

# **Der Stoffwechsel der Sphingolipide**

**Einfluss von Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase  
auf den Sphingolipidstoffwechsel humaner Keratinozyten  
und  
Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel  
bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Susanne Brodesser

aus Bonn

Bonn 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2002 bis Juni 2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Konrad Sandhoff am Life and Medical Sciences Center (LIMES), Program Unit Membrane Biology and Lipid Biochemistry, der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Konrad Sandhoff
2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter

Tag der Mündlichen Prüfung: 12. September 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr 2007

Mein Dank gilt all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Konrad Sandhoff danke ich für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter möchte ich mich für die vielen Anregungen und Gespräche, das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für seine Geduld bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jörn Piel und Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr danke ich ganz herzlich für ihre Bereitschaft, zusammen mit Herrn Prof. Dr. Sandhoff und Herrn Priv. Doz. Dr. Kolter die Aufgaben der Promotionskommission zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Georg Auburger, Frau Dr. Carola Seifried und Frau Dr. Isabel Lastres-Becker gilt mein besonderer Dank für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit im SCA2-Projekt und die freundliche Bereitstellung der humanen und murinen Hirngewebeproben.

Bei Frau Petra Gerhards bedanke ich mich für die Anzucht und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten. Herrn Dr. Thomas Meyer und seinem Operationsteam in der Praxisklinik Grevenbroich danke ich für die Bereitstellung humaner Vorhäute.

Frau Andrea Raths, Frau Martina Domgörgen und Frau Bettina Kircharz sei für die Kultivierung der Fibroblasten und Neuronen, das Ansetzen der benötigten Medien und die gelegentliche Unterstützung bei den Lipidanalysen gedankt.

Bei Frau Heike Hupfer bedanke ich mich für die Aufnahme der Massenspektren.

Frau Dr. Bernadette Breiden danke ich ganz herzlich für die Einführung in die Grundlagen der Zellkultur und Lipidanalytik, für die vielen hilfreichen Ideen und Diskussionen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Hichem Gallala danke ich für die Anleitung bei den *real-time* PCR Messungen.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich bei den ständigen, gelegentlichen und ehemaligen Mitgliedern des Mittagstammtisches im Kaffeeraum des zweiten Stocks für die abwechslungsreichen Gespräche bedanken.

## Publikationen

Brodesser, S., Kolter, T. (2007). A chemical approach to study the function of the 4,5-(*E*)-double bond of sphingolipids. *Chem Commun*: eingereicht.

Brodesser, S., Sawatzki, P., Kolter, T. (2003). Bioorganic Chemistry of Ceramide. *Eur J Org Chem*: 2021-34.

Brodesser, S., Mikeska, T., Kolter, T. (2003). 1,1-Dimethyl *N*-propanoylcarbamate. *Acta Cryst E59*: o1359-o1361.

Lastres-Becker, I., Nowock, J., Brodesser, S., Sandhoff, K., Schuermann, A., Luetjohann, D., Hintermann, E., Auburger, G. (2007). Lipid alterations in Ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet*: in Vorbereitung.

Schneede, A., Schmidt, C. K., Willenborg, M., Breiden, B., Brodesser, S., Sandhoff, K., Saftig, P., Eskelinen, E.-L. Luminal domain of LAMP-2 is needed for export of cholesterol from late endosomes and lysosomes: in Vorbereitung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Ceramid: Struktur und Biosynthese	3
2.2 Ceramid: Funktion in der Signaltransduktion	4
2.3 Die Dihydroceramid-Desaturase	6
2.3.1 Cofaktoren der Dihydroceramid-Desaturase	6
2.3.2 Mechanistische Alternativen der Desaturase-Reaktion	7
2.4 Die Ceramide der humanen Epidermis	9
2.4.1 Der Aufbau der humanen Epidermis	9
2.4.2 Die epidermale Permeabilitätsbarriere	11
2.5 Inhibitoren der Dihydroceramid-Desaturase	15
2.6 Konzeption von Suizidinhibitoren der Dihydroceramid-Desaturase	16
2.7 Glykosphingolipide: Funktion, Biosynthese und Abbau	20
2.8 Spinocerebelläre Ataxie Typ 2	23
2.9 Zielsetzung	25
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1 Einfluss von Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf den Sphingolipidstoffwechsel kultivierter Zellen	27
3.1.1 Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC auf den Sphingolipidstoffwechsel in humanen Fibroblasten und murinen Kleinhirnneuronen	28
3.1.2 Metabolische Markierungsstudien in humanen Keratinozyten unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC	33
3.1.2.1 Metabolische Markierung mit L-[3- <sup>14</sup> C]-Serin	33
3.1.2.2 Metabolische Markierung mit N-[1- <sup>14</sup> C]-Octanoylsphingamin und N-[1- <sup>14</sup> C]-Octanoylsphingosin	40
3.1.2.2.1 Temperaturblock der Endozytose	44
3.1.2.2.2 Hemmung der Ceramid-Synthase durch Fumonisin B1	50
3.1.3 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression von Genen ausgewählter Proteine in humanen Keratinozyten	55
3.1.3.1 Grundlagen der RNA Quantifizierung mittels <i>real-time</i> PCR	55
3.1.3.2 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression an der Differenzierung beteiligter Proteine in humanen Keratinozyten	57
3.1.3.3 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression am Ceramidstoffwechsel beteiligter Enzyme in humanen Keratinozyten	60
3.1.4 Massenspektrometrische Analyse von Metaboliten der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC	63
3.1.4.1 Analyse von Cp-DHC und Db-DHC mittels ESI-MS/MS	64
3.1.4.2 Massenspektrometrische Analyse von Metaboliten von Cp-DHC und Db-DHC im Gesamtlipidextrakt humaner Keratinozyten	69

3.2	Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 (SCA2)	75
3.2.1	Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen einer SCA2-Patientin	75
3.2.2	Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen von SCA2- <i>knock out</i> -Mäusen	84
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	Einfluss von Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf den Sphingolipidstoffwechsel kultivierter Zellen	88
4.1.1	Metabolische Markierungsstudien in kultivierten Zellen unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC	88
4.1.2	Massenspektrometrische Analyse von Metaboliten der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC	93
4.1.3	Einfluss von Cp-DHC auf die Expression von Genen ausgewählter Proteine in humanen Keratinozyten	95
4.2	Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 (SCA2)	98
4.2.1	Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen einer SCA2-Patientin	98
4.2.2	Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen von SCA2- <i>knock out</i> -Mäusen	99
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>101</b>
5.1	Material	101
5.1.1	Zellen, Gewebe und Tiere	101
5.1.1.1	Humane Keratinozyten	101
5.1.1.2	Humane Fibroblasten	101
5.1.1.3	Primäre Neuronen aus Kleinhirnen von Mäusen	101
5.1.1.4	Humanes SCA2-Hirngewebe und gesundes Kontrollhirngewebe	101
5.1.1.5	Hirngewebe von SCA2- <i>knock out</i> -Mäusen	102
5.1.2	Geräte	102
5.1.3	Verbrauchsmaterialien	103
5.1.4	Chemikalien und Reagenzien	104
5.1.4.1	Chemikalien und Reagenzien für Zellkulturstudien	104
5.1.4.2	Chemikalien und Reagenzien für Lipidaufarbeitung und –analytik	107
5.1.4.3	Chemikalien und Reagenzien für <i>Real-time</i> quantitative PCR	108
5.2	Methoden	110
5.2.1	Synthese radioaktiver Substanzen	110
5.2.1.1	Synthese von <i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D- <i>erythro</i> -C <sub>18</sub> -sphingarin	110
5.2.1.2	Synthese von <i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D- <i>erythro</i> -C <sub>18</sub> -sphingosin	110
5.2.2	Zellkultur	111
5.2.2.1	Kultur humaner Keratinozyten	111
5.2.2.2	Kultur humaner Fibroblasten	113
5.2.2.3	Kultur primärer Keinhirnneuronen von Mäusen	114
5.2.3	Homogenisierung und Lipidextraktion	114
5.2.3.1	Homogenisierung und Extraktion von Zellen	114
5.2.3.2	Homogenisierung und Extraktion von Gewebe	115

5.2.4	Lipidaufarbeitung	116
5.2.4.1	Alkalische Hydrolyse	116
5.2.4.2	Entsalzung der Lipidextrakte	116
5.2.4.3	Trennung von anionischen und neutralen Lipiden über DEAE-Anionenaustauschchromatographie	117
5.2.5	Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Lipiden mittels Dünnschichtchromatographie (DC)	118
5.2.5.1	Probenauftrag und Entwicklung der DC-Platten	118
5.2.5.2	Visualisierung und Quantifizierung der Lipidbanden	120
5.2.6	RNA Quantifizierung mittels <i>Real-time</i> PCR	121
5.2.6.1	Zellkultur	121
5.2.6.2	Zellernte und Extraktion von RNA aus kultivierten Keratinozyten	122
5.2.6.3	Bestimmung der Reinheit und Menge der isolierten Gesamt-RNA	122
5.2.6.4	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	123
5.2.6.5	<i>Real-time</i> quantitative PCR	124
5.2.6.6	Auswertung der <i>Real-time</i> quantitativen PCR	125
5.2.7	Massenspektrometrie	126
5.2.7.1	Glaskapillaren/Spitzen	126
5.2.7.2	Electrospray Ionization-Time of Flight-Massenspektrometrie (ESI-ToF-MS)	126
<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b>	<b>128</b>
6.1	Abkürzungen	128
6.2	Literatur	131

# 1 Zusammenfassung

Die Dihydroceramid-4-Desaturase ist ein membrangebundenes Enzym höherer Eukaryonten, das auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Sie katalysiert mit der Einführung der 4,5-(*E*)-Doppelbindung in das Sphingoid-Rückgrat den letzten Schritt der Ceramid-Biosynthese. Neben Enzymen aus verschiedenen Organismen, die ausschließlich eine Dihydroceramid-4-Desaturase-Aktivität aufwiesen, wurden auch bifunktionelle Proteine beschrieben, die Aktivität als Dihydroceramid-4-Desaturase und als Dihydroceramid-4-Hydroxylase zeigten. Bei Hydroxylierung von Dihydroceramid in Position 4 der Sphingoidbase entsteht Phytoceramid, ein wichtiges Ceramid der menschlichen Epidermis.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher der Einfluss zweier Substratanaloga der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. der 4-Hydroxylase auf den Sphingolipidstoffwechsel humaner Keratinozyten untersucht. Bei den beiden Verbindungen handelte es sich um modifizierte Dihydroceramide mit einem Cyclopropyl-Rest (Cp-DHC) bzw. einer Dreifachbindung (Db-DHC) zwischen den Positionen 5 und 6 der Sphingoidbase (Abb. 2.9). Nach enzymatischer Bildung eines Radikals in Position 4 und Umlagerung der reaktiven Zwischenstufe ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Cp-DHC bzw. Db-DHC und der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. der 4-Hydroxylase und damit eine Hemmung der Enzyme denkbar (Abb. 2.10).

Zunächst wurden metabolische Markierungsstudien mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin, dem radioaktiv markierten Ausgangsmolekül der Ceramid-Biosynthese, und radiomarkierten zellgängigen Analoga von Dihydroceramid und Ceramid unter Zusatz verschiedener Konzentrationen Cp-DHC und Db-DHC an differenzierten Keratinozyten durchgeführt. Dabei konnte eine von der Konzentration der beiden Verbindungen abhängige Zunahme des Dihydroceramid- und eine Abnahme des Ceramidanteils nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht für eine Inhibierung der Dihydroceramid-4-Desaturase. Diese zeigte sich auch in humanen Fibroblasten und Kleinhirnneuronen von Mäusen. Bei der [3-<sup>14</sup>C]-Serin-Markierung differenzierter Keratinozyten zeigte sich in Gegenwart von Cp-DHC bzw. Db-DHC zudem eine Erhöhung der Menge biosynthetisierten Phytoceramids. Außerdem ergaben sich Hinweise auf eine zusätzliche Hemmung der Sphingomyelin- und der Glucosylceramid-Synthase durch die beiden Dihydroceramid-Analoga, die nach Aufnahme in die Zelle dem gleichen Metabolismus wie endogene Ceramide unterliegen sollten. So wurden als Stoffwechselprodukte von Cp-DHC und Db-DHC Sphingomyelin-Analoga und mit verschiedenen endogenen Fettsäure acylierte *N*-Acyl-Metabolite massenspektrometrisch identifiziert.

Im Gegensatz zu Ceramid ruft Dihydroceramid in vielen Fällen keine antimitogenen Effekte wie z. B. Zelldifferenzierung hervor. Daher wurde untersucht, welche Konsequenzen die durch Cp-DHC hervorgerufene Abnahme des Ceramid- zugunsten des Dihydroceramidanteils auf den Übergang von Proliferation zu Differenzierung in humanen Keratinozyten hat. Dazu wurde die Expression von Genen einiger Proteine, die am Ceramidstoffwechsel und an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt sind, mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Dabei zeigte sich, dass während der durch 1.1 mM Ca<sup>2+</sup> und 10 µM Linolsäure induzierten Differenzierung der Keratinozyten in Gegenwart von Cp-DHC die Expressionsraten von Differenzierungsmarkerproteinen herunter- und die eines Proliferationsmarkers hochreguliert wurde. Außerdem führte der Zusatz von Cp-DHC zu einer Hochregulierung der Expressionsrate aller untersuchten Ceramid-metabolisierenden Enzyme (Serin-Palmitoyltransferase, saure

Sphingomyelinase, Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase, Glucosylceramid-Synthase, saure Ceramidase), wodurch der Zellstoffwechsel in Richtung einer vermehrten Bildung von Sphingosin dirigiert wurde, das nach Phosphorylierung mitogene Effekte wie Proliferation vermittelt (Abb. 3.18). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cp-DHC zu einer Störung der Differenzierung führt, die zur Folge hat, dass die Keratinozyten in einem proliferierenden Zustand verbleiben.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Auburger, Universität Frankfurt/Main, Untersuchungen zur Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 (SCA2) durchgeführt. SCA2 gehört zur Gruppe der Polyglutaminerkrankungen, die neurodegenerativ verlaufen. Das bei SCA2 betroffene Protein Ataxin-2 wird ubiquitär, weit über neuronale Gewebe hinaus, exprimiert. Seine Funktion ist, ebenso wie der zur Erkrankung führende Pathomechanismus, unbekannt. Da sich in jüngerer Zeit die Hinweise mehren, dass Polyglutaminerkrankungen mit Störungen des Lipidstoffwechsels verbunden sind, wurde die Lipidzusammensetzung in Hirngewebe einer SCA2-Patientin analysiert. Dazu wurden Proben aus dem Cortex, der bei SCA2 weitgehend erhalten bleibt, und aus dem Kleinhirn, das von der Krankheit hauptsächlich betroffen ist, untersucht.

Im Kleinhirn der SCA2-Patientin zeigte sich ein starker Mangel an Lipiden, die typischerweise im Myelin vorkommen. Ebenfalls reduziert waren die Mengen von Lipiden, die sowohl in der Myelinhaltigen weißen als auch in der grauen Hirnsubstanz enthalten sind. Nur unwesentlich verändert war dagegen der Gehalt an Gangliosiden, die nur in geringen Konzentrationen im Myelin, sondern hauptsächlich in der neuronalen Plasmamembran und damit in der grauen Hirnsubstanz zu finden sind. Die Ergebnisse sind Zeichen einer Demyelinisierung, die bisher als sekundärer Effekt der allgemeinen Neurodegeneration bei SCA2-Patienten angesehen wurde. Die Analyse der Lipidzusammensetzung im Cortex der SCA2-Patientin lieferte den Beobachtungen im Kleinhirn entgegengesetzte Resultate. Die Mengen Myelin-spezifischer Lipide waren stark erhöht, der Gangliosidgehalt dagegen erniedrigt.

Während SCA2-Patienten u. a. an einer starken Reduktion des Unterhautfettgewebes leiden, zeigen drei Monate alte SCA2-*knock out*-Mäuse typische Symptome einer Insulinresistenz und eines Metabolischen Syndroms, wie Adipositas und erhöhte Insulinspiegel im Blut. Diese weisen darauf hin, dass Ataxin-2 eine regulierende Funktion in den durch Insulin vermittelten Signalwegen haben könnte. Zur Klärung der Frage, ob die für SCA2 verantwortliche Expansion des Polyglutaminstrangs in Ataxin-2 zu einem Funktionsverlust des Proteins führt, wurden die Lipidzusammensetzung in Cortex und Kleinhirn der *knock out*-Mäusen analysiert.

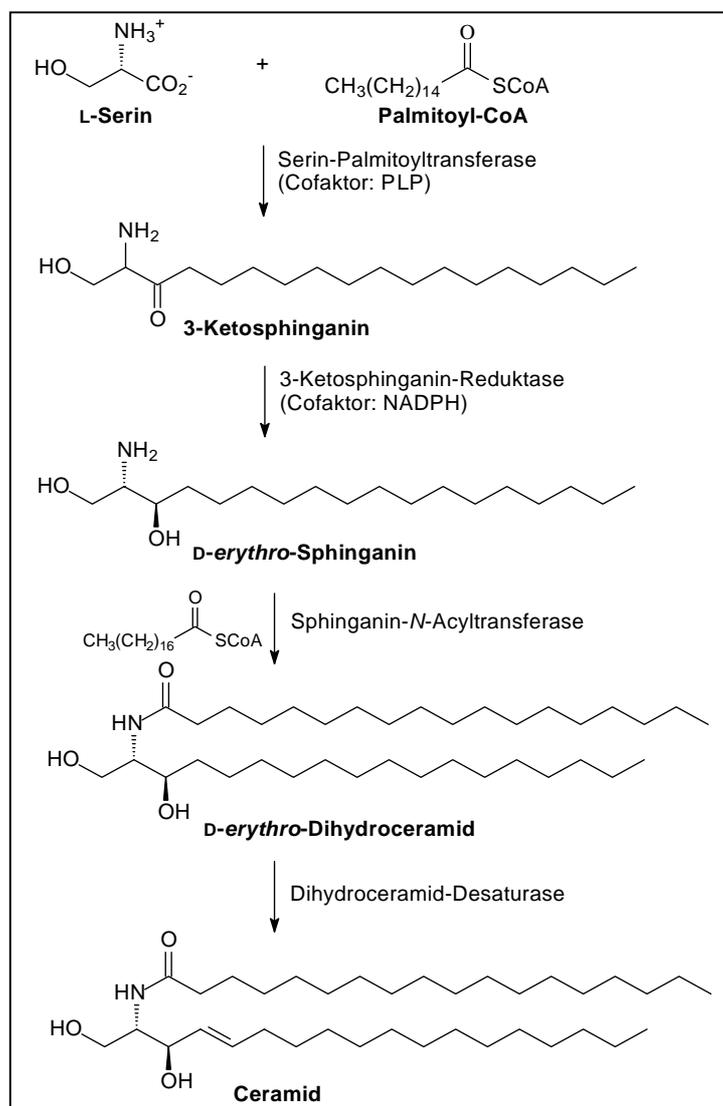
Dabei zeigte sich, dass sich die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung im Hirngewebe der Mäuse grundlegend von denjenigen im Gehirn der SCA2-Patientin unterscheiden. Im Cortex der Ataxin-2-defizienten Mäuse konnten keine wesentlichen Unterschiede zu Wildtypgewebe festgestellt werden. Das Kleinhirn der *knock out*-Mäuse zeigte keinen Mangel Myelin-typischer Lipide, sondern im wesentlichen einen deutlich erhöhten Gangliosidgehalt. Der Verlust von Ataxin-2 in Mäusen führt also nicht zu den gleichen Lipidveränderungen im Gehirn wie die Existenz von variantem Ataxin-2 mit expandierter Polyglutaminkette in SCA2-Patienten. Da jedoch erhöhte Konzentrationen von Ceramid oder höheren Sphingolipiden in verschiedenen Geweben häufig mit der Vermittlung von Insulinresistenz in Zusammenhang stehen, bekräftigen die im Kleinhirn der SCA2-*knock out*-Mäuse gefunden erhöhten Gangliosidmengen das Bild von Ataxin-2 als einen Regulator der durch Insulin vermittelten Signalwege.

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Ceramid: Struktur und Biosynthese

Ceramid (Abb. 2.1) besteht aus einem langkettigen Aminoalkohol, *D-erythro*-Sphingosin, und einer Fettsäure, mit der die Aminogruppe acyliert ist. Ceramid ist die gemeinsame Vorstufe der Glykosphingolipide und des Sphingomyelins und dient als Anker dieser Lipide in der äußeren Hälfte der Plasmamembran eukaryontischer Zellen. Die Biosynthese von Ceramid (Abb. 2.1) wird von membrangebundenen Enzymen auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums katalysiert (Michel und van Echten-Deckert, 1997; Michel *et al.*, 1997).



**Abb. 2.1** Ceramid-Biosynthese  
(CoA = Coenzym A, PLP = Pyridoxalphosphat, NADPH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form))

Sie beginnt mit der Kondensation der Aminosäure L-Serin mit durch Coenzym A (CoA) aktivierter Palmitinsäure zu 3-Ketosphingalin. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Ceramid-Biosynthese wird von der Pyridoxalphosphat-abhängigen Serin-Palmitoyltransferase (SPT) katalysiert (Braun und Snell, 1968). Die Aktivität der SPT ist präzise reguliert, wobei die höchste bisher in Säugerzellen gemessene SPT-Aktivität in humanen kultivierten Keratinozyten nachgewiesen wurde (Holleran *et al.*, 1990). In der nachfolgenden NADPH-abhängigen Reaktion wird 3-Ketosphingalin durch die 3-Ketosphingalin-Reduktase zu D-erythro-Sphingalin reduziert (Stoffel *et al.*, 1968). Eine durch eines der *longevity assurance- (Lass-)* Gene codierte Sphingalin-N-Acyltransferase (Pewzner-Jung *et al.*, 2006) acyliert Sphingalin anschließend mit einer durch CoA aktivierten Fettsäure zu D-erythro-Dihydroceramid. Ceramid entsteht schließlich durch Dehydrierung von Dihydroceramid durch die Dihydroceramid-Desaturase (Rother *et al.*, 1992).

