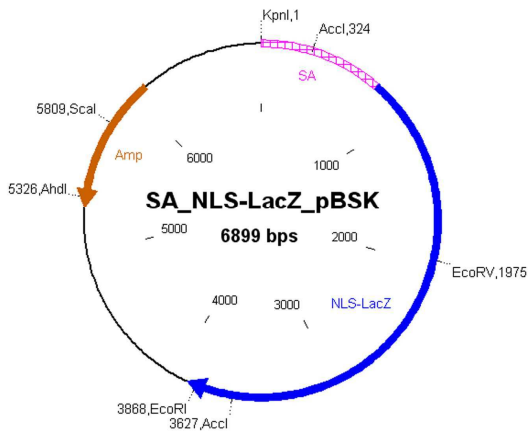
V. 9.6: Genomischer Aufbau des *CerS4* Gens der Maus basierend auf Computer-Sequenz-Informationen (NCBI-Datenbankrecherche). E = Exon, (A) = Polyadenylierungssignal.



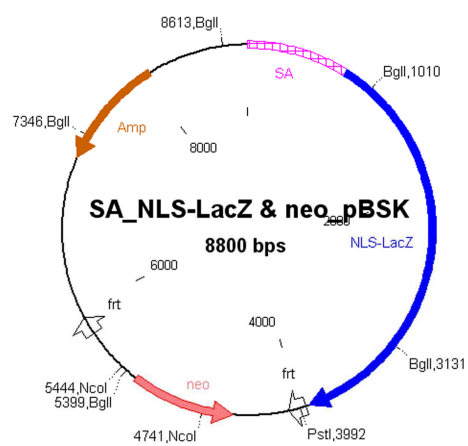
V. 9.7: pBlueskript II SK (+/-). Amp = Ampizillin-Resistenzgen.



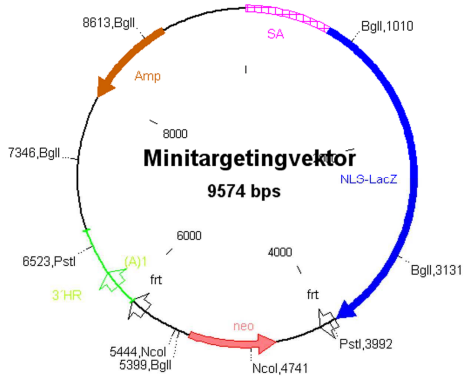
V. 9.8: Enthält eine Sequenz des Diphtherie Toxin A Proteins, die bei einer falschen homologen Rekombination in den ES-Zellen aktiviert wird und somit den Zelltod der ES-Zellen herbeiführt. Amp = Ampizillin-Resistenzgen.



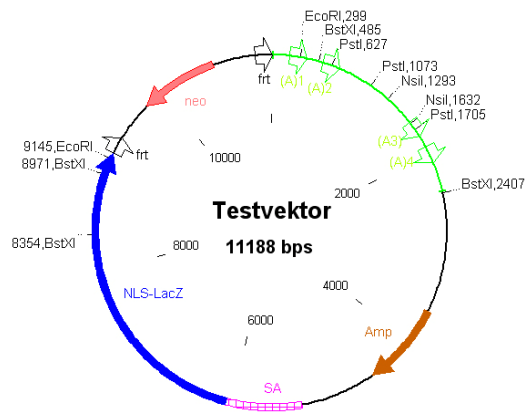
V. 9.13: Zwischenvektor zur Klonierung des Endvektors CerS4KILacZ. Enthält die Spleissakzeptorstelle vor Exon2 des *CerS4* Gens sowie ein 1 kb langes Fragment der β -Galaktosidase Sequenz (Klonierungsschritt 2, Abb. 4.26). Amp = Ampizillin-Resistenzgen, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2.



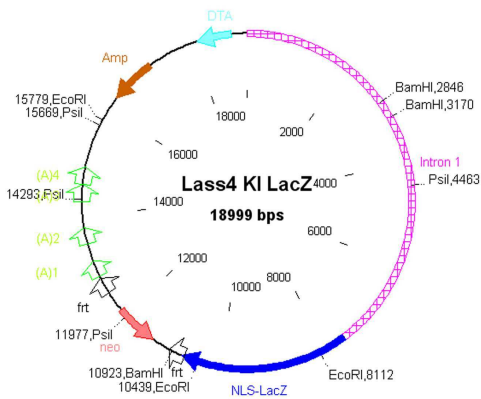
V. 9.14: Zwischenvektor zur Klonierung des Endvektors CerS4KILacZ. Enthält neben der Spleissakzeptorstelle vor Exon2 des *CerS4* Gens sowie eines 1 kb langen Fragments der β -Galaktosidase Sequenz, eine fRT flankierte Neomycinresistenzkassette (Klonierungsschritt 3, Abb. 4.26). Amp = Ampizillin-Resistenzgen, fRT = flp-Rekombinase Erkennungsstelle, (A) = Polyadenylierungssignal, Neo = Neomycinresistenzkassette, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2