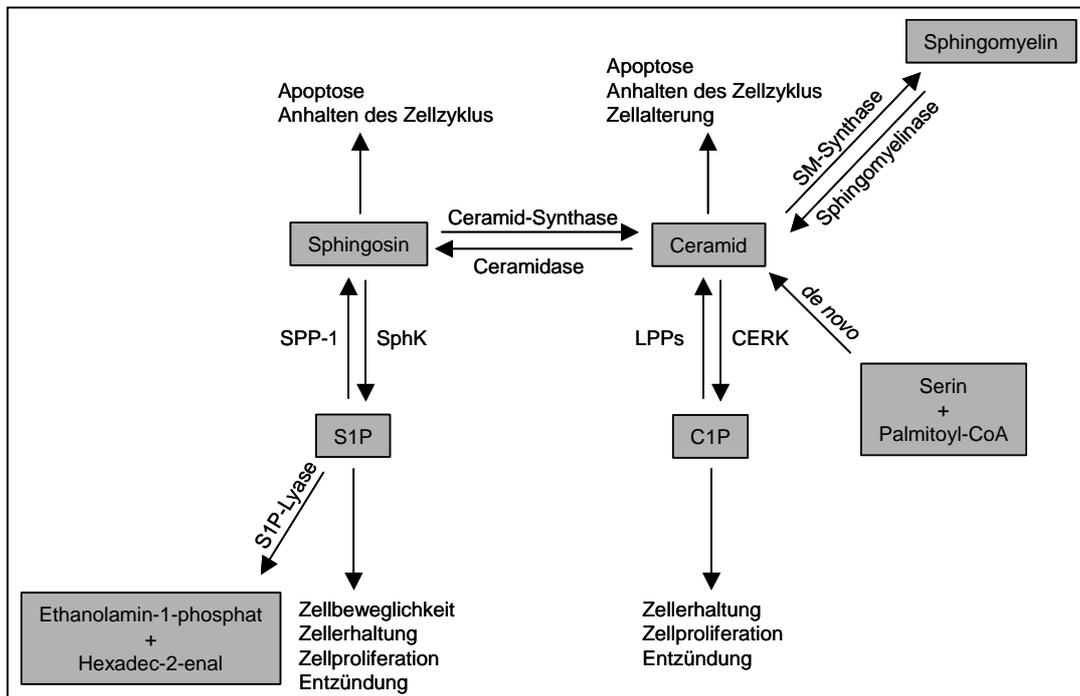
## 2.2 Ceramid: Funktion in der Signaltransduktion

Ceramid wurde als Signalmolekül identifiziert, das in Reaktion auf verschiedene extrazelluläre (wie z. B. den *Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , TNF $\alpha$* ) oder intrazelluläre Stimuli gebildet wird (Hannun und Obeid, 2002). Dies geschieht entweder über *de novo* Synthese (Perry, 2000) oder über die Spaltung von in der Plasmamembran lokalisiertem Sphingomyelin unter Wirkung von Sphingomyelinasen mit neutralem oder saurem pH-Optimum (Levade und Jaffrezou, 1999). Das so freigesetzte Ceramid löst in den meisten Zelltypen antimitogene Effekte wie Anhalten des Zellzyklus, Zelldifferenzierung oder Apoptose (programmierter Zelltod) aus (Abb. 2.2). Diese Effekte können durch die exogene Gabe kurzkettiger und damit membrangängiger Ceramid-Derivate wie z. B. N-Acetylsphingosin imitiert werden, nicht jedoch mit der entsprechenden gesättigten Verbindung, C<sub>2</sub>-Dihydroceramid. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass endogenes Ceramid die Funktion eines *second messengers* habe, der an spezifische intrazelluläre Zielproteine bindet (Bielawska *et al.*, 1993). Diese Vorstellung wird jedoch zunehmend kontrovers diskutiert (Huwiler *et al.*, 2000; Venkataraman und Futerman, 2000; van Blitterswijk *et al.*, 2003). Zum einen unterscheiden sich die exogen verabreichten kurzkettigen Ceramide aufgrund ihrer amphiphilen Struktur und der damit verbundenen höheren Beweglichkeit innerhalb der Zelle erheblich von natürlichem Ceramid (Tepper *et al.*, 2000), zum anderen kann die exogene Gabe kurzkettiger Ceramide die Bildung endogener langkettiger Ceramide stimulieren (Ogretmen *et al.*, 2002), so dass sich die Interpretation der gewonnenen Daten als schwierig erweist. Hinzu kommt, dass bisher kein Rezeptorprotein, das einzelne Ceramidmoleküle erkennen kann, zweifelsfrei identifiziert wurde.

Es gibt jedoch andere Modelle, die ohne die Beteiligung von Ceramid-Bindungsproteinen auskommen (Siskind und Colombini, 2000). So ist es möglich, dass die beobachteten Effekte durch Ceramid-reiche Domänen innerhalb der Plasmamembran und nicht von einzelnen Lipidmolekülen vermittelt werden (Holopainen *et al.*, 1998). In diesem Fall würde die Hydrolyse von membrangebundenem Sphingomyelin und die damit verbundene Bildung von Ceramid zu einer Änderung der Membraneigenschaften führen und auf diese Weise einen oder mehrere Signalprozesse induzieren. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Bildung von natürlichem Ceramid auf der Oberfläche von T- und B-Zellen die Zusammenlagerung und Aktivierung der

---

TNF-Rezeptoren *CD95* und *Fas* erleichtert (Cremesti *et al.*, 2001; Grassme *et al.*, 2001). Die darauffolgende Aktivierung von *Caspase-8* und der *Fas-associated death domain (FADD)* führt schließlich zur Apoptose (Hueber *et al.*, 2002).



**Abb. 2.2** Funktion von Ceramid und seiner Stoffwechselprodukte in der Signaltransduktion, modifiziert nach Chalfant und Spiegel, 2005  
(S1P = Sphingosin-1-phosphat, C1P = Ceramid-1-phosphat, SPP-1 = Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase-1, SphK = Sphingosin-Kinase, LPP = Lipid-Phosphat-Phosphatase, CERK = Ceramid-Kinase, SM = Sphingomyelin)

Da Ceramid jedoch metabolisch an andere Signalmoleküle wie Sphingosin und Sphingosin-1-phosphat gekoppelt ist (Abb. 2.2), lassen sich aus Zellkulturstudien in der Regel keine klaren Rückschlüsse auf die molekularen Details der durch Ceramid vermittelten Signalwege ziehen (Huwiler *et al.*, 2000). So ist z. B. eine Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin möglich, welches wiederum in 1-Position zu Sphingosin-1-phosphat (S1P) phosphoryliert werden kann. Im Gegensatz zu Ceramid vermittelt S1P in den meisten Zelltypen mitogene Effekte. Zwar wurde mit der *sphingosine-1-phosphate receptor-(S1PR)*-Familie, einer Untergruppe der *endothelial differentiation gene-(EDG)*-Rezeptoren, extrazelluläre Bindungsproteine für S1P identifiziert, jedoch ist unklar, wie zytosolisch gebildetes S1P in den Extrazellulärraum gelangt und wie seine intrazellulären Effekte vermittelt werden. Das Verhältnis der Konzentrationen von Ceramid und S1P scheint jedoch entscheidend dafür zu sein, ob der Zellzyklus in Richtung Differenzierung oder Proliferation dirigiert wird (Spiegel und Milstien, 2002). Zusätzlich kann Ceramid zu Ceramid-1-phosphat phosphoryliert und so von einem Differenzierungssignal zu einem Mitogen werden (Abb. 2.2), welches Zellteilung und DNA-Synthese stimuliert (Gomez-Munoz *et al.*, 1997).

## 2.3 Die Dihydroceramid-Desaturase

Die Dihydroceramid-Desaturase ist wie die anderen drei Enzyme der Ceramid-Biosynthese ein membrangebundenes Protein des Endoplasmatischen Retikulums mit zytosolischer Orientierung des aktiven Zentrums. Sie katalysiert mit der Einführung der 4,5-(*E*)-Doppelbindung den letzten Schritt der Ceramid-Biosynthese (Abb. 2.1). *De novo*-synthetisiertes Ceramid kann die gleichen antimitogenen Effekte hervorrufen wie das aus dem Sphingomyelin-Pool stammende Ceramid (Perry, 2000). Da Dihydroceramid im Gegensatz zu Ceramid keine antimitogenen Effekte bewirkt, könnte der Spiegel von biologisch aktivem Ceramid nicht nur über den Sphingomyelin-Metabolismus, sondern zusätzlich auch über eine Modulation der Dihydroceramid-Desaturase-Aktivität reguliert sein (Geeraert *et al.*, 1997). Der Desaturase käme demnach eine wichtige Rolle in der durch Ceramid vermittelten Signaltransduktion zu (Bielawska *et al.*, 1993). Da die Primärstruktur der humanen Dihydroceramid-Desaturase jedoch nicht eindeutig bekannt ist, konnte die genaue Funktion der Doppelbindung innerhalb der Sphingolipide bisher nicht geklärt werden. Obwohl über die Generierung von Dihydroceramid-Desaturase-*knock out*-Mäusen berichtet wurde<sup>[1]</sup>, sind bezüglich ihres Geno- bzw. Phänotyps keine Informationen erhältlich.

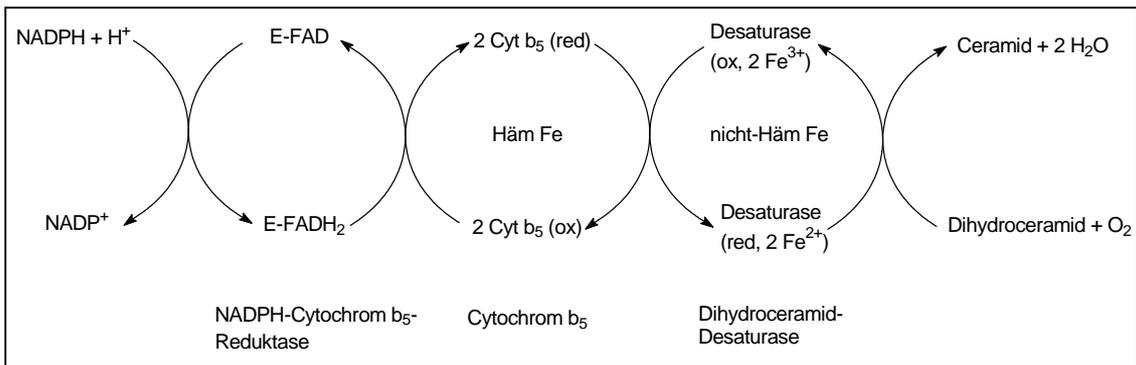
### 2.3.1 Cofaktoren der Dihydroceramid-Desaturase

Die Dihydroceramid-Desaturase ist strukturell und mechanistisch weit weniger gut charakterisiert als z.B. die  $\Delta^9$ -Stearoyl-CoA-Desaturase, die Stearoyl-CoA durch Einführung der 9,10-(*Z*)-Doppelbindung in Oleoyl-CoA umwandelt (Wallar und Lipscomb, 1996). Die  $\Delta^9$ -Desaturase ist Teil eines Dieisenprotein-Komplexes, der aus NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, Cytochrom  $b_5$  und der  $\Delta^9$ -Desaturase besteht. Dieses System überträgt in einer Serie gekoppelter Reaktionen Elektronen der C-H-Einfachbindung sowie die des Cosubstrats NADH auf molekularen Sauerstoff. In Analogie dazu kann der Cofaktorbedarf für die Dihydroceramid-Desaturase postuliert werden (Abb. 2.3). Durch Messungen der Enzymaktivität in permeabilisierten Rattenhepatozyten unter Zusatz verschiedener Cofaktoren konnte nachgewiesen werden, dass die Dihydroceramid-Desaturase im Gegensatz zur Fettsäure-Desaturase jedoch NADPH als Cofaktor bevorzugt (Geeraert *et al.* 1997).

---

<sup>[1]</sup> Narra, K., Holland, W., Wang, L.-P., Sargent, K., Liu, Y., Fontenot, G., Summers, S. (2007). An Update on the Dihydroceramide Desaturase Knockout Mice. *Abstracts of: "4<sup>th</sup> International Charleston Ceramide Conference"*: Pacific Grove, CA, USA.

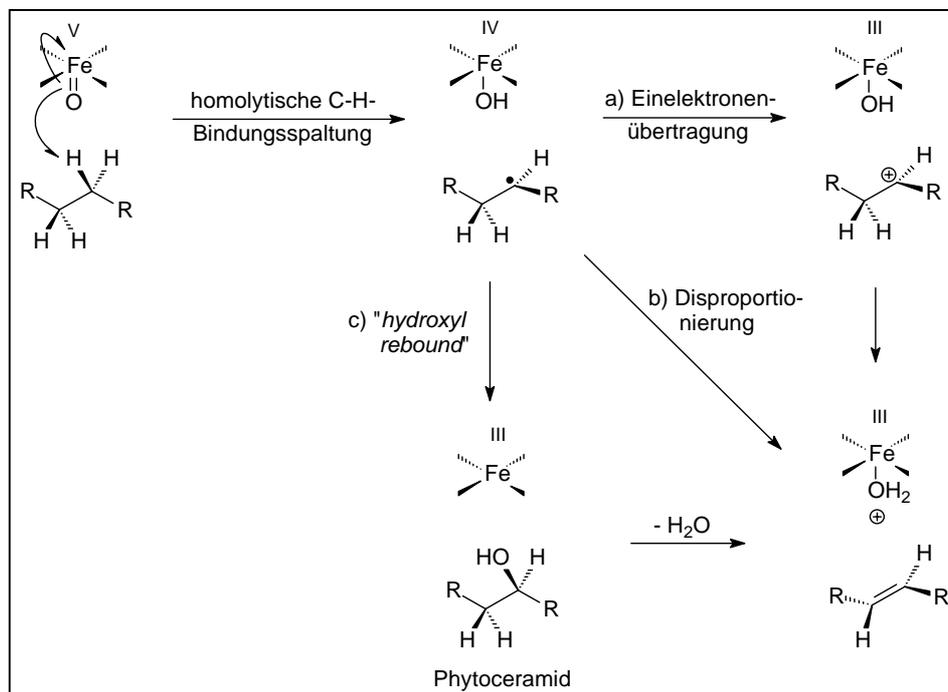
---



**Abb. 2.3** Cofaktorbedarf der Dihydroceramid-Desaturase (postuliert in Analogie zur  $\Delta^9$ -Stearoyl-CoA-Desaturase), modifiziert nach Geeraert *et al.*, 1997 (NADPH = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form), E = Enzym, FADH<sub>2</sub> = Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form), Cyt b<sub>5</sub> = Cytochrom b<sub>5</sub>)

### 2.3.2 Mechanistische Alternativen der Desaturase-Reaktion

Auch der Mechanismus, nach dem  $\Delta^9$ -Desaturasen und die Dihydroceramid-Desaturase arbeiten, sollte ähnlich sein (Abb. 2.4) (Buist und Behrouzian, 1996).



**Abb. 2.4** Mögliche Mechanismen der Desaturase-Reaktion, modifiziert nach Buist und Behrouzian, 1996

Dabei erfolgt im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die homolytische Spaltung der C-H-Bindung in Position 4 des Sphingarin-Gerüsts unter Beteiligung eines durch nicht-Häm gebundene Eisenatome aktivierten Sauerstoffs (Savile *et al.*, 2001). Das entstandene Radikal ist

wahrscheinlich kein wirkliches Intermediat, sondern aufgrund seiner sehr kurzen Lebensdauer von ca. 70 Femtosekunden vielmehr Teil eines Übergangszustandes (Newcomb *et al.*, 1995). Für eine Weiterreaktion gibt es nun mehrere Alternativen. Zum einen könnte das primär gebildete Kohlenstoff-Radikal über eine Einelektronen-Oxidation in ein Carbeniumion übergehen, welches nach Abstraktion eines vicinalen Protons die Doppelbindung ergibt (Weg a). Zum anderen wäre eine direkte Disproportionierung des Systems aus Kohlenstoff-Radikal und dem am Eisenatom gebundenen Hydroxylradikal zu Alken und hydratisierter Eisen-Spezies denkbar (Weg b). Eine dritte Möglichkeit besteht in der Rekombination des Kohlenstoff-Radikals mit dem Hydroxylradikal („*hydroxyl rebound*“). Die Doppelbindung entstünde anschließend unter Eliminierung von Wasser (Weg c). Mit Hilfe fluorierter Fettsäuren konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die  $\Delta^9$ -Desaturase aus *Saccharomyces cerevisiae* nicht über den *hydroxyl rebound*-Mechanismus (Weg c) arbeitet (Buist *et al.*, 1996).

Eine enzymatische Reaktion über den *hydroxyl rebound*-Mechanismus wird jedoch für Biohydroxylierungen angenommen, da es Hinweise gibt, dass Hydroxylasen und Desaturasen auf Proteinebene verwandt sind (Shanklin *et al.*, 1994; van de Loo *et al.*, 1995). So wurde neben dem Genprodukt des *degenerative spermatocyte gene 1 (des1)* aus *Drosophila melanogaster* (Endo *et al.*, 1996; Endo *et al.*, 1997) und dessen Maushomologes (*Des1*) (Ternes *et al.*, 2002), die eine Sphingolipid-4-Desaturase-Aktivität aufwies, auch homologe Enzyme (*Des2*) aus Maus (Ternes *et al.*, 2002; Omae *et al.*, 2004) und *Candida albicans* (Beckmann *et al.*, 2003) beschrieben, die sowohl Aktivität als Sphingolipid-4-Desaturase als auch 4-Hydroxylase zeigten.

Die Sphingolipid-8-Desaturase Höherer Pflanzen liefert durch *syn*-Eliminierung zweier vicinaler Wasserstoffatome in den Positionen 8 und 9 der Sphingoidbase ein Gemisch aus (*E*)- und (*Z*)-Olefinen. Zur Untersuchung ihres Mechanismus wurde die aus der Sonnenblume klonierte Desaturase in Hefen exprimiert. Während die zelleigene Fettsäurebiosynthese durch Cerulenin inhibiert wurde, wurden die transgenen Hefezellen mit stereospezifisch dideutierten Palmitinsäure-Derivaten kultiviert, die dabei biosynthetisch in Ceramide der Hefe inkorporiert wurden. Die kinetischen Isotopeneffekte der Abspaltung der Wasserstoffatome an C-8 und C-9 deuten darauf hin, dass die einleitende C-H-Bindungsspaltung, die zum (*E*)-Isomer führt, an C-8 stattfindet, während das (*Z*)-Isomer durch Abspaltung des ersten Wasserstoffatoms an C-9 gebildet wird. Offensichtlich ist die Sphingolipid-8-Desaturase in der Lage, zwei unterschiedliche Substratkonformationen, nämlich *anti* und *gauche*, unabhängig voneinander in (*E*)- oder (*Z*)-Alkene zu überführen (Beckmann *et al.*, 2002).

Durch Hydroxylierung von Dihydroceramid in Position 4 des Sphinganin-Gerüsts entsteht Phytoceramid, das mit einem Anteil von 20 mol-% das wichtigste Ceramid der menschlichen Epidermis ist (Yamamoto *et al.*, 1991) (Kap. 2.4). Bei Hefen erfolgt die Biosynthese von Phytoceramid über eine Hydroxylierung von Sphinganin durch eine Sphinganin-4-Hydroxylase, welche durch das *Sur2/Syr2*-Gen codiert wird (Haak *et al.*, 1997; Grilley *et al.*, 1998). Das entstandene Phytosphingosin wird anschließend mit einer Fettsäure zum Phytoceramid acyliert. Beim Menschen verläuft die Biosynthese von Phytoceramid jedoch anders, und die Hydroxylierung findet erst auf Dihydroceramid-Ebene unter Katalyse einer Dihydroceramid-4-Hydroxylase statt (Mizutani *et al.*, 2004). Kürzlich konnte in einem *in vitro*-Assay mit dem rekombinanten *Des2*-Protein aus Maus gezeigt werden, dass das Enzym zur Hydroxylierung von Dihydroceramid neben NADH Cytochrom  $b_5$  inklusive seiner C-terminalen membranständigen Domäne benötigt (Enomoto *et al.*, 2006).

---

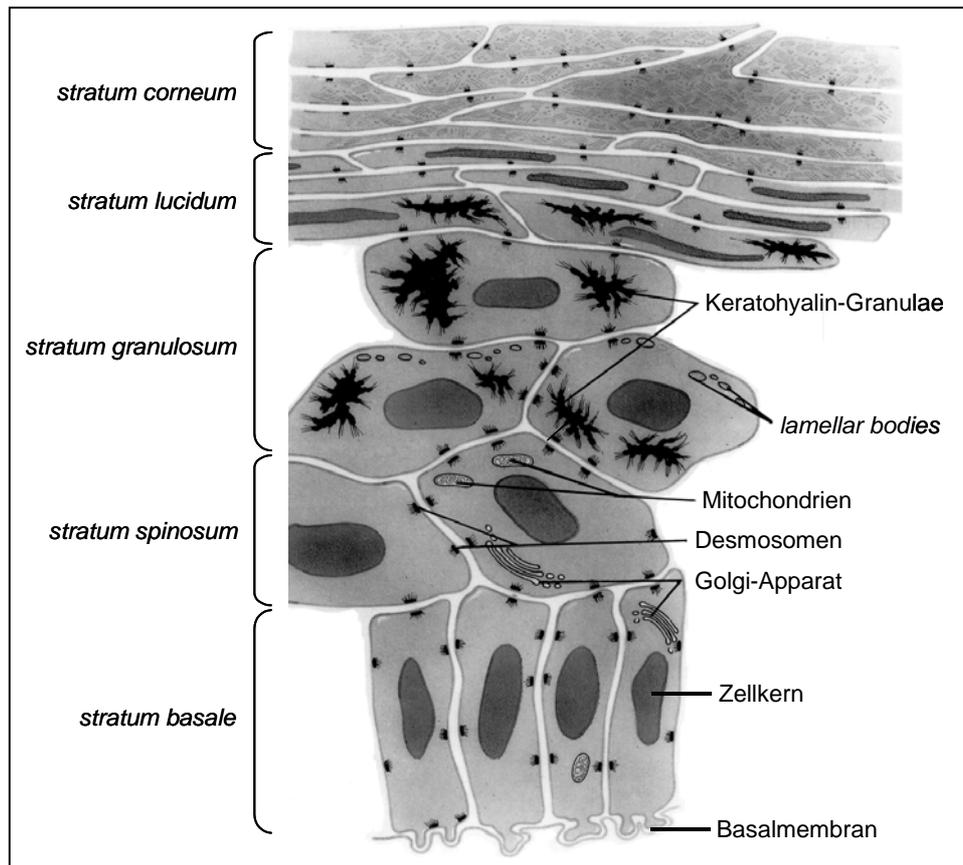
## 2.4 Die Ceramide der humanen Epidermis

Abweichend vom einheitlichen Aufbau des Ceramids, das als Anker komplexer Sphingolipide auf der äußeren Hälfte der Plasmamembran eukaryontischer Zellen dient, findet sich in der Epidermis ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Ceramide. Diese machen in etwa die Hälfte des gesamten Lipidgehalts in der Hornschicht (*stratum corneum*) aus und sind dort beim Aufbau der epidermalen Permeabilitätsbarriere in entscheidender Weise beteiligt.

### 2.4.1 Der Aufbau der humanen Epidermis

Die Haut ist mit einer Gesamtfläche von 1.5 bis 2 m<sup>2</sup> nach Darm und Lunge das drittgrößte Organ des Menschen und setzt sich von innen nach außen aus dem Unterhautfettgewebe (Subkutis, Hypodermis), dem Bindegewebe (Lederhaut, Dermis) und einem sich selbst erneuernden, mehrschichtigen Plattenepithel (Epidermis, Oberhaut) zusammen. Die Epidermis, die durch eine Basalmembran mit der Dermis verbunden ist, ist 0.04 mm (Augenlid) bis 1.2 mm (Fußsohle) dick. Sie besteht neben wenigen Melanozyten, Langerhanszellen, Merkelzellen und T-Lymphozyten im wesentlichen aus Keratinozyten. Man unterscheidet insgesamt fünf Schichten (Abb. 2.5), die die verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten repräsentieren. Die Homöostase der Epidermis ist durch einen genau ausbalancierten *steady state* gesichert, d. h. sie befindet sich stets im Gleichgewicht von Zellproliferation und terminaler Differenzierung mit anschließender Abschuppung (Desquamation). Die kontinuierliche Regeneration der Epidermis erfolgt in der Basalzellschicht (*stratum basale*) durch ständige Mitose von Keratinozyten mit Stammzelleneigenschaften (Hall und Watt, 1989). Diese produzieren durch differentielle Zellteilung Tochterzellen, die sich von der Basalmembran ablösen. Während ihrer anschließenden ca. 4 Wochen dauernden Wanderung durch die einzelnen Epidermisschichten durchlaufen sie verschiedene Differenzierungsstadien und schuppen schließlich als abgestorbene, kernlose Hornzellen (Korneozyten) von der Hautoberfläche ab (Niemann und Watt, 2002).

Dieser Prozess manifestiert sich in morphologisch und biochemisch distinkten Charakteristika der verschiedenen suprabasalen Schichten (Abb. 2.5). Die auf das *stratum basale* folgende Stachelzellschicht (*stratum spinosum*) enthält polygonale, durch Desmosomen verbundene Keratinozyten, die von Keratinfilamenten durchzogen sind. Mit Beginn der Differenzierung werden statt der im *stratum basale* hauptsächlich vorkommenden Keratine 5 und 14 die Keratine 1 und 10 exprimiert. Die aus diesen Keratinen aufgebauten Filamente bleiben bis ins *stratum corneum* erhalten und werden mit fortschreitender Differenzierung immer dichter gepackt (Kirfel *et al.*, 2003).



**Abb. 2.5** Schematischer Aufbau der Epidermis, modifiziert nach Montagna *et al.*, 1992  
Die Schichtstruktur der Epidermis repräsentiert die Differenzierungsstadien der Keratinozyten.

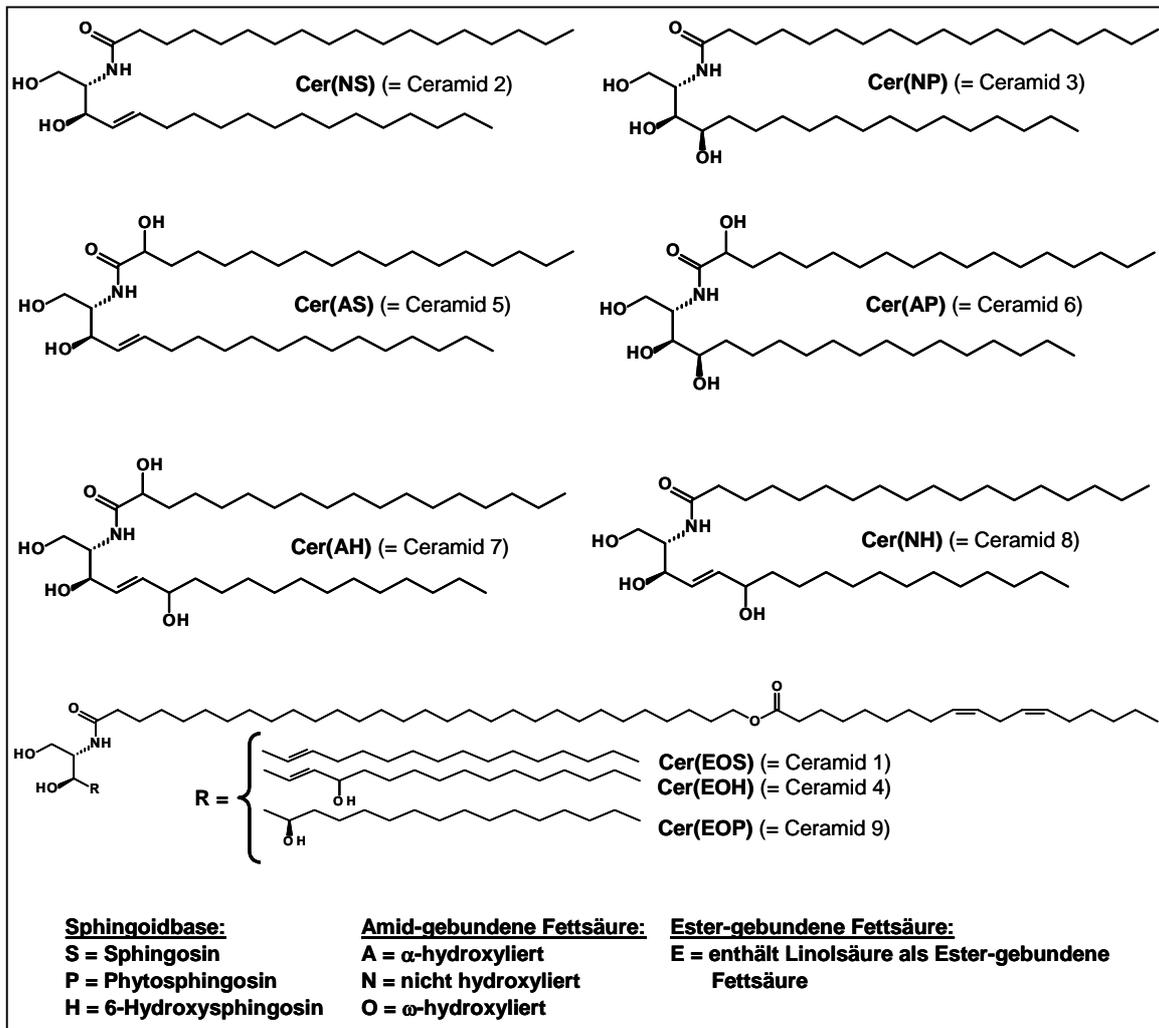
Die Zellen der Körnerzellschicht (*stratum granulosum*) zeigen bereits deutliche Anzeichen der beginnenden Verhornung. Sie werden flacher und verlieren ihre Organellen. Es bilden sich Keratohyalin-Granulae, die Profilaggrin enthalten. Dieses wird zu Filaggrin prozessiert, das eine Verdichtung der Keratinfilamente fördert (Nemes und Steinert, 1999; Kirfel *et al.*, 2003).

Die Glanzschicht (*stratum lucidum*) kommt nur an stark beanspruchten Hautstellen (Fußsohle, Handinnenfläche) vor. Sie enthält Eleidin, eine stark lichtbrechende Substanz, die die Zellen optisch dichter erscheinen lässt.

Die Hornschicht (*stratum corneum*), deren Ausdehnung 8 bis 13  $\mu\text{m}$  beträgt, repräsentiert das Endstadium der terminalen Differenzierung und besteht aus 15 bis 20 Zellschichten abgeflachter Keratinozyten. Sie enthalten keine Organellen mehr und sind mit dicht gepackten Keratinfilamenten gefüllt. Statt einer Plasmamembran besitzen sie eine über Isodipeptidbindungen dreidimensional quervernetzte Proteinschicht, den *cornified envelope* (CE), der von außen mit einer Monoschicht aus hautspezifischen Lipiden, dem *lipid bound envelope* (LBE), überzogen ist. Die Lipide des LBE sind über kovalente Bindungen mit den Proteinen des CE verknüpft. Die Keratinozyten sind stapelartig in eine multilamellare Lipidmatrix eingebettet, die gemeinsam mit dem LBE die Permeabilitätsbarriere im *stratum corneum* bildet.

## 2.4.2 Die epidermale Permeabilitätsbarriere

Die primäre Funktion der Haut besteht in der Aufrechterhaltung einer Barriere zwischen Organismus und Umwelt. Diese Barriere schützt den Körper auf der äußeren Seite vor schädlichen Fremdstoffen und Mikroorganismen, während sie auf der inneren Seite übermäßigen transepidermalen Wasserverlust verhindert. Der Schutz des Körpers vor Austrocknung ist eine essentielle Voraussetzung für das Überleben landlebender Wirbeltiere.



**Abb. 2.6** Frei extrahierbare Ceramide des humanen *stratum corneum*, Strukturen nach Wertz *et al.*, 1985; Robson *et al.*, 1994; Stewart und Downing, 1999; Ponec *et al.*, 2003. Nomenklatur nach Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994. Die entsprechende Bezeichnung der Ceramide in der alternativen Nomenklatur ist in Klammern gesetzt (Ponec *et al.*, 2003).

Die epidermale Permeabilitätsbarriere ist im *stratum corneum* lokalisiert. Die multilamellare Lipidmatrix, in die die Kerneozyten eingebettet sind, enthält neben Cholesterol und freien Fettsäuren ein breites Spektrum an Ceramiden mit unterschiedlichen Kettenlängen, Sättigungsgraden und Hydroxylierungsmustern (Abb. 2.6) (Downing, 1992). Da die Lipide der extrazellulären Matrix nicht an die Kerneozyten gebunden sind, lassen sie sich mit organischen Lösungsmitteln extrahieren. Man bezeichnet sie deshalb auch als „frei extrahierbare Lipide“. Im

Gegensatz zu Lipiddoppelschichten mit hohem Phospholipidgehalt, welche für Wassermoleküle permeabel sind, repräsentieren die kompakten, multilamellaren Membransysteme im *stratum corneum* eine effiziente Diffusionsbarriere für Wasser und andere polare Moleküle.

Bis heute wurden in humanem *stratum corneum* neun verschiedene Ceramide gefunden (Wertz *et al.*, 1985; Robson *et al.*, 1994; Stewart und Downing, 1999; Ponec *et al.*, 2003). Bei der allgemein verwendeten Nomenklatur nach Motta *et al.* und Robson *et al.* (Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994) werden die Strukturen durch Angabe der Sphingoidbase (S = Sphingosin, P = Phytosphingosin, H = 6-Hydroxysphingosin) sowie der *N*-Acyl-Fettsäure (N = nicht-hydroxyliert, A =  $\alpha$ -hydroxyliert, O =  $\omega$ -hydroxyliert) gekennzeichnet. Die  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure der freien Ceramide ist meist mit Linolsäure verestert (= E) (Abb. 2.6).

Alternativ werden die Ceramide durchnummeriert (Cer 1-Cer 9). Dabei werden die Ceramide 1 bis 7 gemäß ihres Laufverhaltens im Dünnschichtchromatogramm geordnet. Cer 1 hat den größten, Cer 7 den kleinsten  $R_f$ -Wert (Bouwstra *et al.*, 2003). Cer 8 (Stewart und Downing, 1999) und Cer 9 (Ponec *et al.*, 2003) wurden erst später identifiziert.

Die Kettenlängen beider Ceramidbausteine sind variabel. Besonders die  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren sind mit 24 bis 36 Kohlenstoffatomen ungewöhnlich lang und können auch ungeradzahlige Kettenlängen aufweisen (Wertz und Downing, 1987). Zusätzlich können die Fettsäuren gesättigt oder ein- bzw. mehrfach ungesättigt sein (Wertz *et al.*, 1989). Die Sphingoidbasen enthalten zwischen 16 und 26 Kohlenstoffatome und wurden auch ohne Doppelbindung, d. h. als Sphinganin beschrieben (Wertz und Downing, 1987).

Die freien Lipide bilden geordnete Schichten um die Korneozyten (Bouwstra *et al.*, 2003). Es ist anzunehmen, dass die kovalent gebundenen Lipide des LBE für die Organisation der Barrierelipide in der extrazellulären Matrix verantwortlich sind (Schreiner *et al.*, 2000). Störungen im Stoffwechsel der epidermalen Lipide führen zu einer verminderten Barriereleistung (Holleran *et al.*, 1993; Doering *et al.*, 1999a; Doering *et al.*, 1999b; Behne *et al.*, 2000) und tragen zu Krankheiten wie Atopischer Dermatitis (Macheleidt *et al.*, 2002; Farwanah *et al.*, 2005) oder Psoriasis (Alessandrini *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2004) bei.

Die Biogenese der extrazellulären Lipidmatrix und des *lipid bound envelope* (Abb. 2.7) beginnt im *stratum granulosum* mit der Bildung von *lamellar bodies*. Elektronenoptische Aufnahmen zeigen, dass naszierende *lamellar bodies* mit einem sehr ausgedehnten *trans*-Golgi Netzwerk assoziiert sind und dort wahrscheinlich durch Abschnürung von Membranbereichen gebildet werden (Elias *et al.*, 1998).

Die *lamellar bodies* enthalten neben lysosomalen Hydrolasen (Freinkel und Traczyk, 1985) molekulare Vorläufer der Ceramide des *stratum corneum*, die sogenannten *pro barrier*-Lipide, bei denen es sich um Glucosylceramide (Hamanaka *et al.*, 2002) und Sphingomyeline (Uchida *et al.*, 2000) handelt.

Die mit Linolsäure veresterten  $\omega$ -hydroxylierten Glucosylceramide sind wahrscheinlich in die die *lamellar bodies* umschließende Membran eingelagert. Dabei könnte die lange  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure die Lipiddoppelschicht vollständig durchspannen. Es ist vorstellbar, dass die Glucosyl-Kopfgruppe dabei in das Lumen des Vesikels hineinragt, während sich die Estergruppe auf der zytosolischen Seite befindet. Der Linolsäure-Schwanz würde in diesem Fall wiederum in die Membran eintauchen.

Die *lamellar bodies* wandern zur Plasmamembran und sezernieren ihren Inhalt über Exozytose in den Extrazellulärraum zwischen *stratum granulosum* und *stratum corneum* (Landmann, 1986). Es wird angenommen, dass die mit Linolsäure veresterten  $\omega$ -hydroxylierten Glucosylceramide in der Membran verbleiben und unter Katalyse einer Transglutaminase mit ihrer  $\omega$ -Hydroxygruppe an Glutaminseitenketten von Proteinen des *cornified envelope* gebunden werden. Im Ergebnis findet eine Umesterung statt, bei der die Linolsäure formal als Abgangsgruppe fungiert (Nemes *et al.*, 1999).

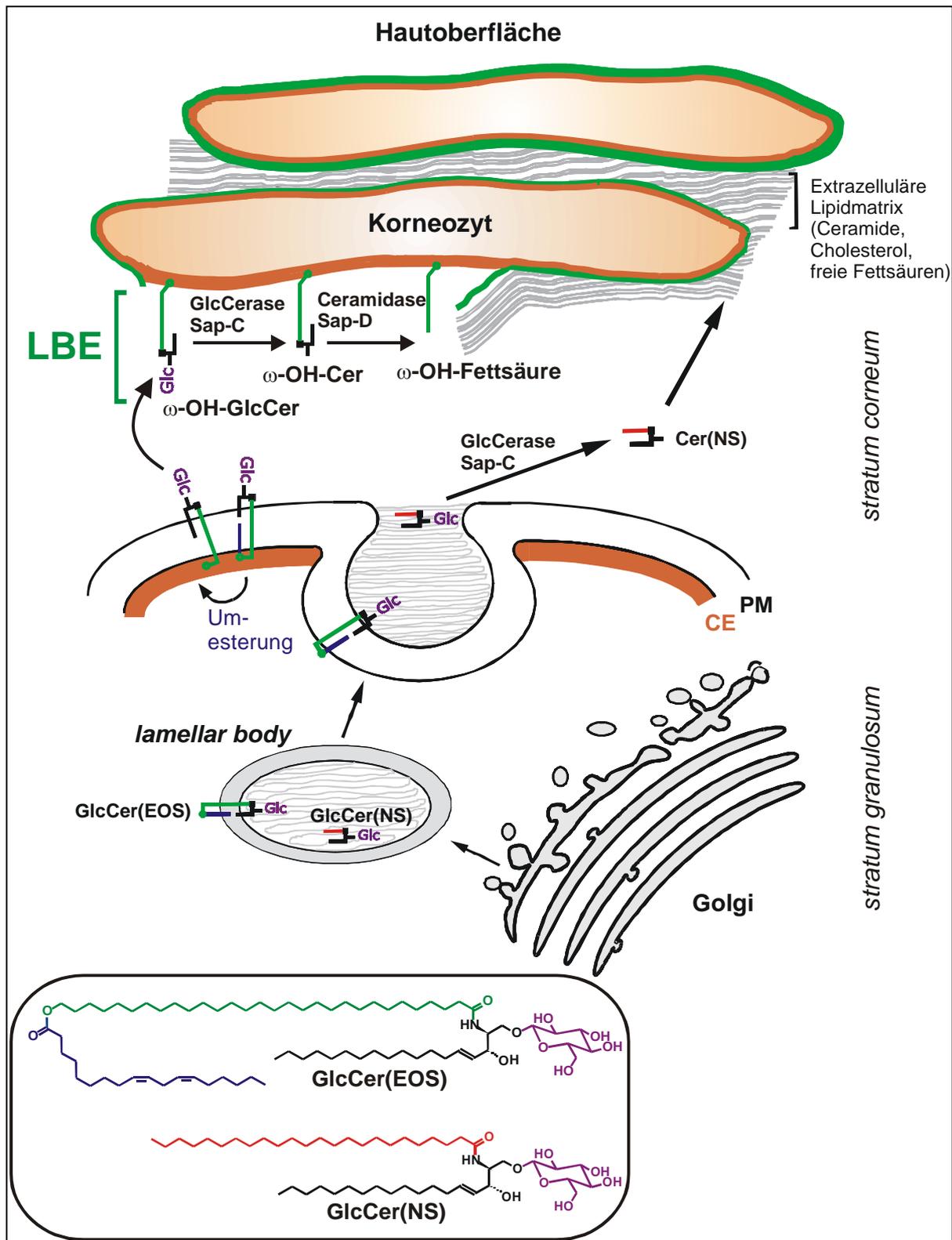
Die Ceramide des *stratum corneum* entstehen unmittelbar nach der Exozytose durch enzymatische Hydrolyse der entsprechenden Glucosylceramide und einzelner Sphingomyeline (Holleran *et al.*, 1993; Schmuth *et al.*, 2000). Dabei werden die über ihre  $\omega$ -Hydroxygruppe an den CE gebundenen Glucosylceramide zu den sogenannten „Protein-gebundenen Ceramiden“ prozessiert, die den *lipid bound envelope* bilden (Abb. 2.7) (Doering *et al.*, 1999a; Doering *et al.*, 1999b). Protein-gebundene Ceramide wurden mit Sphingosin, Phytosphingosin, 6-Hydroxysphingosin (Wertz und Downing, 1987; Wertz *et al.*, 1989; Marekov und Steinert, 1998) und Dihydrosphingosin (Sphinganine)<sup>[2]</sup> als Sphingoidbase beschrieben (zur Nomenklatur siehe Kap. 6.1). Der epidermale Glucosylceramid-Abbau benötigt *in vivo* die Aktivität der Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase (GlcCerase) und das Sphingolipid Aktivator Protein C (Sap-C) (Holleran *et al.*, 1993; Doering *et al.*, 1999a; Doering *et al.*, 1999b). Ein Defekt im Gen der GlcCerase führt zu einer Akkumulation von Glucosylceramid in den Lysosomen und damit zur häufigsten lysosomalen Speicherkrankheit, der Gaucher'schen Erkrankung. Bei vollständigem Verlust der GlcCerase-Aktivität sterben die Patienten, die sogenannten *Collodian babies*, kurz nach der Geburt an transepidermalem Wasserverlust (Liu *et al.*, 1988).

Die Sphingomyeline werden durch die saure Sphingomyelinase zu den entsprechenden Ceramiden hydrolysiert (Menon *et al.*, 1986). Weiterhin ist eine Spaltung der gebundenen  $\omega$ -Hydroxy-Ceramide in Sphingoidbase und  $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure durch die saure Ceramidase und Sap-D möglich. Die beschriebenen Prozesse finden im allgemeinen in den Lysosomen statt. In der Epidermis sind sie wahrscheinlich in den *lamellar bodies* oder in den extrazellulären Bereichen des *stratum corneum* lokalisiert (Abb. 2.7) (Madison *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 1999).

---

<sup>[2]</sup> Chopart, M., Castiel, I., Arbey, E., Schmidt, R., (Life Sciences, L. O. A. R. L., Aulnay-sous-Bois, France) (2001). A new type of covalently bound ceramide in human epithelial. *Poster No. 45 in Abstracts of: "Stratum Corneum III"*. Basel, CH.