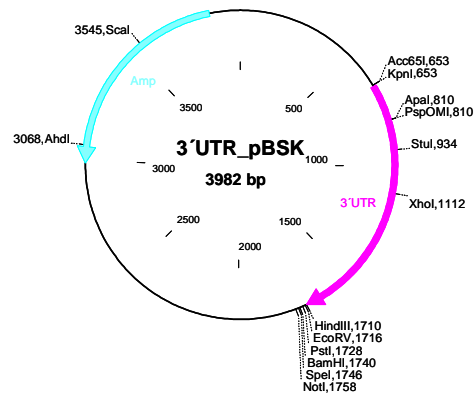
V. 9.15: Zwischenvektor zur Klonierung des Endvektors CerS4KILacZ. Enthält die Spleissakzeptorstelle vor Exon2 des *CerS4* Gens, ein 1 kb langes Fragment der β -Galaktosidase Sequenz, eine fRT flankierte Neomycinresistenzkassette und 0,8 kb grosses Fragment des 3'UTR. (Klonierungsschritt 4; Abb. 4.26) 3'UTR = 3'nachfolgender Schlussbereich, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, fRT = flp- Rekombinase Erkennungsstelle, (A) = Polyadenylierungssignal, Neo = Neomycinresistenzkassette, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2



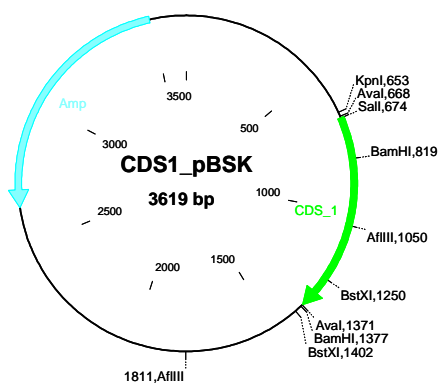
V. 9.16 Testvektor. Enthält die Spleissakzeptorstelle vor Exon2 des *CerS4* Gens, ein 1 kb langes Fragment der β -Galaktosidase Sequenz, eine fRT flankierte Neomycinresistenzkassette und 2,4 kb grosses Fragment des verlängerten 3'UTRs des *CerS4* Gens. 3'UTR = 3'nachfolgender Schlussbereich, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, fRT = flp- Rekombinase Erkennungsstelle, (A) = Polyadenylierungssignal, Neo = Neomycinresistenzkassette, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2



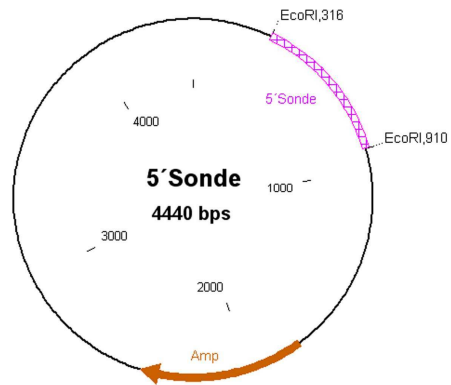
V. 9.17: Endvektor CerS4 KILacZ 5'HR = 5'homologe Region, 3'UTR = 3'nachfolgender Schlussbereich, Amp = Ampizillin-Resistenzgen, frt = flp- Rekombinase Erkennungsstelle, (A) = Polyadenylierungssignal, Neo = Neomycin-resistenzkassette, SA = Spleissakzeptorstelle vor Exon2.



V. 9.18: Enthält Exon9, Exon10, Exon11, Intron10 und Intron11 und die Sequenz bis hinter das erste Polyadenylierungssignal des CerS4 Gens. Diese Sequenz wurde als Sonde für die Charakterisierung der zwei CerS4 BACs eingesetzt. Amp = Ampizillin-Resistenzgen, 3'UTR= 3'untranslatierte Region.



V. 9.19: Enthält ein Teil des Introns1 des CerS4 Gens, das als Sonde für die Charakterisierung der zwei CerS4 BACs eingesetzt wurde. Amp = Ampizillin-Resistenzgen.



V. 9.20: Enthält einen Fragment von Intron 1 des CerS4 Gens, das als 5'Sonde für die Charakterisierung der ES-Zell Klone eingesetzt wurde. Amp = Ampizillin-Resistenzgen.