---



**Abb. 2.7** Modell der Biogenese der extrazellulären Lipidmatrix und des *lipid bound envelope*, modifiziert nach Schuette *et al.*, 1999

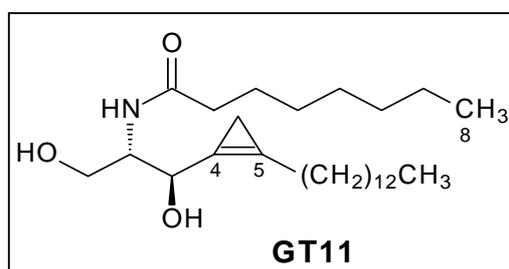
(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, PM = Plasmamembran, CE = *cornified envelope*, LBE = *lipid bound envelope*, GlcCerase = Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase ( $\beta$ -Glucocerebrosidase), Sap = Sphingolipid Aktivator Protein)

Ein weiterer Faktor, der die Funktion der Wasserbarriere beeinflusst, ist der Anteil derjenigen Ceramide mit gesättigter Sphingoidbase (Dihydroceramide) in der Epidermis. Mäuse, bei denen das Gen, das für den Transkriptionsfaktor *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)* codiert, in Keratinozyten ausgeschaltet wurde, starben innerhalb eines Tages nach der Geburt an durch transepidermale Wasserverlust bedingter Austrocknung. Die Epidermis der *Arnt-knock out*-Mäuse wies einen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduzierten Gehalt derjenigen Ceramide auf, die Sphingosin und Phytosphingosin als Sphingoidbase enthalten. Der Anteil der Dihydroceramide war dagegen erhöht (Takagi *et al.*, 2003). Diese Befunde zeigen, dass Ceramide mit Doppelbindung bzw. Hydroxylgruppe in Position 4 der Sphingoidbase für die Funktion der Epidermis essentiell sind und nicht durch die entsprechenden Dihydroceramide ersetzt werden können. Der Dihydroceramid-4-Desaturase und einer potentiellen 4-Hydroxylase kommen demnach eine große Bedeutung beim Aufbau der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere zu.

## 2.5 Inhibitoren der Dihydroceramid-Desaturase

Die selektive Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase ist eine Möglichkeit, die Rolle des Enzyms in der Signaltransduktion und beim Aufbau der epidermalen Permeabilitätsbarriere zu untersuchen. Bisher wurden jedoch erst wenige Inhibitoren beschrieben. Zwei in Position 3 der Sphingoidbase fluorierte Dihydroceramid-Analoga senkten *in vitro* die enzymatische Aktivität der Dihydroceramid-Desaturase von 100 % (Kontrolle) auf 91 % bzw. 73 % bei einer äquimolaren Konzentration von Substrat und Analogon von 50  $\mu\text{M}$  und bewirkten damit nur eine geringfügige Hemmung des Enzyms (De Jonghe *et al.*, 2000).

Eine mit der Dosis zunehmende Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase in Rattenlebermikrosomen ( $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$  ohne Vorinkubation bei einer Substrat-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ ) zeigte ein Substrat-Analogon mit Cyclopropen-Ring (Verbindung GT11, Abb. 2.8) (Triola *et al.*, 2001). Dieses Strukturelement wurde bereits an Acyl-CoA-Desaturasen untersucht. So wirkten Fettsäuren mit Cyclopropen-Einheit inhibierend auf diese Enzyme (Quintana *et al.*, 1998).



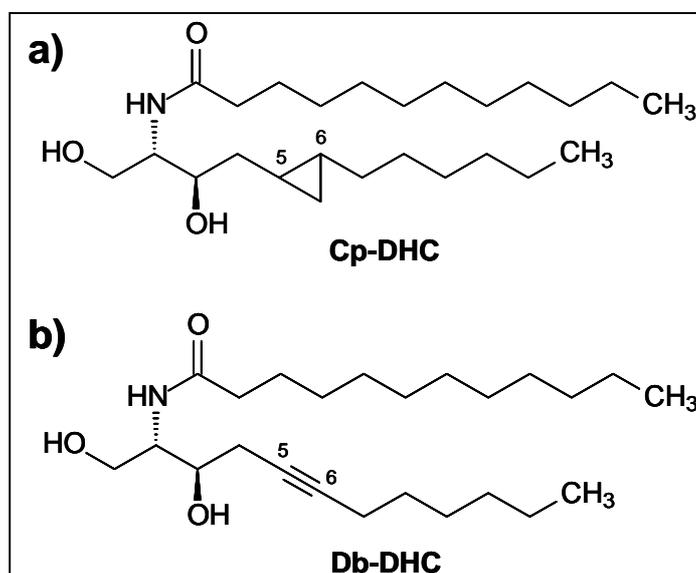
**Abb. 2.8** Inhibitor der Dihydroceramid-Desaturase

Da Thiol-Gruppen durch Addition an die Doppelbindung von Cyclopropenen alkyliert werden, besteht die Ursache der Hemmung möglicherweise in einer Reaktion des Cyclopropen-Rings von GT11 mit einem Cystein-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms (Quintana *et al.*, 1998). In kultivierten Kleinhirneuronen erwies sich GT11 in niedrigen Konzentrationen bis 1  $\mu\text{M}$  als spezifischer Inhibitor der Dihydroceramid-Desaturase. In höheren Konzentrationen ab 5  $\mu\text{M}$

induzierte GT11 jedoch zusätzlich eine Hemmung der Sphingosin-1-phosphat-Lyase und damit eine Akkumulation von Sphingosin-1-phosphat. Diese bewirkte wiederum, wahrscheinlich über einen Feedback-Mechanismus, eine Inhibierung der Serin-Palmitoyltransferase-Aktivität (Triola *et al.*, 2004). Verschiedene Analoga von GT11 mit Modifikationen am Cyclopropen-Ring, am Stickstoffatom, an C1 der Sphingoidbase und an den Stereozentren wurden synthetisiert, erwiesen sich aber als weniger wirksam als GT11 (Triola *et al.*, 2003; Bedia *et al.*, 2005).

## 2.6 Konzeption von Suizidinhibitoren der Dihydroceramid-Desaturase

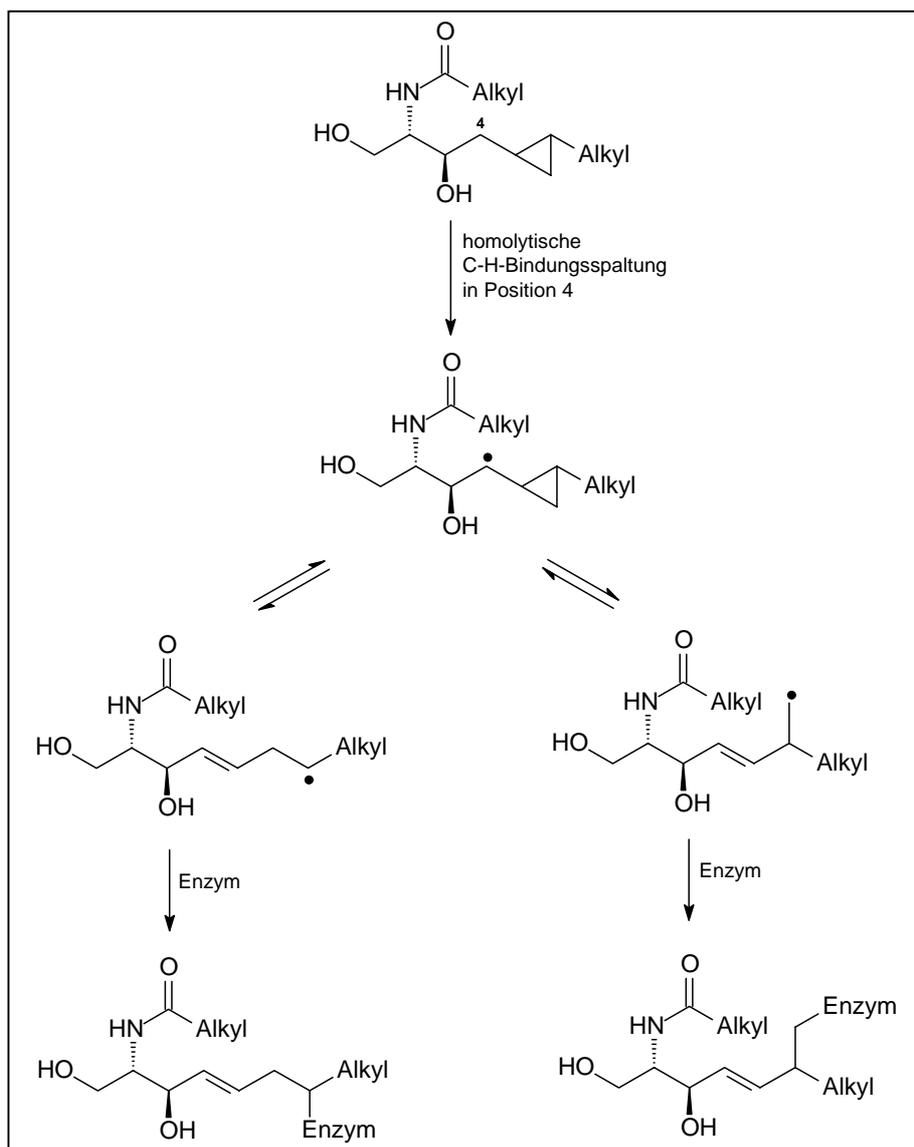
Da bei dem Mechanismus der Desaturase- bzw. Hydroxylase-Reaktion (Abb. 2.4) radikalische und möglicherweise auch kationische Zwischenstufen durchlaufen werden, bot sich die Synthese eines Suizidinhibitors an, der nach enzymatischer Einführung eines Radikals oder einer positiven Ladung in Position 4 des Ceramidgerüsts kovalent mit dem Protein reagieren kann. Dabei musste sichergestellt werden, dass die Einführung eines geeigneten Strukturelements von minimalen sterischen und elektronischen Veränderungen der Dihydroceramid-Struktur begleitet wird. Gravierende strukturelle Modifikationen innerhalb der Zielverbindung könnten deren enzymatische Aktivierung verhindern.



**Abb. 2.9** Dihydroceramid-Analoga mit a) Cyclopropyl-Einheit (Cp-DHC) bzw. b) Dreifachbindung (Db-DHC) in 5,6-Position des Sphinganin-Gerüsts

Da bekannt ist, dass Cyclopropylcarbanyl-Kationen und -Radikale unter Bildung von Homoallyl-Produkten reagieren können (Newcomb *et al.*, 1995), schien eine für diesen Zweck geeignete Funktionalität ein Cyclopropyl-Rest zwischen den Positionen 5 und 6 des Dihydroceramid-Gerüsts zu sein (Verbindung Cp-DHC, Abb. 2.9 a)). Suizidinhibitoren auf der Basis von Cyclopropanen wurden bereits beschrieben (Silverman, 1983; Mu *et al.*, 1996).

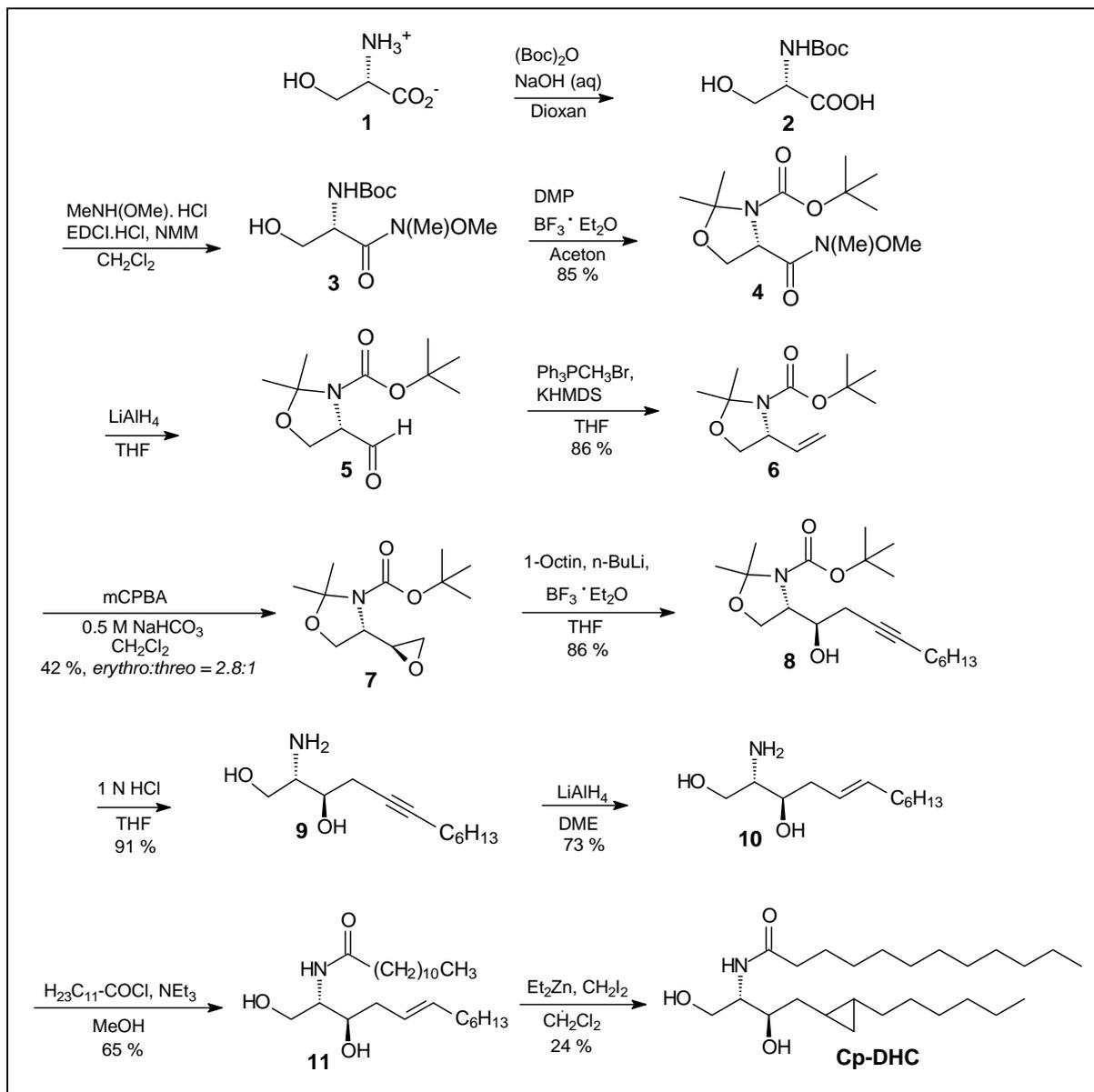
Abb. 2.10 zeigt den möglichen Mechanismus der Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC. Nach homolytischer Spaltung der C-H-Bindung in Position 4 könnte die reaktive Zwischenstufe unter Öffnung des Cyclopropyl-Rings umlagern und anschließend mit einer Aminosäureseitenkette der Desaturase eine kovalente Bindung eingehen. Die Cyclopropyl-Gruppe hat dabei im Vergleich mit einem Dihydroceramid-Analogon mit 5,6-Doppelbindung zwei Vorteile. Zum einen ist ein Angriff des Proteins auf zwei Zentren des Inhibitors möglich, zum anderen sollte die Bindung durch Freiwerden der Ringspannung irreversibel werden.



**Abb. 2.10** Möglicher Mechanismus der Inhibierung der Desaturase- bzw. Hydroxylase-Reaktion durch das Substratanalogon Cp-DHC

Cp-DHC (Abb. 2.9 a)) wurde in elf Schritten ausgehend von L-Serin synthetisiert (Abb. 2.11) (Brodesser, 2002). Die Epoxidierung des Alkens (6) führte dabei zu einem Gemisch der Diastereomere mit *erythro*- und mit *threo*-Konfiguration im Verhältnis 2.8:1. Das Diastereomer mit der in natürlichem Ceramid vorliegenden *erythro*-Konfiguration (7) wurde säulenchromatographisch abgetrennt und weiter umgesetzt. Die Cyclopropyl-Gruppe wurde im

letzten Schritt der Synthese nach der Furukawa-Variante der Simmons-Smith Reaktion (Furukawa *et al.*, 1968) eingeführt. Diese lieferte ein Gemisch zweier Diastereomere, die nicht getrennt wurden.

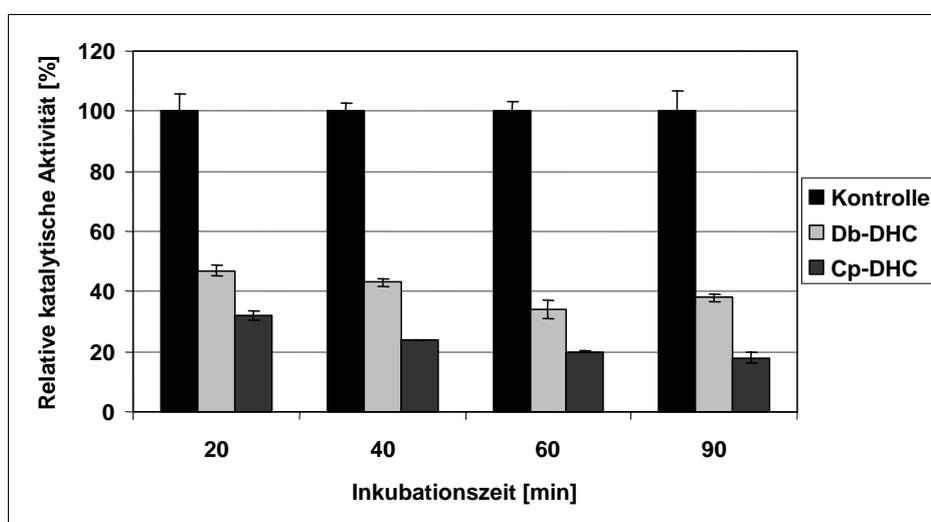


**Abb. 2.11** Synthese des Dihydroceramid-Analogons Cp-DHC  
 (Boc = *tert*-Butyloxyarbyl-, EDCI.HCl = *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid, NMM = *N*-Methylmorpholin, DMP = 2,2-Dimethoxypropan, THF = Tetrahydrofuran, KHMDS = Kaliumhexamethylsilazid, mCPBA = *meta*-Chlorperoxybenzoesäure, DME = 1,2-Dimethoxyethan)

Auf einer Abzweigung des ursprünglich geplanten Synthesewegs wurde durch Acylierung des Sphingalin-Analogons (**9**) mit Dreifachbindung in 5,6-Position (Abb. 2.11) die Verbindung Db-DHC (Abb. 2.9 b)) hergestellt. Db-DHC war zuvor bereits auf anderem Weg ausgehend von 4,6-*O*-Benzyliden-D-Galaktose synthetisiert worden (Brenner-Weiß, 1992) und stellt ebenfalls einen potentiellen Suizidinhibitor der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. der Dihydroceramid-4-Hydroxylase dar. Die Inhibierung des jeweiligen Enzyms durch Verbindung Db-DHC kann in ähnlicher Weise erfolgen wie durch Verbindung Cp-DHC. Nach enzymatischer Spaltung der C-H-

Bindung in Position 4 und eventueller Einelektronenoxidation könnte die dadurch entstandene reaktive Allenyl-Zwischenstufe mit einer nucleophilen Aminosäureseitenkette der Desaturase bzw. Hydroxylase eine kovalente Bindung eingehen (Maycock *et al.*, 1976).

Cp-DHC und Db-DHC wurden in einem für die Dihydroceramid-Desaturase aus Rattenleber-Mikrosomen etablierten *in vitro*-Testsystem (Michel *et al.*, 1997) untersucht. Zur Unterscheidung zwischen reversibler und irreversibler Inhibierung wurden die Substanzen in Detergenz-haltigem Puffer gelöst und für verschiedene Zeiten mit der Enzymquelle inkubiert (Abb. 2.12). Wie für irreversible Inhibitoren zu erwarten, führten beide Verbindungen in einer Konzentration von 750  $\mu\text{M}$  zu einer zeitabhängig leicht zunehmenden Hemmung der Desaturase-Aktivität, wobei Cp-DHC im Vergleich zu Db-DHC eine insgesamt deutlich stärker hemmende Wirkung zeigte (Brodesser, 2002).



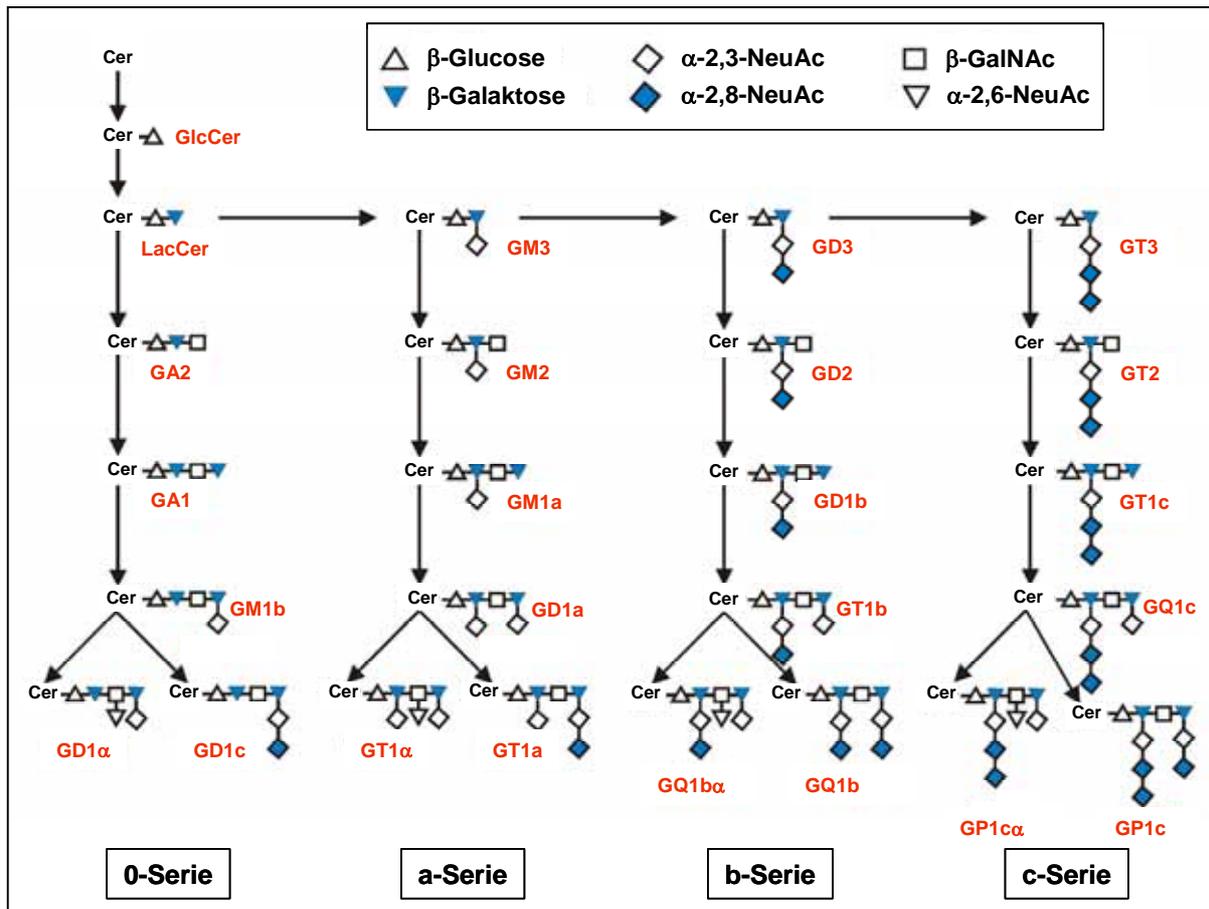
**Abb. 2.12** Zeitabhängigkeit der Dihydroceramid-Desaturase-Aktivität in Gegenwart von jeweils 750  $\mu\text{M}$  der beiden Substratanaloga Cp-DHC und Db-DHC  
 Eine relative katalytische Aktivität von 100 % entsprach einem Absolutwert von  $2.04 \pm 0.12 \text{ nmol}/(\text{h} \times \text{mg})$ .  
 Inkubationsbedingungen: 10 nmol *N*-[1- $^{14}\text{C}$ ]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphingarin als Komplex mit Rinderserumalbumin, 750  $\mu\text{M}$  Cp-DHC bzw. Db-DHC in 1.1 mg CHAPS-Lösung (5.4 mM), 3 mM NADH, 600  $\mu\text{g}$  Protein aus Rattenleber-Mikrosomen, 25 mM MOPS/KOH-Puffer pH 7.4, 37 °C, Gesamtvolumen 320  $\mu\text{l}$ .  
 Die Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=2) wurden auf den Wert der Kontrolle bei 20 min normiert und alle anderen Werte entsprechend korrigiert. Die Korrekturfaktoren betragen 1.45 (40 min), 1.56 (60 min) und 1.70 (90 min).

## 2.7 Glykosphingolipide: Funktion, Biosynthese und Abbau

Ceramid verankert Glykosphingolipide (GSL) und Sphingomyelin in der äußeren Hälfte der Plasmamembran eukaryontischer Zellen (Kap. 2.1). Die GSL bilden zusammen mit Glykoproteinen eine Kohlenhydratschicht auf der Zelloberfläche, die Glykokalix. Es existiert eine Vielzahl von GSL, die sich in Art, Zahl und Verknüpfung der einzelnen Zuckerbausteine unterscheiden, sich jedoch in wenigen Serien zusammenfassen lassen. GSL bilden auf der Zelloberfläche zelltypspezifische Muster aus, die sich bei Differenzierung und viraler oder onkogener Transformation ändern (Hakomori, 1981). GSL sind an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt und treten in Wechselwirkung mit Rezeptoren und Enzymen innerhalb derselben Membran (Yamashita *et al.*, 2003). Weiterhin dienen GSL als Bindungsstellen für Viren (Markwell *et al.*, 1981), Bakterien (Karlsson, 1989) und Toxine (Walton *et al.*, 1988).

Bei den GSL von Wirbeltieren ist ein Glucose- oder Galaktoserest  $\beta$ -glykosidisch mit der 1-Position von Ceramid verbunden. Nach Abschluss der Ceramid-Biosynthese auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (Kap. 2.1) erfolgt die Übertragung des ersten Zuckerbausteins auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates (Coste *et al.*, 1986). Die Galaktosylierung von Ceramid (Schulte und Stoffel, 1993) findet vorwiegend in den Oligodendrozyten des Zentralnervensystems und in den Schwann-Zellen des Peripheren Nervensystems statt. Die Reaktion der 3'-OH-Gruppe im Galaktoserest von Galaktosylceramid mit als PAPS (3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat) aktiviertem Sulfat liefert Sulfatid (GalCer-3-sulfat) (Sundaram und Lev, 1992). Galaktosylceramid (GalCer) und Sulfatid treten in hohen Konzentrationen in den multilamellaren Schichten von Myelin auf, das die Axone von Nervenzellen umgibt (Coetzee *et al.*, 1998). *Knock out*-Mäuse, bei denen das Gen der Ceramid-Galaktosyltransferase inaktiviert wurde und die demzufolge kein GalCer und kein Sulfatid bilden können, sind dennoch in der Lage, Myelin mit weitgehend normaler Struktur aufzubauen. Anstelle des fehlenden GalCer bauen sie ein im Fettsäureanteil hydroxyliertes Glucosylceramid (GlcCer) in ihr Myelin ein. Die Stabilität und die Funktion dieser Myelinschichten sind allerdings stark eingeschränkt (Bosio *et al.*, 1996; Coetzee *et al.*, 1996). Die Biosynthese der meisten GSL von Wirbeltieren erfordert jedoch nicht die Galaktosylierung, sondern die Glucosylierung von Ceramid. Dazu überträgt die GlcCer-Synthase einen Glucoserest von UDP-Glucose auf Ceramid. Nach Translokation von Glucosylceramid in das Lumen des Golgi-Apparates werden die verschiedenen GSL durch sequentielle Übertragung von Kohlenhydratbausteinen aufgebaut und anschließend über vesikulären Membranfluss und Exozytose auf die Oberfläche der Plasmamembran transportiert (Schwarzmann und Sandhoff, 1990). Dies gilt auch für die Ganglioside, anionische GSL, die sich dadurch auszeichnen, dass sie eine oder mehrere Einheiten *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) innerhalb ihres Zuckerbaumes enthalten. Sie sind besonders häufig auf der Oberfläche von Nervenzellen der grauen Hirnsubstanz, wo sie 0.1 % des Trockengewichts ausmachen (Ledecken und Wu, 1992). Mit Ausnahme von GM4 leiten sich Ganglioside strukturell und biosynthetisch vom Laktosylceramid ab. Ihr Aufbau wird durch wenige recht unspezifische Glykosyltransferasen katalysiert (Pohlentz *et al.*, 1988). Laktosylceramid und seine sialylierten Derivate GM3, GD3 und GT3 sind Vorstufen komplexer Ganglioside der O-, a-, b- und c-Serien (Abb. 2.13) (van Echten und Sandhoff, 1993; Hidari *et al.*, 1994). Die häufigsten Ganglioside im Hirngewebe sind GM1a und GD1a, wobei der

Gehalt der einzelnen Ganglioside jedoch je nach Entwicklungsstadium des Gehirns schwankt (Vanier *et al.*, 1971; Seyfried *et al.*, 1984).

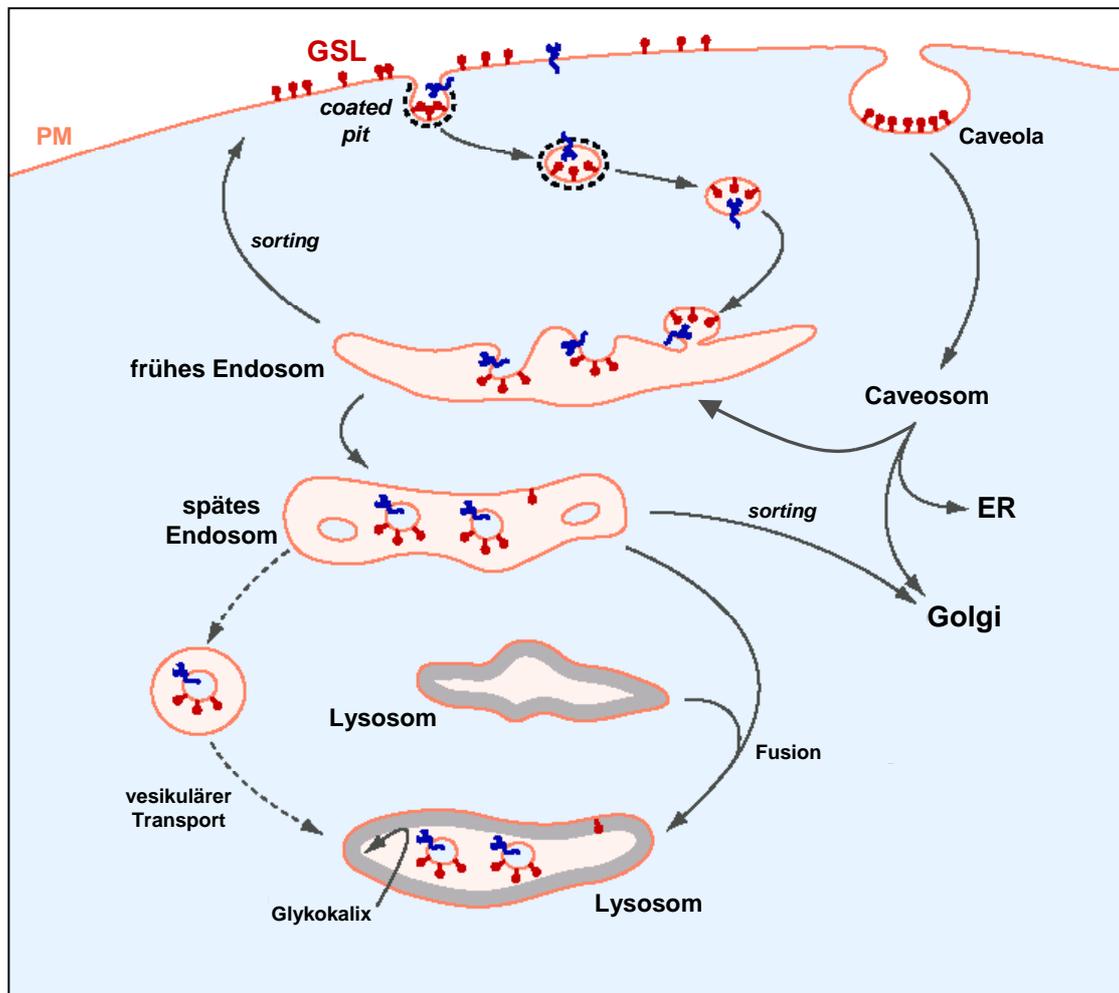


**Abb. 2.13** Biosyntheschema komplexer Ganglioside, Nomenklatur nach Svennerholm, 1963; Svennerholm, 1994. (Cer = Ceramid, LacCer = Laktosylceramid, NeuAc = *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure), GalNAc = *N*-Acetylgalaktosamin)

Außer über *de novo* Synthese können GSL auch in *salvage* Prozessen, in denen Monosaccharide, Fettsäuren und Sphingoidbasen aus dem Abbau der GSL wiederverwendet werden, entstehen (Gillard *et al.*, 1998). Der Katabolismus der GSL findet in den sauren Kompartimenten der Zelle statt. Er beginnt mit der Abschnürung von Bereichen der Plasmamembran als Stachelsaumgrübchen (*coated pits*) oder *caveolae* zu intrazellulären Vesikeln, welche mit frühen Endosomen fusionieren. Der weitere Weg führt dann über Reifungsprozesse und vesikuläre Transportmechanismen zu den Lysosomen (Thilo *et al.*, 1995). Unter Berücksichtigung des durch eine Reihe von Befunden unterstützten Modells der Topologie des lysosomalen Verdauungsapparats (Fürst und Sandhoff, 1992; Sandhoff und Kolter, 1996) erreichen die GSL den intrazellulären Verdauungsapparat als Bestandteile von intraendosomalen bzw. intralysosomalen Vesikeln und Membranstrukturen (Abb. 2.14).

Auf diese Weise werden die GSL den abbauenden Enzymen auf der Oberfläche von Vesikeln im Lumen der Lysosomen angeboten. Die äußere lysosomale Membran ist dabei auf ihrer Innenseite durch eine Glykokalix vor Eigenverdau geschützt. Für die Hydrolyse von GSL mit Oligosaccharidketten, die aufgrund ihrer zu geringen Länge nicht weit genug in die wässrige Phase hineinragen, wird zusätzlich zur jeweiligen lysosomalen Hydrolase ein Aktivatorprotein

(Sphingolipid Aktivator Proteine Sap-A bis -D bzw. GM2-Aktivator) benötigt, das die Membran solubilisiert und die Wechselwirkung zwischen membranständigem GSL und wasserlöslichem Enzym vermittelt (Fürst und Sandhoff, 1992; Klein *et al.*, 1994; Kolter und Sandhoff, 2005).



**Abb. 2.14** Topologie der Endozytose und des lysosomalen Verdauens, modifiziert nach Kolter und Sandhoff, 2005  
(GSL = Glykosphingolipide, PM = Plasmamembran, ER = Endoplasmatisches Retikulum)

Aufgrund des sequentiellen Abbaus der GSL kommt es bei einem Defekt eines lysosomalen Abbauenzym oder eines notwendigen Aktivatorproteins zu einem Block in der Hydrolyseabfolge. Das entsprechende Substrat kann nicht weiter abgebaut werden und akkumuliert im Lysosom. Dies führt zu einer Schädigung der Zelle und schließlich zum Zelltod. Beim Menschen sind zahlreiche erbliche Sphingolipid-Speicherkrankheiten (Sphingolipidosen) bekannt, deren Symptomatik durch einen Block im Glykosphingolipid-Katabolismus hervorgerufen wird. Bei den einzelnen Erkrankungen zeigen sich recht unterschiedliche Symptome. Dies ist darauf zurückzuführen, dass aufgrund der unterschiedlichen Substrate, die gespeichert werden, verschiedene Zelltypen betroffen sind. Da GSL der *ganglio*-Serie im Zentralen Nervensystem jedoch besonders häufig sind, sind Gangliosidosen mit einer starken Neurodegeneration verbunden (Übersicht in Kolter und Sandhoff, 1999; Kolter und Sandhoff, 2006).

## 2.8 Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2)

Zu einer anderen Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen als die Gangliosidosen gehören die Spinocerebellären Ataxien (SCAs), die autosomal dominant vererbt und in der Reihenfolge der Beschreibung ihrer Genorte von Typ 1 bis Typ 17 (SCA1-SCA17) durchnummeriert wurden (Übersicht in Schöls und Rieß, 2002). Gemeinsame Ursache der Spinocerebellären Ataxien Typ 1, 2, 3, 6, 7, 12 und 17, sowie der Spinobulbären Muskelatrophie (SBMA), der Dentatorubralen pallido-luisianen Atrophie (DRPLA) und von Chorea Huntington („Veitstanz“), ist die Expansion einer Cytosin-Adenin-Guanin-(CAG-)Codonfolge im codierenden Bereich der betroffenen Gene (Orr, 2001). Bei den restlichen SCA-Typen ist entweder die Repeatsequenz eines anderen Codons verlängert oder das betroffene Codon ist noch nicht bekannt. Die CAG-Codonfolge codiert im zugehörigen Protein für einen Polyglutaminbereich, der aufgrund der Mutation ebenfalls expandiert ist. Zum Auftreten von Symptomen kommt es, wenn die CAG-Repetition bzw. der Polyglutamin-Einbau einen Schwellenwert überschreitet.

Über die Häufigkeit der autosomal dominant vererbten Ataxien gibt es kaum verlässliche Angaben. Epidemiologische Studien in weitgehend abgeschlossenen Populationen ergaben eine Prävalenz von 1.2/100 000 (Leone *et al.*, 1995). Jedoch schwankt das Auftreten der einzelnen Mutationen in verschiedenen ethnischen Gruppen stark. So scheint SCA1 für die meisten autosomal dominant vererbten Ataxien in Russland verantwortlich zu sein, während SCA2 die häufigste Mutation in Kuba ist (Orozco *et al.*, 1989). So gibt es in der kubanische Provinz Holguin pro 200 Einwohner einen SCA-Patienten.

Normale SCA2-Allele enthalten eine Folge von 15-31 CAG-Codons. Eine Expansion dieser Region auf 35 und mehr CAG-Einheiten führen zur Erkrankung. Das Allel mit 34 CAG-Codons kommt sowohl bei Gesunden als auch bei SCA2-Patienten vor (Riess *et al.*, 1997).

Die Symptome einer SCA2-Erkrankung umfassen eine Störung der Koordination von Bewegungsabläufen (Ataxie) und eine auf unpräziser Artikulation beruhende Sprachstörung (Dysarthrie). Desweiteren kommt es sehr früh im Krankheitsverlauf zu einer Verlangsamung der horizontalen Sakkaden (d.h. der schnellen und ruckartigen Bewegungen, mit denen ein Auge bewusst von einem Fixpunkt zum nächsten bewegt wird). Zusätzlich kann eine sensomotorische Neuropathie, Demenz, eine Abschwächung der Muskeleigenreflexe sowie ein Halte- und Aktionstremor auftreten (Abele *et al.*, 1997; Schöls *et al.*, 1997; Wadia *et al.*, 1998; Burk *et al.*, 1999). Bildgebende Verfahren zeigen eine olivopontocerebelläre Atrophie.

Das Manifestationsalter ist sehr variabel und schwankt zwischen 1 und 65 Jahren. Genotyp/Phänotyp-Korrelationen zeigen für alle SCA-Typen eine reziproke, nicht-lineare Beziehung zwischen der Länge der expandierten CAG-Region und dem Alter der Patienten bei Ausbruch der Krankheit. So führt eine Verlängerung der Repeatsequenz um eine CAG-Einheit bei SCA2 im Mittel zu einer Vorverlegung des Erkrankungsbeginns um 2.5 Jahre. Jedoch lassen sich aus derartigen statistischen Aussagen keine Prognosen für den Einzelfall herleiten. Hinzu kommt, dass die expandierten CAG-Regionen im SCA2-Gen instabil sind und sich insbesondere bei paternalen Vererbung erheblich weiter verlängern können. Dieses als *Antizipation* bezeichnet Phänomen führt in aufeinander folgenden Generationen einer Familie zu einer Verfrühung des Erkrankungsbeginns und zu einer Verstärkung der Symptome (Schöls und Rieß, 2002).

Das SCA2-Gen wurde auf Chromosom 12q24.1 kartiert und unabhängig voneinander von drei Arbeitsgruppen kloniert (Imbert *et al.*, 1996; Pulst *et al.*, 1996; Sanpei *et al.*, 1996). Es besitzt

---

keine Homologien zu bekannten Genen und wird ubiquitär, weit über neuronale Gewebe hinaus, exprimiert. Es ist unklar, wodurch bei dieser breiten Expression im Falle einer Expansion ein selektiver neuronaler Zelltod ausgelöst wird. Das SCA2-Gen codiert für das zytosolische Protein Ataxin-2, das aus 1312 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 145 kDa aufweist (Huynh *et al.*, 1999). Durch Immunfluoreszenzmarkierung und subzelluläre Fraktionierung zeigte sich im Zellmodell, dass Ataxin-2 vornehmlich im Golgi-Apparat, aber auch in Vesikeln und an der Zellmembran gefunden wird. Ataxin-2 mit expandiertem Polyglutaminstrang verliert diese spezifische Lokalisation und stört die normale Organisation des Golgi-Apparates (Huynh *et al.*, 2003).

Die Funktion der Ataxine ist unbekannt. Da jedoch zahlreiche Transkriptionsfaktoren einen Polyglutaminbereich aufweisen, vermutet man, dass sie eine Rolle bei der Gentranskription spielen könnten. Auch der Pathomechanismus, der zu den SCA-Erkrankungen führt, ist weitgehend ungeklärt. Für die meisten SCA-Typen wurden, primär in den betroffenen Geweben, intranukleäre Proteinaggregate in Form von Einschlusskörperchen nachgewiesen. Da die Einschlusskörperchen jedoch nur kurze Proteinfragmente, die die verlängerte Polyglutaminkette tragen, enthalten, werden die Proteine offenbar vor ihrem Transport vom Zytosol in den Zellkern proteolytisch gespalten (Schöls und Rieß, 2002). Für SCA2 scheinen intranukleäre, neuronale Einschlusskörper allerdings kaum eine Rolle zu spielen. Bei dieser Erkrankung konnten jedoch Aggregate im Zytosol nachgewiesen werden (Huynh *et al.*, 2000).

In jüngerer Zeit mehren sich die Hinweise, dass bei Polyglutaminerkrankungen der Lipidstoffwechsel gestört sein könnte. Bei Morbus Huntington zeigte sich sowohl bei Patienten als auch bei transgenen Mäusen, dass es bereits im Frühstadium der Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und -tieren zu einem signifikanten Unterschied des Gewichts, evaluiert durch den *body mass index*, kommt (Djousse *et al.*, 2002). Ebenfalls in einem transgenen Tiermodell für Morbus Huntington konnte die Ataxie durch Gabe von essentiellen Fettsäuren im Vergleich zu Kontrolltieren gemindert werden (Clifford *et al.*, 2002). Während die Expression von variantem Ataxin-2 mit einer Expansion der PolyQ-Domäne auf 52 Glutamine in Mäusen zu motorischen Defiziten und einer Degeneration von Purkinjezellen führt (Huynh *et al.*, 2000), sind homozygote SCA2-*knock out*-Mäuse lebensfähig und zeigen keine Anzeichen einer neuronalen Bewegungsstörung (Kiehl *et al.*, 2006). Allerdings leiden sie bereits 12 Wochen postnatal im Vergleich zu Kontrolltieren an einer ausgeprägten Adipositas (I. Lastres-Becker, persönliche Mitteilung). Bei SCA2-Patienten beobachtet man dagegen sehr früh im Krankheitsverlauf eine Reduktion des Unterhautfettgewebes (C. Seifried, persönliche Mitteilung). Ob die Ursache für diese Beobachtungen in einem durch das fehlende bzw. veränderte Ataxin-2 gestörten Lipidstoffwechsel liegt, bleibt noch zu klären.

## 2.9 Zielsetzung

Nachdem die beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC bereits in einem *in vitro*-Testsystem zu einer zeitabhängig zunehmenden Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase aus Rattenleber-Mikrosomen geführt hatten (Brodesser, 2002), sollte im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC bzw. Db-DHC auch in Zellkultur nachweisbar ist. Dazu sollten unter Zusatz der beiden Verbindungen metabolische Markierungsstudien mit dem radiomarkierten Ausgangsmolekül der Ceramid-Biosynthese L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin an humanen Fibroblasten, Kleinhirnneuronen von Mäusen und humanen differenzierten Keratinozyten durchgeführt werden. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich der Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC auf den Stoffwechsel der strukturell unterschiedlichen Ceramide, insbesondere von Phytoceramid, und der höherer Sphingolipide in humanen differenzierten Keratinozyten auswirkt. Hierzu sollten zusätzliche Markierungen mit radiomarkierten zellgängigen Analoga von Dihydroceramid und Ceramid, also des Substrates und des Produktes der Desaturase-Reaktion, erfolgen.

Ebenfalls untersucht werden sollte, wie sich der Verlust der 4,5-(*E*)-Doppelbindung in Sphingolipiden auf kultivierte Zellen auswirkt. Zu diesem Zweck sollten in humanen Keratinozyten die Expressionsraten einiger am Ceramidstoffwechsel und an der Differenzierung beteiligter Proteine mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion analysiert werden.

Da anzunehmen ist, dass die beiden Dihydroceramid-Analoga nach Eintritt in die Zelle auf die gleiche Weise metabolisiert werden wie endogene Ceramide, sollten etwaige Metabolite von Cp-DHC und Db-DHC durch massenspektrometrische Methoden identifiziert werden.

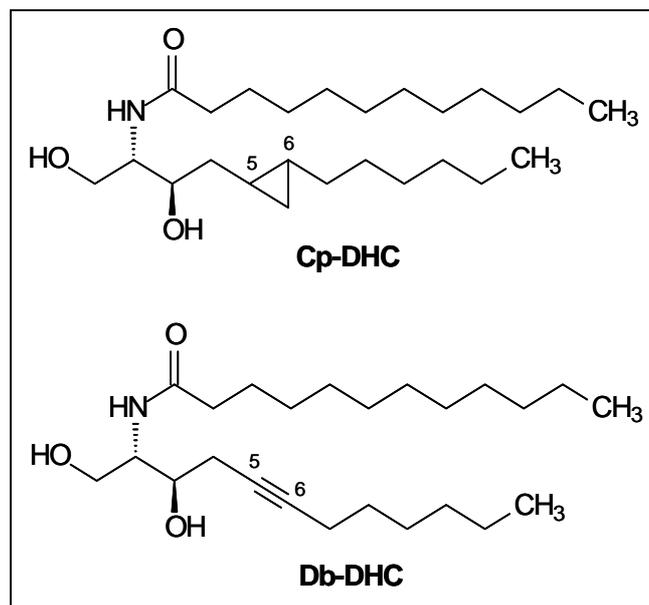
Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. G. Auburger von der Klinik für Neurologie der Universität Frankfurt/Main Untersuchungen zu einer mögliche Störung des Lipidstoffwechsels bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 durchgeführt werden. Dazu sollte die Lipidzusammensetzung in Hirngewebe von SCA2-Patienten und von SCA2-*knock out*-Mäusen in Vergleich zu gesundem Kontroll- bzw. Wildtypgewebe analysiert werden.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf den Sphingolipidstoffwechsel kultivierter Zellen

Die beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase Cp-DHC und Db-DHC (Abb. 3.1) wurden bereits in einem von Michel *et al.*, 1997 für die Dihydroceramid-Desaturase aus Rattenleber-Mikrosomen etablierten *in vitro*-Testsystem untersucht (Brodesser, 2002).



**Abb. 3.1** Strukturen der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC

Dabei wurden die Substanzen zur Unterscheidung zwischen reversibler und irreversibler Inhibierung für verschiedene Zeiten mit der Enzymquelle inkubiert. Beide Verbindungen führten in einer Konzentration von 750  $\mu\text{M}$  innerhalb eines Zeitraums von etwa einer Stunde, in dem die Enzymaktivität *in vitro* messbar ist, zu einer leicht zunehmenden Hemmung der Desaturase-Aktivität. Cp-DHC zeigte dabei im Vergleich zu Db-DHC eine deutlich stärker inhibierende Wirkung (Brodesser, 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Desaturase durch beide Verbindungen, insbesondere durch Cp-DHC, irreversibel gehemmt wird. Die Geschwindigkeit der Inaktivierung scheint jedoch recht niedrig zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase durch die Substratanaloga Cp-DHC bzw. Db-DHC in Zellkultur nachweisbar ist und welchen Einfluss diese gegebenenfalls auf den Metabolismus der strukturell unterschiedlichen Ceramide humaner Keratinozyten hat. Darüber hinaus sollte mit Hilfe der genannten Verbindungen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, in welcher Weise sich eine Hemmung der Desaturase-Aktivität und damit eine Zunahme des Anteils von Ceramiden mit gesättigter Sphingoidbase (Dihydroceramide) auf die Expression ausgewählter Proteine humaner Keratinozyten auswirkt.

### 3.1.1 Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC auf den Sphingolipidstoffwechsel in humanen Fibroblasten und murinen Kleinhirnneuronen

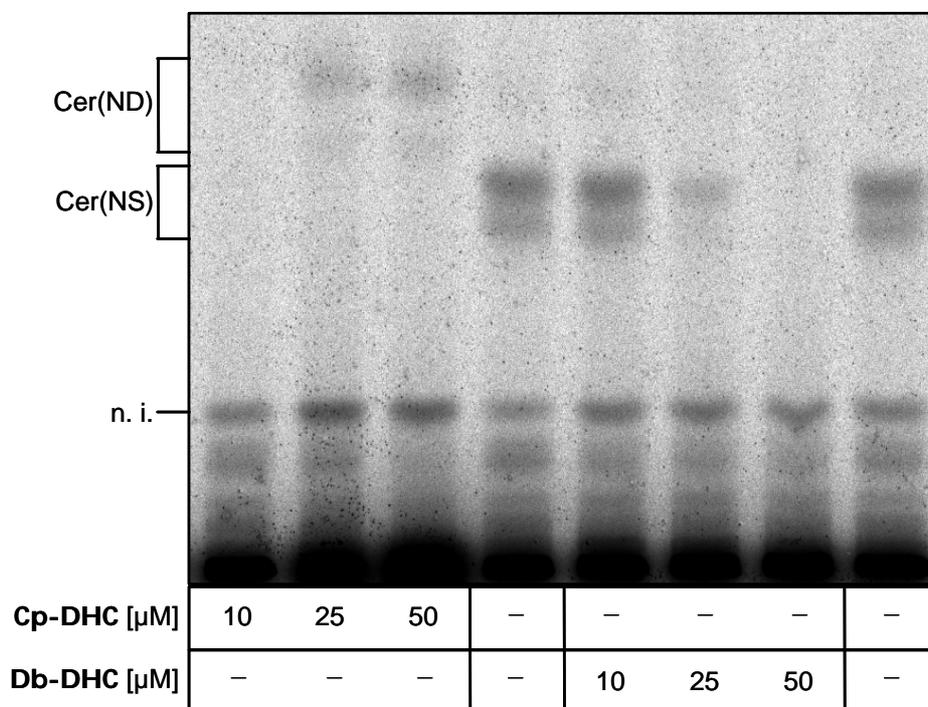
Bei Fibroblasten handelt es sich um Zellen des Bindegewebes der Haut (Lederhaut, Dermis), die hauptsächlich Ceramid(NS) (Cer(NS), zur Nomenklatur der Ceramide siehe Abb. 2.6) synthetisieren, das aus einer nicht-hydroxylierten Fettsäure und Sphingosin als Base besteht. Die in Keratinozyten vorkommenden Ceramide mit hydroxylierten Fettsäuren und Sphingoid-Basen werden in Fibroblasten nur in Spuren hergestellt. In Fibroblasten folgt auf Dihydroceramid (im Folgenden als „Cer(ND)“ bezeichnet) also biosynthetisch ein strukturell einheitlich aufgebautes Ceramid, so dass sich dieser Zelltyp für eine erste Untersuchung des Einflusses der Substratanaloga Cp-DHC und Db-DHC auf den durch die Dihydroceramid-Desaturase katalysierten Schritt anbot.

Zur Untersuchung der Wirkung der beiden Verbindungen auf die Biosynthese von Ceramid und der darauf aufbauenden Sphingolipide wurde eine metabolische Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin, dem radioaktiv markierten Ausgangsmolekül der Ceramid-Biosynthese, durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden humane Fibroblasten bis zur Konfluenz kultiviert und 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC vorinkubiert. Die metabolische Markierung mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin erfolgte anschließend in Gegenwart der gleichen Substanzkonzentrationen in Serindefizientem Medium über 48 h. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch getrennt. Abb 3.2 zeigt eine mit Natriumborat imprägnierte Kieselgelplatte, auf der sich Cer(ND) und Cer(NS) voneinander trennen lassen (Karlsson und Pascher, 1971). Die dabei auftretenden Doppelbanden sind auf die Acylierung der jeweiligen Sphingoidbase mit unterschiedlich langen Fettsäuren zurückzuführen. Bei Chromatographie an Kieselgel hat ein Lipid mit kürzerer Fettsäurekette aufgrund seiner höheren Polarität einen geringeren R<sub>F</sub>-Wert als sein langkettiges Analogon.

Unter den beschriebenen Bedingungen ließ sich in den unbehandelten Fibroblasten kein Cer(ND) nachweisen. Offensichtlich erfolgt die enzymatische Umwandlung von Cer(ND) in Cer(NS) so schnell, dass der Dihydroceramid-Pool in der Zelle klein bleibt. Unter Zusatz von Cp-DHC kam es jedoch zu einer Akkumulation von biosynthetisch markiertem Cer(ND). Während bei einer Konzentration von 10 µM Cp-DHC weiterhin kein markiertes Cer(ND) nachweisbar war, war bei 25 µM das Auftreten einer Cer(ND)-Bande zu erkennen (Abb. 3.2). Im Vergleich zu dieser Probe nahm der relative Anteil von Cer(ND) bei einer Cp-DHC-Konzentration von 50 µM zusätzlich um 20 % zu. Gleichzeitig führte Cp-DHC zu einer starken Abnahme der relativen Cer(NS)-Menge. Schon unter Zusatz von 10 µM Cp-DHC war dünnschichtchromatographisch kein Cer(NS) mehr nachzuweisen. Die Zunahme der relativen Cer(ND)-Menge bei gleichzeitiger Abnahme des Cer(NS)-Anteils deutet darauf hin, dass das Substratanalogon Cp-DHC eine mit steigender Konzentration zunehmende Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase in Fibroblasten bewirkt.

Dies gilt auch für das andere Analogon Db-DHC (Abb. 3.2), welches ebenfalls konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der Menge von biosynthetisiertem Cer(NS) führte. Der Effekt war jedoch nicht so stark wie bei Einsatz von Cp-DHC. Durch Zugabe von 10 µM Db-DHC reduzierte sich der Cer(NS)-Anteil auf 68 % der unbehandelten Kontrolle und bei 25 µM auf 24 %. Bei 50 µM war kein Cer(NS) mehr nachweisbar. Eine Zunahme der relativen Menge Cer(ND) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, weil weder in den Kontrollbahnen noch in den Proben,

denen Db-DHC zugesetzt worden war, Cer(ND) detektierbar war. Offensichtlich führt Db-DHC in Fibroblasten nicht zu einer nachweisbaren Akkumulation von Cer(ND). Möglicherweise wird es sehr schnell weiter zu Glucosylceramid bzw. Sphingomyelin mit gesättigter Sphingoidbase umgesetzt, wie es in humanen differenzierten Keratinozyten nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.1.2.2).



**Abb. 3.2 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC und Db-DHC auf den Einbau von  $[3-^{14}\text{C}]$ -Serin in Cer(ND) und Cer(NS) in humanen Fibroblasten**

Humane Fibroblasten wurden in DMEM-Medium mit 10 % Fötalem Kälberserum (FKS) bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen 24 h mit 10, 25 und 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC bzw. Db-DHC in DMEM-Medium mit 0.3 % FKS vorinkubiert und nachfolgend 48 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC mit  $[3-^{14}\text{C}]$ -Serin metabolisch markiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt (Borat-impregnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (v/v)) und mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert und quantifiziert. Die Identifizierung der Banden erfolgte über Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen. Zum Vergleich wurde auf alle Bahnen die gleiche Radioaktivitätsmenge aufgetragen. Für die Quantifizierung wurde die Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Die mit „n.i.“ (= nicht identifiziert) gekennzeichnete Bande kann einer im Markierungsreagenz  $L-[3-^{14}\text{C}]$ -Serin enthaltenen Verunreinigung zugeordnet werden. (Cer = Ceramid)

Bei der metabolischen Markierung mit  $L-[3-^{14}\text{C}]$ -Serin zeigte sich unter dem Einfluss der beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase jedoch nicht nur eine Reduzierung der relativen Cer(NS)-Menge, sondern auch der biosynthetisch auf Ceramid folgenden Sphingolipide Glucosylceramid und Sphingomyelin (ohne Abbildung). So führte Cp-DHC bereits in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer Erniedrigung der relativen Menge von Glucosylceramid auf 12 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Db-DHC bewirkte in der gleichen Konzentration keine nennenswerte Abnahme des Einbaus von  $L-[3-^{14}\text{C}]$ -Serin in Glucosylceramid, senkte ihn in

höheren Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  jedoch ebenfalls auf 30 bzw. 17 %. Ähnliches gilt für die über Biosynthese gebildete Menge von Sphingomyelin, die unter Einfluss von 10  $\mu\text{M}$  Cp-DHC um mehr als 90 % im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt wurde. Verbindung Db-DHC bewirkte in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Abnahme des  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Serin-Einbaus in Sphingomyelin um 50 %, während sie ihn in höheren Konzentrationen auf rund 25 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle senkte.

Ähnliche Befunde lieferte die metabolische Markierung primärer Kleinhirnneuronen von Mäusen mit  $L\text{-}[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Serin in Gegenwart der beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase. Auch in diesem Zelltyp führten Cp-DHC und Db-DHC zu einer Abnahme der relativen Menge der in der Biosynthese auf Ceramid folgenden Sphingolipide, wobei sich auch hier der Effekt mit steigenden Konzentrationen verstärkte (Abb. 3.3). So führten beide Verbindungen bereits in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einer Abnahme der Sphingomyelin-Menge um rund 40 %, bei Zugabe von 25  $\mu\text{M}$  reduzierten beide Substanzen den Sphingomyelin-Anteil auf etwa die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Während der relative Anteil von Glucosylceramid unter dem Einfluss der beiden Analoga in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  nur leicht herabgesetzt wurde, rief besonders Db-DHC in einer höheren Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  eine starke Erniedrigung der Glucosylceramid-Menge um fast 90 % hervor. Diesen Beobachtungen entsprechend reduzierte sich auch die Menge des auf Glucosylceramid aufbauenden Laktosylceramids und der Ganglioside, insbesondere der in Nervenzellen am häufigsten vorkommenden Verbindungen GD1a und GT1b. Deren Anteile waren in Gegenwart beider Analoga in Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  gegenüber der Kontrolle um etwa die Hälfte reduziert.

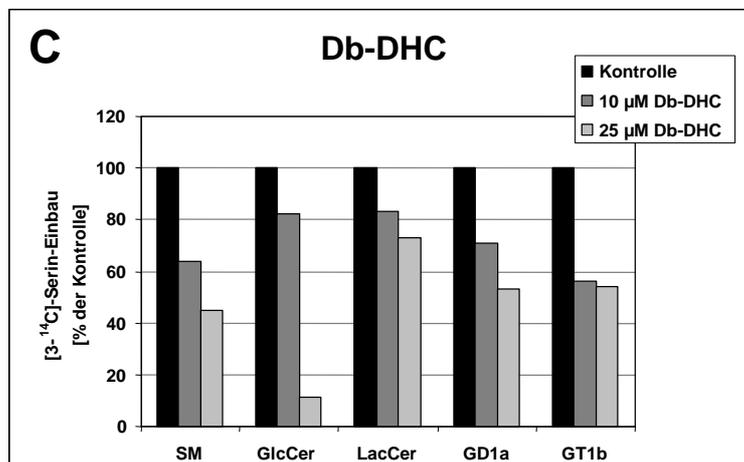
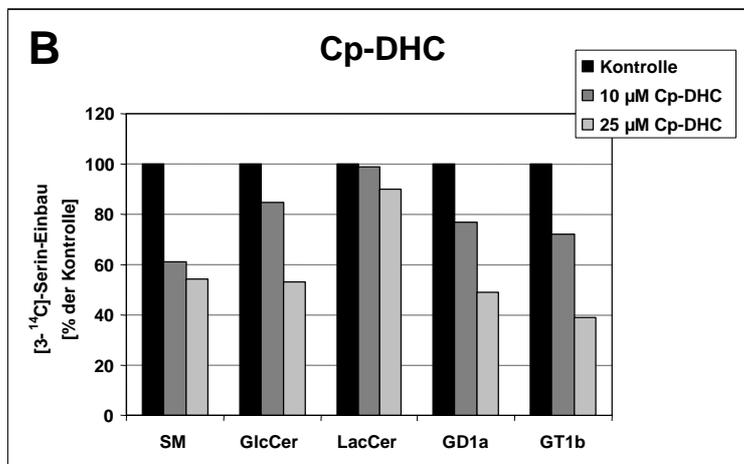
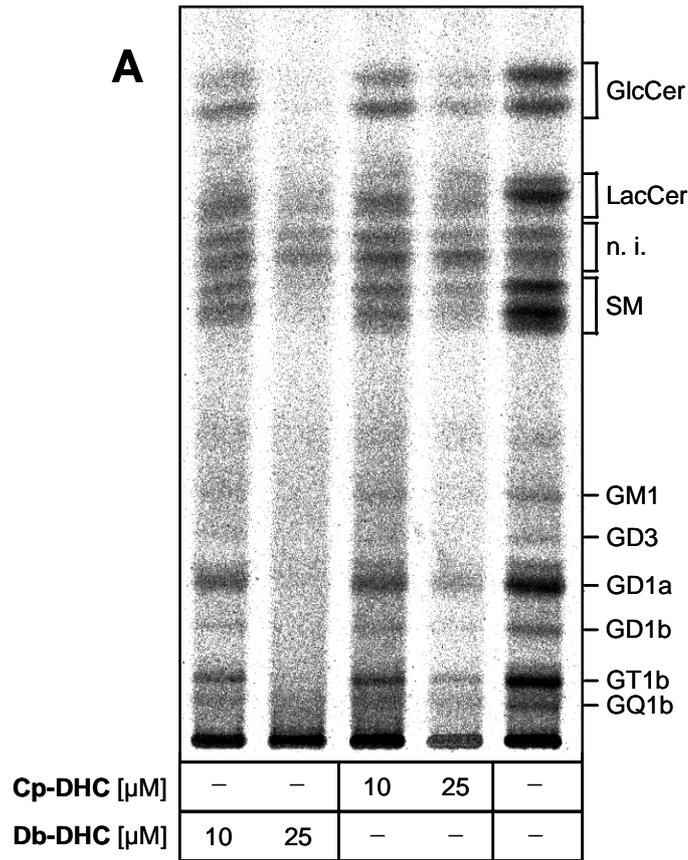
---

→

**Abb. 3.3 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC (A, B) bzw. Db-DHC (A, C) auf den Einbau von  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Serin in Sphingolipide muriner Kleinhirnneuronen**

Primäre Kleinhirnneuronen von Mäusen wurden nach der Aussaat zunächst 24 h kultiviert, dann wurde ihre Zellteilung durch Zusatz von 1 % Cytosinarabinsid ins Medium unterbunden. Nach fünf Tagen Differenzierung wurden die Zellen 24 h mit 10 bzw. 25  $\mu\text{M}$  Cp-DHC bzw. Db-DHC vorinkubiert und nachfolgend 24 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC mit  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Serin metabolisch markiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und die Phospholipide durch alkalische Hydrolyse abgetrennt. Die Sphingolipide wurden dünnschichtchromatographisch getrennt (Laufmittel: Chloroform/Methanol/0.22 % Calciumchlorid in Wasser 60:35:8 (v/v/v)) mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert (**A**) und quantifiziert. Die Identifizierung der Banden erfolgte über Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen. Auf alle Bahnen wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Für die Quantifizierung (n=1) wurde die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. **B**: Cp-DHC, **C**: Db-DHC.

(GlcCer = Glucosylceramid, LacCer = Laktosylceramid, SM = Sphingomyelin, n. i. = nicht identifiziert)

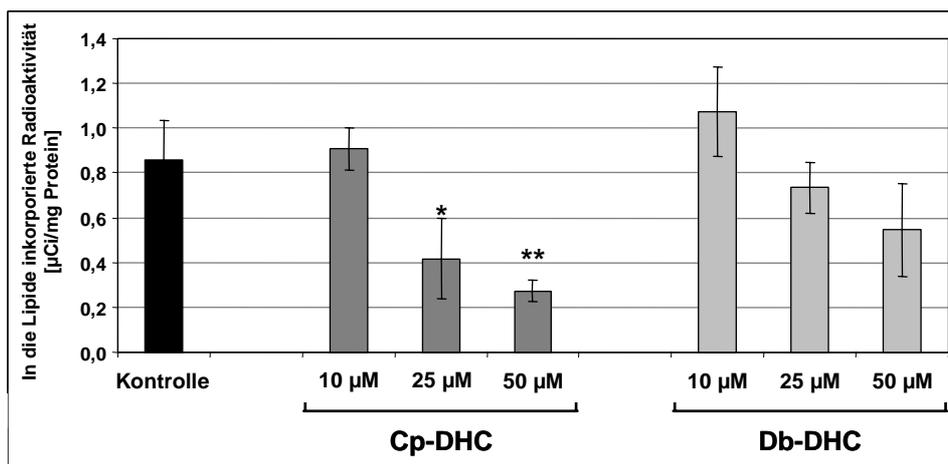


Die mit „n. i.“ gekennzeichnete Bande wurde schon häufiger bei metabolischen Markierungen muriner Kleinhirnneuronen mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin beobachtet (Kolter, 2002). Es handelt sich hierbei um ein neutrales Lipid (J. Wirtz, persönliche Mitteilung), dessen R<sub>f</sub>-Wert auf Globotriaosylceramid hinweist. Dieses könnte möglicherweise aus einer Kontamination mit Fibroblasten während der Präparation der Neuronen stammen.

### 3.1.2 Metabolische Markierungsstudien in humanen Keratinozyten unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC

#### 3.1.2.1 Metabolische Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin

Der Einfluss der beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf den Sphingolipidstoffwechsel sollte nun in humanen Keratinozyten, die im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen eine Gruppe strukturell sehr vielfältiger Ceramide, Glucosylceramide und Sphingomyeline bilden (Holleran *et al.*, 2006), untersucht werden. Wie schon in Fibroblasten und Neuronen wurde dazu zunächst eine metabolische Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin, dem radioaktiv markierten Ausgangsmolekül der Sphingolipidbiosynthese, durchgeführt. In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass konfluente humane Keratinozyten durch Erhöhung der Calciumchlorid-Konzentration im Medium von 0.1 mM (*low Ca<sup>2+</sup>*-Medium) auf 1.1 mM in Kombination mit einem Zusatz von 10 µM Linolsäure (*high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium) zur Differenzierung angeregt werden und alle komplexen Ceramide und Glucosylceramide synthetisieren, die im *stratum corneum* der Epidermis vorkommen (Döring, 1999). Dieses Zellkulturmodell differenzierter Keratinozyten wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet.



**Abb. 3.4 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC und Db-DHC auf die in die Lipide inkorporierte Radioaktivität bei metabolischer Markierung humaner differenzierter Keratinozyten mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin**

Humane Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium zur Differenzierung angeregt. Dann wurden die Zellen 24 h mit 10 bzw. 50 µM Cp-DHC bzw. Db-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium vorinkubiert und nachfolgend 72 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und die in sie inkorporierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die gezeigten Daten (Mittelwerte ± SD, n=4) sind auf gleiche Proteinmengen normiert. Mittelwerte mit statistischer Signifikanz sind mit Sternchen gekennzeichnet (ungepaarter zweiseitiger t-Test, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.001)

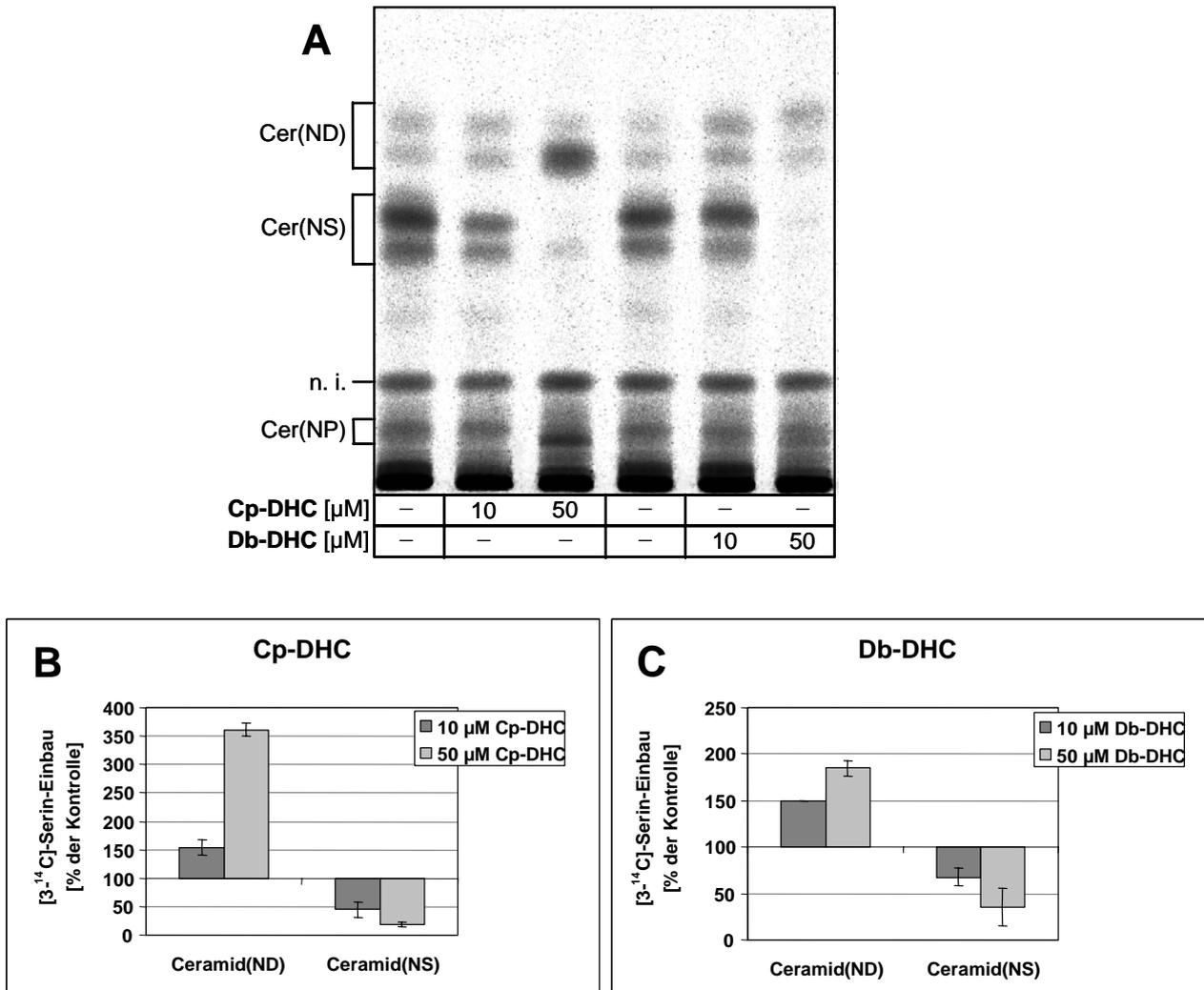
Zur Untersuchung der beiden Dihydroceramid-Analoga wurden humane Keratinozyten zunächst in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium

zur Differenzierung angeregt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium erfolgte die metabolische Markierung mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin in Gegenwart der gleichen Substanzkonzentrationen in Serindefizientem Medium über 72 h. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und die in sie inkorporierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung ermittelt.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle veränderte sich die über [3-<sup>14</sup>C]-Serin in die Gesamtmenge der Lipide inkorporierte Radioaktivität pro Proteinmenge unter dem Einfluss der beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC (Abb. 3.4). Während die eingebaute Radioaktivitätsmenge bei Konzentrationen von 10 µM beider Verbindungen gegenüber der Kontrolle noch leicht erhöht war, nahm sie in Gegenwart steigender Konzentrationen ab. Dieser Effekt zeigte sich bei Einsatz von Cp-DHC wesentlich stärker als bei Db-DHC. Während in Gegenwart von 25 µM Db-DHC noch 85 % der Radioaktivitätsmenge der Kontrolle in die Lipide inkorporiert wurde, führte Cp-DHC in der gleichen Konzentration zu einer Reduzierung des Einbaus um die Hälfte. Bei Zugabe von 50 µM Cp-DHC wurde schließlich nur noch ein Drittel so viel Radioaktivität in die Lipide eingebaut wie in den Kontrollzellen. Der Grund für den unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC konzentrationsabhängig abnehmenden Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in die Gesamtmenge der Lipide könnte in einer zusätzlichen Hemmung der Serin-Palmitoyltransferase liegen.

Wie schon bei der Untersuchung in Fibroblasten wurden auch die Lipide der differenzierten Keratinozyten auf einer mit Natriumborat imprägnierten Kieselgelplatte dünnenschichtchromatographisch getrennt (Abb. 3.5 A). Auch hier ließ sich eine mit der Konzentration beider Dihydroceramid-Analoga zunehmende Menge von biosynthetisiertem Cer(ND) bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils von Cer(NS) feststellen, was darauf hindeutet, dass beide Verbindungen auch in humanen differenzierten Keratinozyten eine Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase bewirken. Außerdem war der Effekt wiederum für Cp-DHC stärker als für Db-DHC ausgeprägt. Zwar riefen beide Verbindungen in Konzentrationen von 10 µM eine 1.5-fache Zunahme der relativen Menge von Cer(ND) gegenüber der unbehandelten Kontrolle hervor, jedoch ließ sich der Cer(ND)-Anteil durch Erhöhung der Cp-DHC-Konzentration auf 50 µM weiter auf das 3.6-Fache der Kontrolle steigern (Abb. 3.5 B), während Db-DHC in der gleichen Konzentration lediglich zum 1.8-Fachen des Kontrollwertes führte (Abb. 3.5 C). Entsprechend fiel auch die Wirkung von Db-DHC auf die Biosynthese von Cer(NS) geringer aus als diejenige von Cp-DHC. 10 µM Cp-DHC reduzierte den Anteil von Cer(NS) um mehr als die Hälfte gegenüber der Kontrolle, wogegen er von Db-DHC in der gleichen Konzentration nur um ein Drittel erniedrigt wurde. Bei Einsatz von 50 µM beider Verbindungen senkte Db-DHC die Cer(NS)-Menge auf ein Drittel der Kontrolle, während Cp-DHC eine Erniedrigung auf 18 % des Kontrollwertes hervorrief. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass die Zunahme des Cer(ND)-Anteils in der Probe mit 50 µM Cp-DHC fast ausschließlich in einer Verstärkung der Unteren der Doppelbande von Cer(ND) begründet ist (Abb. 3.5 A). Dieser Effekt wurde in Fibroblasten nicht beobachtet. Offensichtlich wirkt sich der Einfluss von Cp-DHC in differenzierten Keratinozyten hauptsächlich auf Dihydroceramide mit kurzkettigen Fettsäuren aus, während die Dihydroceramide, die mit den für Keratinozyten spezifischen langkettigen Fettsäuren acyliert sind, nahezu unbeeinflusst bleiben.

---



**Abb. 3.5 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC (A, B) bzw. Db-DHC (A, C) auf den Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in Cer(ND) und Cer(NS) in humanen differenzierten Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium zur Differenzierung angeregt. Dann wurden die Zellen 24 h mit 10 bzw. 50 μM Cp-DHC bzw. Db-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium vorinkubiert und nachfolgend 72 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt (Borat-impregnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (v/v)) und mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert (**A**) und quantifiziert. Die Identifizierung der Banden erfolgte über Vergleich mit authentischen Standardsubstanzen. Zum Vergleich wurde auf alle Bahnen die gleiche Radioaktivitätsmenge aufgetragen. Für die Quantifizierung (Mittelwerte ± SEM, n=2) wurde die Kontrolle gleich 100 % gesetzt. **B**: Cp-DHC, **C**: Db-DHC.

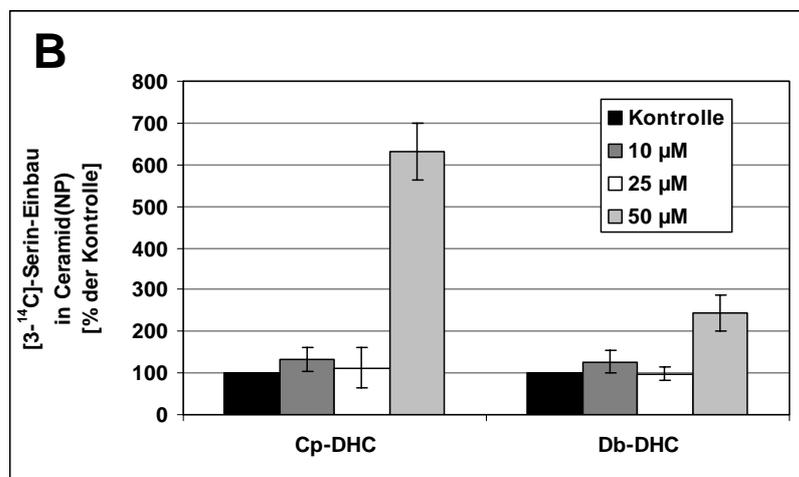
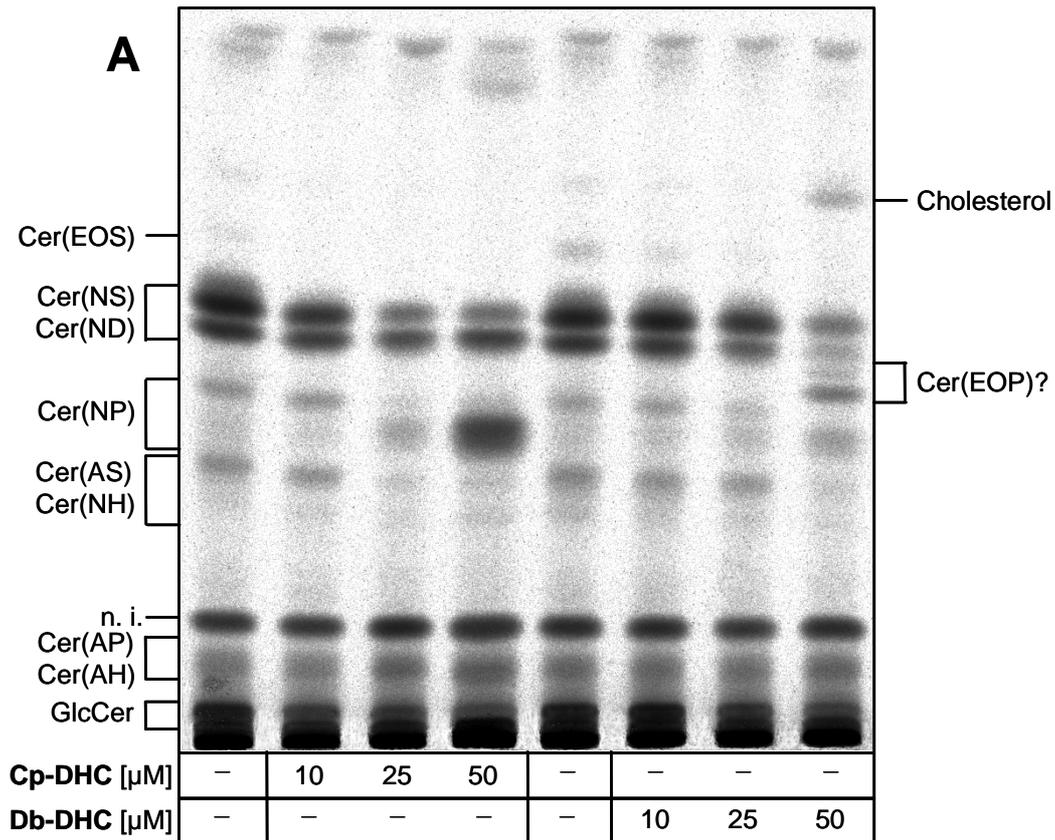
Die mit „n.i.“ (= nicht identifiziert) gekennzeichnete Bande kann einer im Markierungsreagenz L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin enthaltenen Verunreinigung zugeordnet werden.

(Cer = Ceramid)

Zusätzlich zu den beschriebenen Effekten ist in Abb. 3.5 A bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC eine Verstärkung der Bande von Cer(NP) (Phytoceramid) zu erkennen. Cer(NP) enthält im Unterschied zu Cer(NS) die in Position 4 hydroxylierte Sphingoidbase Phytosphingosin (Kap. 2.4.2). Zur Untersuchung der Wirkung der beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf die Biosynthese der strukturell unterschiedlichen Ceramide differenzierter Keratinozyten, insbesondere auf die von Cer(NP), wurden die mit  $[3\text{-}^{14}\text{C}]$ -Serin metabolisch markierten Lipide in einem zur Separierung der einzelnen Ceramide geeigneten Laufmittel dünn-schichtchromatographisch getrennt (Abb. 3.6 A). In diesem Laufmittel haben Cer(ND) und Cer(NS) den gleichen  $R_f$ -Wert, so dass die Gesamtmenge dieser beiden Verbindungen in einer gemeinsamen Doppelbande erscheint. Ebenso bilden Cer(AS) und Cer(NH) sowie Cer(AP) und Cer(AH) aufgrund ihrer ähnlichen Polarität gemeinsame Doppelbanden.

Am auffälligsten ist die bereits auf der mit Borat imprägnierten DC-Platte detektierte Erhöhung der Cer(NP)-Menge, die durch Zusatz beider Dihydroceramid-Analoga vor allem in höheren Konzentrationen hervorgerufen wurde (Abb. 3.6 A). Während sich die Cer(NP)-Anteile bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  Cp-DHC bzw. Db-DHC nur gering von denjenigen der unbehandelten Kontrolle unterschieden, führte 50  $\mu\text{M}$  Db-DHC zu einer 2.5-fachen Steigerung der Cer(NP)-Menge des Kontrollwertes, während Cp-DHC in der gleichen Konzentration sogar eine 6.5-fache Erhöhung bewirkte (Abb. 3.6 B). Bei genauerer Betrachtung der chromatographischen Trennung (Abb. 3.6 A) fällt jedoch auf, dass die beschriebenen Effekte hauptsächlich die Untere der Cer(NP)-Doppelbande betreffen. Wie schon für Cer(ND) (Abb. 3.5 A) beobachtet, bewirkten die beiden Analoga also eine Zunahme derjenigen Cer(NP)-Anteile, die mit kurzkettigen Fettsäuren acyliert sind, während die langkettigen Cer(NP)-Spezies mengenmäßig konstant blieben bzw. sogar erniedrigt wurden. Frühere massenspektrometrische Untersuchungen der Cer(NP)-Doppelbande hatten gezeigt, dass die Cer(NP)-Spezies der unteren Bande mit C16-, C18-Fettsäuren acyliert sind, während die obere Bande hauptsächlich C26-Cer(NP) enthält (B. Breiden, persönliche Mitteilung).

Bemerkenswert ist das Auftreten einer in der Kontrolle nicht enthaltenen Doppelbande unterhalb von Cer(NS) bei Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Db-DHC. Der  $R_f$ -Wert dieser Bande weist auf Cer(EOP) hin, das wie Cer(NP) Phytosphingosin als Sphingoidbase enthält. Ob es sich bei dieser Bande tatsächlich um Cer(EOP) handelt und warum sie nicht auch in Gegenwart von Cp-DHC zu sehen ist, bleibt noch zu klären. Jedoch könnte ihr Auftreten ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Phytosphingosin enthaltende Ceramide in Gegenwart der untersuchten Verbindungen vermehrt gebildet werden.



**Abb. 3.6 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC bzw. Db-DHC auf den Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in die frei extrahierbaren Ceramide humaner differenzierter Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.5 beschrieben kultiviert und in Gegenwart von 10, 25 und 50 µM Cp-DHC bzw. Db-DHC metabolisch markiert. Die dünnstschichtchromatographische Auftrennung (**A**) erfolgte durch zweimalige Entwicklung in Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v). Die Ergebnisse der Quantifizierung des Cer(NP)-Anteils (Mittelwerte ± SEM, n=2) sind in **B** dargestellt.

Die mit „n.i.“ (= nicht identifiziert) gekennzeichnete Bande kann einer im Markierungsreagenz L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin enthaltenen Verunreinigung zugeordnet werden.

(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid)

Abb. 3.7 zeigt die dünnschichtchromatographische Trennung der mit [3-<sup>14</sup>C]-Serin metabolisch markierten Glucosylceramide und Sphingomyeline in humanen differenzierten Keratinozyten unter Einfluss der beiden zu untersuchenden Dihydroceramid-Analoga. Wie bereits in humanen Fibroblasten und Kleinhirnneuronen von Mäusen beobachtet, nahm die relative Sphingomyelin-Menge mit steigenden Konzentrationen beider Verbindungen ab. 10 µM Cp-DHC reduzierte den Sphingomyelin-Anteil auf 33 % der unbehandelten Kontrolle, 50 µM der gleichen Verbindung führten allerdings nicht zu einer Steigerung des Effekts. Die Wirkung von Db-DHC lag in der gleichen Größenordnung wie die von Cp-DHC.

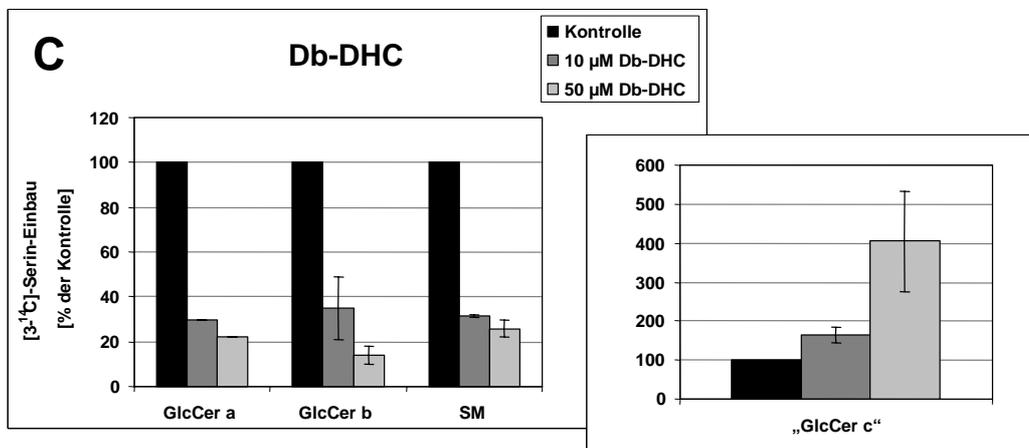
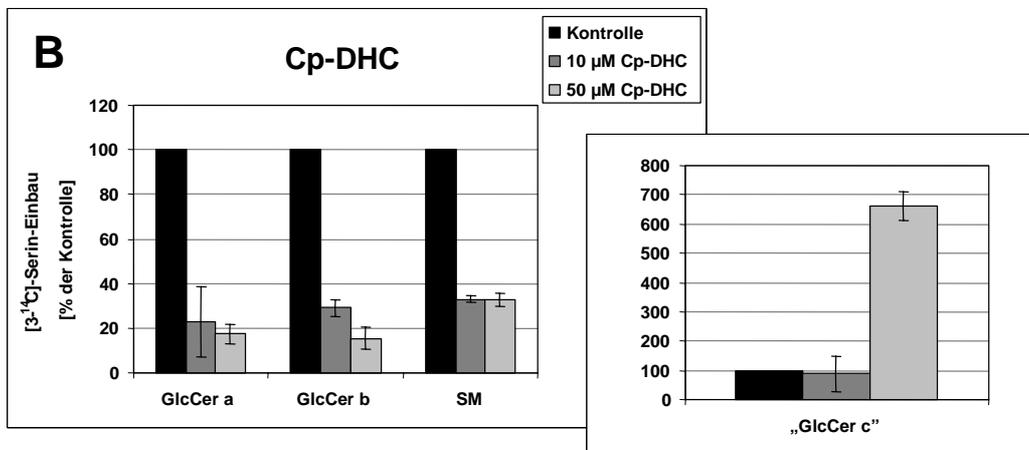
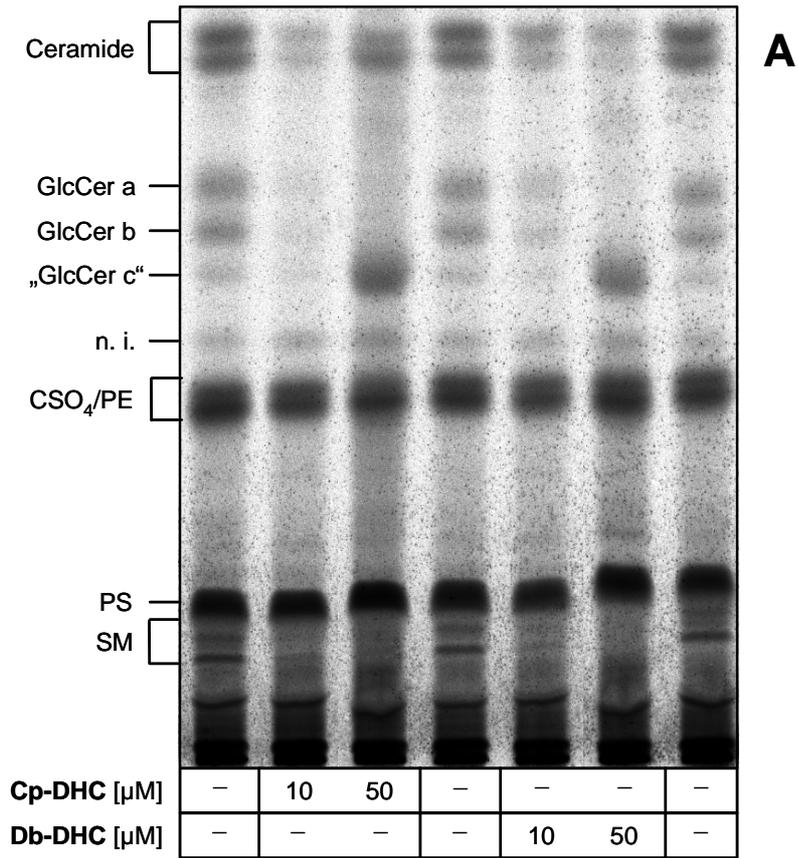
Der Einfluss der beiden Dihydroceramid-Analoga auf die strukturell unterschiedlichen Glucosylceramide humaner differenzierter Keratinozyten ist unterschiedlich (Abb. 3.7). Grundsätzlich spalten sich die Glucosylceramide in dem verwendeten Laufmittelsystem in zwei starke und eine schwache Banden auf, die als „GlcCer a“, „GlcCer b“ und „GlcCer c“ gekennzeichnet werden. Frühere massenspektrometrische Analysen haben gezeigt, dass diese Banden Mischungen strukturell unterschiedlicher Glucosylceramide repräsentieren (Doering *et al.*, 1999). So handelt es sich bei GlcCer a/b um eine komplexe Mischung aus GlcCer(NS), GlcCer(NP) und GlcCer(C24,26-AS). Die GlcCer c-Bande enthält hauptsächlich mit Palmitinsäure acyliertes GlcCer(AS). In Gegenwart der beiden zu untersuchenden Substanzen zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine starke Reduzierung der biosynthetisch gebildeten Mengen von GlcCer a und b. Beide Verbindungen führten in Konzentrationen von 50 µM zu einer Erniedrigung der relativen Anteile von GlcCer a und GlcCer b um mehr als 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen in humanen Fibroblasten und murinen Kleinhirnneuronen. Allerdings bewirkten beide Substanzen in höherer Konzentration gleichzeitig die Verstärkung einer Bande, deren R<sub>F</sub>-Wert dem der GlcCer c-Fraktion in den Kontrollproben entspricht („GlcCer c“ in Abb. 3.7 A). Während 50 µM Db-DHC eine 4-fache Erhöhung des Kontrollwertes hervorrief (Abb. 3.7 C), führte Cp-DHC in der gleichen Konzentration sogar zu einer 6.6-fachen Steigerung des mutmaßlichen „GlcCer c“-Anteils (Abb. 3.7 B). Das Auftreten bzw. die Verstärkung dieser Bande wurde bereits mehrfach bei [<sup>14</sup>C]-Serin-Markierungen humaner differenzierter Keratinozyten, die durch unterschiedliche äußere Einflüsse unter Stress gesetzt worden waren, beobachtet. So konnte in humanen Keratinozyten, die 7 Tage in *high Ca*<sup>2+</sup>/*LA*-Medium zur Differenzierung angeregt und anschließend drei Tage in auf pH 5.5 angesäuerten Medium weiter kultiviert worden waren, eine Verstärkung um das Zehnfache bei gleichzeitiger Erhöhung der Gesamtmenge an Ceramiden beobachtet werden (Breiden *et al.*, 2007). Ebenso wurde in Keratinozyten, die mit Beginn des *Ca*<sup>2+</sup>/*LA*-Shifts mit 0.2 mM S-Nitroso-

→

**Abb. 3.7 Einfluss verschiedener Konzentrationen Cp-DHC (A, B) bzw. Db-DHC (A, C) auf den Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in die Glucosylceramide und Sphingomyeline humaner differenzierter Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.5 beschrieben kultiviert und in Gegenwart von 10 bzw. 50 µM Cp-DHC bzw. Db-DHC metabolisch markiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (A) erfolgte durch Entwicklung in Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5 (v/v/v). Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte ± SD, n=3) sind in B (Cp-DHC) und C (Db-DHC) dargestellt.

(n. i. = nicht identifiziert, GlcCer = Glucosylceramid, CSO<sub>4</sub> = Cholesterolsulfat, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin, SM = Sphingomyelin)

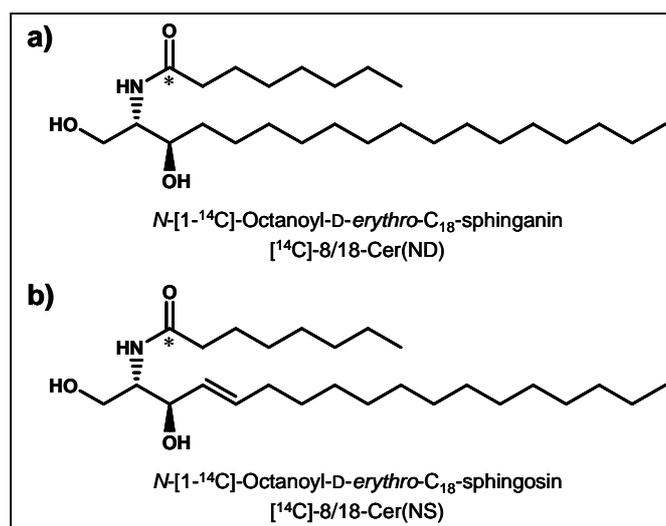


-*N*-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP), das als Stickstoffmonoxid-Donor dient, inkubiert wurden, nach 6 Tagen eine Verstärkung der gleichen Bande beobachtet (H. Gallala, persönliche Mitteilung). Da die betreffende Bande jedoch in einigen Dünnschichtchromatogrammen ein von GlcCer c geringfügig abweichendes Laufverhalten zeigte und massenspektrometrische Identifizierungsversuche aufgrund zu geringer Probenmengen bisher erfolglos blieben, ist die Identität der Bande noch nicht eindeutig geklärt.

Aus Abb 3.7 A ist außerdem ersichtlich, dass die relativen Mengen von Cholesterolsulfat, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin bei Zusatz der beiden Dihydroceramid-Analoga nahezu konstant im Vergleich zur Kontrolle bleiben. Auf die Biosynthese der Phospholipide und des Cholesterols haben Cp-DHC und Db-DHC also offensichtlich keinen Einfluss. Ihre Wirkung beschränkt sich damit auf Dihydroceramid bzw. die Ceramide und die auf sie biosynthetisch folgenden Sphingolipide.

### 3.1.2.2 Metabolische Markierung mit *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoylsphinganin und *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoylsphingosin

Das Dihydroceramid-Analogon Cp-DHC hatte sich in den vorhergehenden Untersuchungen im Vergleich zu Db-DHC als wirksamer erwiesen. Mit dem Ziel, einen genaueren Einblick in den Einfluss von Cp-DHC auf die von der Dihydroceramid-4-Desaturase und der 4-Hydroxylase katalysierten Schritte zu gewinnen, wurden metabolische Markierungsexperimente mit dem radiomarkierten Substrat bzw. Produkt der Desaturase-Reaktion an humanen Keratinozyten durchgeführt. Als Markierungsreagenzien dienten zu diesem Zweck *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphinganin ([<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND)) und *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphingosin ([<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS)) (Abb. 3.8).



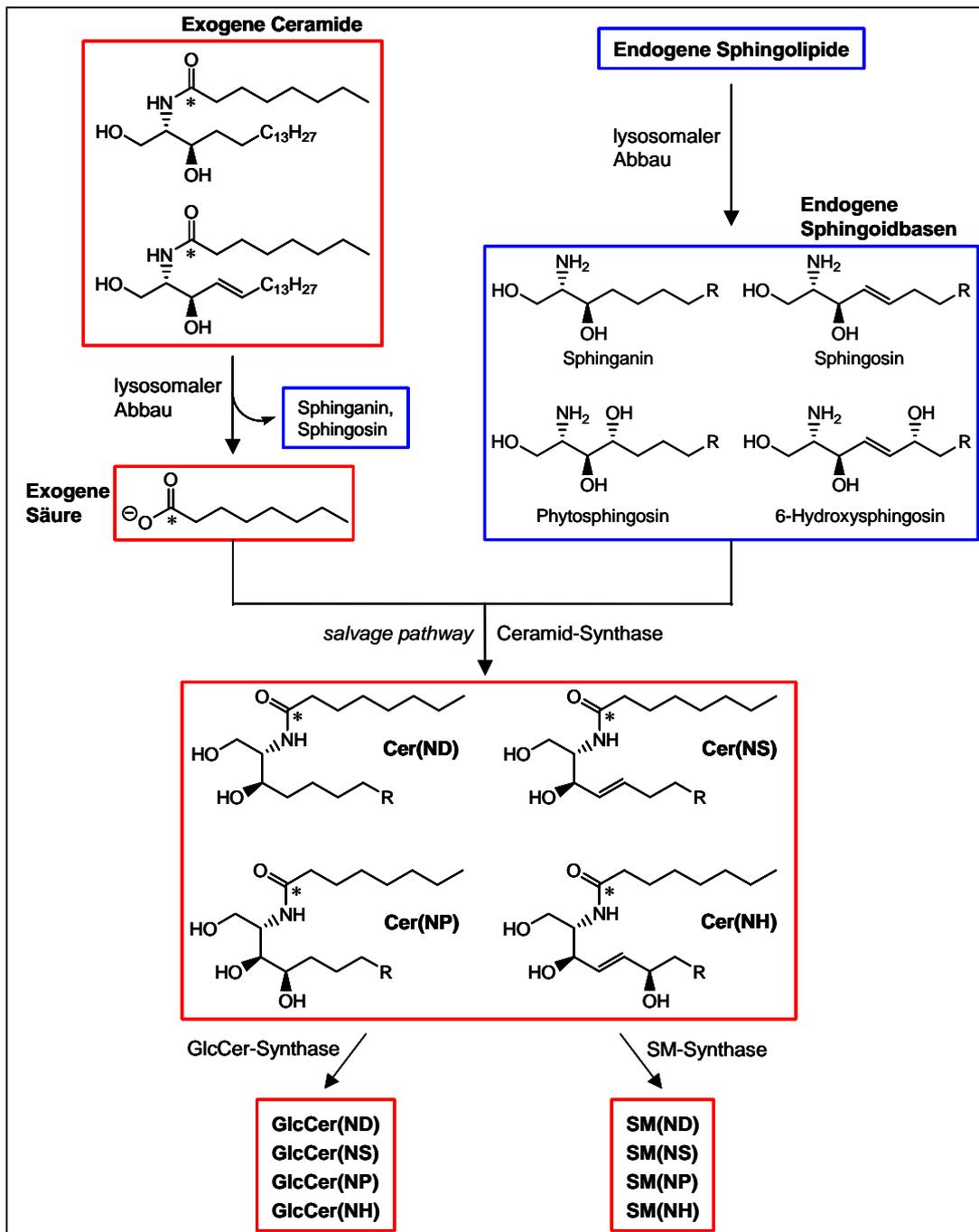
**Abb. 3.8** Strukturen der zur metabolischen Markierung humaner Keratinozyten eingesetzten radiomarkierten Verbindungen a) [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) und b) [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS)

Die beiden Markierungsreagenzien wurden ausgehend von Sphinganin bzw. Sphingosin und dem Natriumsalz der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure synthetisiert. Dabei wurden [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) und [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) in einer Reinheit von 95.4 % bzw. 98.4 % erhalten.

Zur Acylierung wurde Oktansäure gewählt, um die Wasserlöslichkeit und damit die Zellgängigkeit der Markierungsreagenzien gegenüber den natürlich vorkommenden langkettigen Ceramiden zu erhöhen. Kurzkettige Sphingolipid-Analoga zeigen wesentlich höhere Austauschraten als die entsprechenden endogenen Lipide und damit auch höhere Diffusionsraten innerhalb der wässrigen Phase zwischen benachbarten Membranen. Mit Fettsäure-freiem Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) bilden sie 1:1-Komplexe aus, aus denen sie aufgrund ihrer verkürzten Acylkette leicht abdissoziieren und schnell in die Plasmamembran inserieren können. Die inserierten Analoga verhalten sich anschließend wie die endogenen Sphingolipide, d. h. sie werden über Endozytose in die Zelle aufgenommen, zu den Endosomen und Lysosomen transportiert und dort als Bestandteile intralysosomaler Vesikel abgebaut (Schwarzmann, 2001).

Es ist also zu erwarten, dass auch die Markierungsreagenzien [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) und [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) nach endozytotischer Aufnahme ins Lysosom gelangen und dort in [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure und nicht radiomarkiertes Sphinganin bzw. Sphingosin gespalten werden. Sowohl die Säure als auch die jeweilige Sphingoidbase können dann im *salvage pathway* (Kap. 2.7) zum Aufbau neuer Sphingolipide wiederverwendet werden. Beim Recycling der [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure werden unter Katalyse verschiedener Ceramid-Synthasen endogene Sphingoidbasen acyliert und dadurch mit einer Radiomarkierung versehen. Die so gebildeten radiomarkierten Ceramide, die aus [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure und unterschiedlichen endogenen Sphingoidbasen (Sphinganin, Sphingosin, Phytosphingosin, 6-Hydroxysphingosin) aufgebaut sind, können dann weiterhin zu den entsprechenden radioaktiv markierten Glucosylceramiden und Sphingomyelinen umgesetzt werden (Abb. 3.9). Aus der endozytotischen Aufnahme der beiden Markierungsreagenzien folgt damit jedoch, dass z. B. bei Markierungen mit [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) radiomarkiertes Cer(NS) und Cer(NP) sowie die entsprechenden Glucosylceramide und Sphingomyeline gebildet werden können, ohne dass dazu zwingend der Weg über die Desaturierung bzw. die Hydroxylierung von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) beschränkt werden muss (Abb. 3.9). Eine Interpretation der Daten zum Einfluss von Cp-DHC auf die von der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. der 4-Hydroxylase katalysierten Schritte ist damit erschwert. Die Radiomarkierung dennoch in den Acylteil statt in die Sphingoidbase zu setzen, hat den Vorteil, dass bei dünnschichtchromatographischer Trennung und Phosphoimager-Analyse der radiomarkierten Lipide nur die mit [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure acylierten Ceramide, Glucosylceramide und Sphingomyeline detektiert werden. Dadurch kommt es nicht zum Auftreten von Doppelbanden wie bei Markierungen mit L-[ $3\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Serin. So sollte sich auch GlcCer bzw. SM mit Sphingosin-Rückgrat von GlcCer und SM mit gesättigter Sphingoidbase trennen lassen. Zwar ist auch ein Abbau der freigesetzten [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure zu radiomarkiertem Acetyl-CoA, das anschließend zur Biosynthese radiomarkierter endogener langkettiger Fettsäuren genutzt werden kann, denkbar, jedoch wurde dies bei ähnlichen Experimenten, bei denen Zellen 24 h mit *N*-[ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Hexanoyl-sphingosin markiert wurden, nicht beobachtet (Ogretmen *et al.*, 2002). Offensichtlich erfordert dieser Weg der Fettsäureverwertung längere Inkubationszeiten. Eine Radiomarkierung und Detektion von mit endogenen Fettsäuren acylierten Sphingolipiden kann daher bei Inkubationszeiten von maximal 24 h ausgeschlossen werden.

Für die Markierungen mit [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) und [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) wurden zunächst Versuchsbedingungen entwickelt, unter denen die oben erläuterte Reacylierung endogener Sphingoidbasen mit im Lysosom freigesetzter [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-Oktansäure unterdrückt werden sollte.



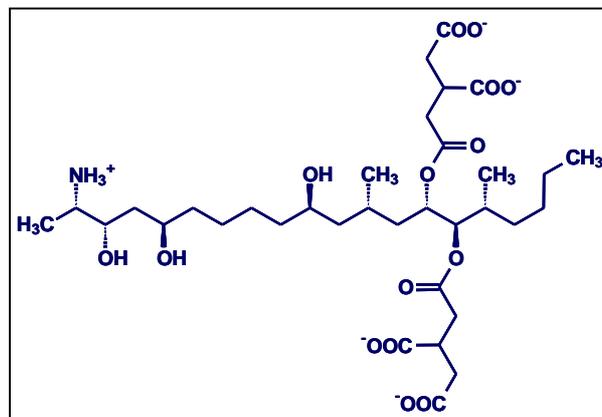
**Abb. 3.9** Metabolischer Weg der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure nach ihrer Freisetzung aus den Markierungsreagenzien *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoylsphinganine und *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoylsphingosin in den Lysosomen humaner Keratinozyten  
Die rot eingerahmten Verbindungen tragen eine Radiomarkierung, die blau eingerahmten Verbindungen sind nicht radiomarkiert.  
(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, SM = Sphingomyelin)

Eine Möglichkeit dazu besteht darin, die endozytotische Aufnahme der Markierungsreagenzien von vorneherein zu blockieren. In die äußere Hälfte der Plasmamembran inserierte kurzkettige Ceramid-Analoga sind auch im Falle einer Blockierung ihrer endozytotische Aufnahme in die Zelle in der Lage, durch transversale Diffusion (*flip-flop*) auf die zytosolische Seite zu gelangen und sich von dort aus durch Diffusion in der Zelle zu bewegen. Mit einem kurzkettigen Ceramid-Analogon,

das mit einer fluoreszierenden 5,7-Dimethyl-BODIPY-(Borondipyrromethen-difluorid-)Pentansäure acyliert wurde, zeigte sich, dass die Halbwertszeit des *flip-flop* 20 Minuten beträgt und die des Transfers zwischen benachbarten Membranen 10 Minuten (Bai und Pagano, 1997). Endozytose und vesikulärer Transport lassen sich durch Erniedrigung der Temperatur auf 4 bis 10 °C blockieren. Ebenso ist bei diesen Temperaturen nahezu keine Insertion langkettiger GSL in die Plasmamembran mehr zu beobachten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass kurzkettige Analoga im Gegensatz zu den endogenen GSL auch unter Temperaturblock der Endozytose bei 4 °C mit hoher Geschwindigkeit in die Plasmamembran inserieren können (Schwarzmann *et al.*, 1995).

Die Markierungsexperimente an humanen Keratinozyten unter Temperaturblock der Endozytose werden in Kap. 3.1.2.2.1 beschrieben.

Statt die endozytotische Aufnahme der Markierungsreagenzien zu unterbinden, besteht eine zweite Möglichkeit zur Vermeidung der Wiederverwertung der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure in der Hemmung der Sphinganin-*N*-Acyltransferasen (Ceramid-Synthasen), die die Acylierung der Sphingoidbasen katalysieren. Als Inhibitor der Sphinganin-*N*-Acyltransferasen wurde Fumonisin B1 (FB1, Abb. 3.10), ein Mycotoxin aus dem Pilz *Fusarium moniliforme*, beschrieben (Merrill *et al.*, 1996). FB1 ist ein Strukturanalagon der Sphingoidbasen, dem jedoch die 1-Hydroxygruppe fehlt, was zu seiner metabolischen Stabilität beiträgt. Allerdings gibt es Hinweise, dass nicht alle Acyltransferasen durch FB1 inhibiert werden (Venkataraman *et al.*, 2002). Dennoch sollte durch den Einsatz von FB1 die Wiederverwertung der freigesetzten [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure und die damit verbundene Radiomarkierung endogener Sphingoidbasen weitgehend unterdrückt werden können.



**Abb. 3.10** Struktur von Fumonisin B1 (FB1), einem Inhibitor der Sphinganin-*N*-Acyltransferasen

Die Markierungsexperimente an humanen Keratinozyten unter Verwendung von FB1 werden in Kap. 3.1.2.2.2 beschrieben.

### 3.1.2.2.1 Temperaturblock der Endozytose

Für die Markierungen humaner Keratinozyten mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) und [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) unter Temperaturblock der Endozytose wurden folgende Bedingungen gewählt: Zunächst wurden die Zellen für eine Stunde bei 4 °C mit dem jeweiligen Markierungsreagenz als BSA-Komplex inkubiert (*Pulse*). Bei dieser Temperatur können die kurzkettigen Ceramid-Analoga vom BSA abdissoziieren und in die Plasmamembran inserieren, ihre endozytotische Aufnahme in die Zelle und ihr vesikulärer Transport zu den Lysosomen ist jedoch blockiert. Stattdessen sollten die Markierungsreagenzien in der Lage sein, nach transversaler Diffusion auf die zytosolische Seite der Plasmamembran durch Diffusion zum ER zur Desaturierung bzw. zum Golgi-Apparat zur Glucosylierung zu gelangen. Auf den *Pulse* folgte dann eine Inkubation der Zellen ohne Zusatz der Markierungsreagenzien bei 37 °C (*Chase*), so dass vesikulärer Transport wieder möglich war.

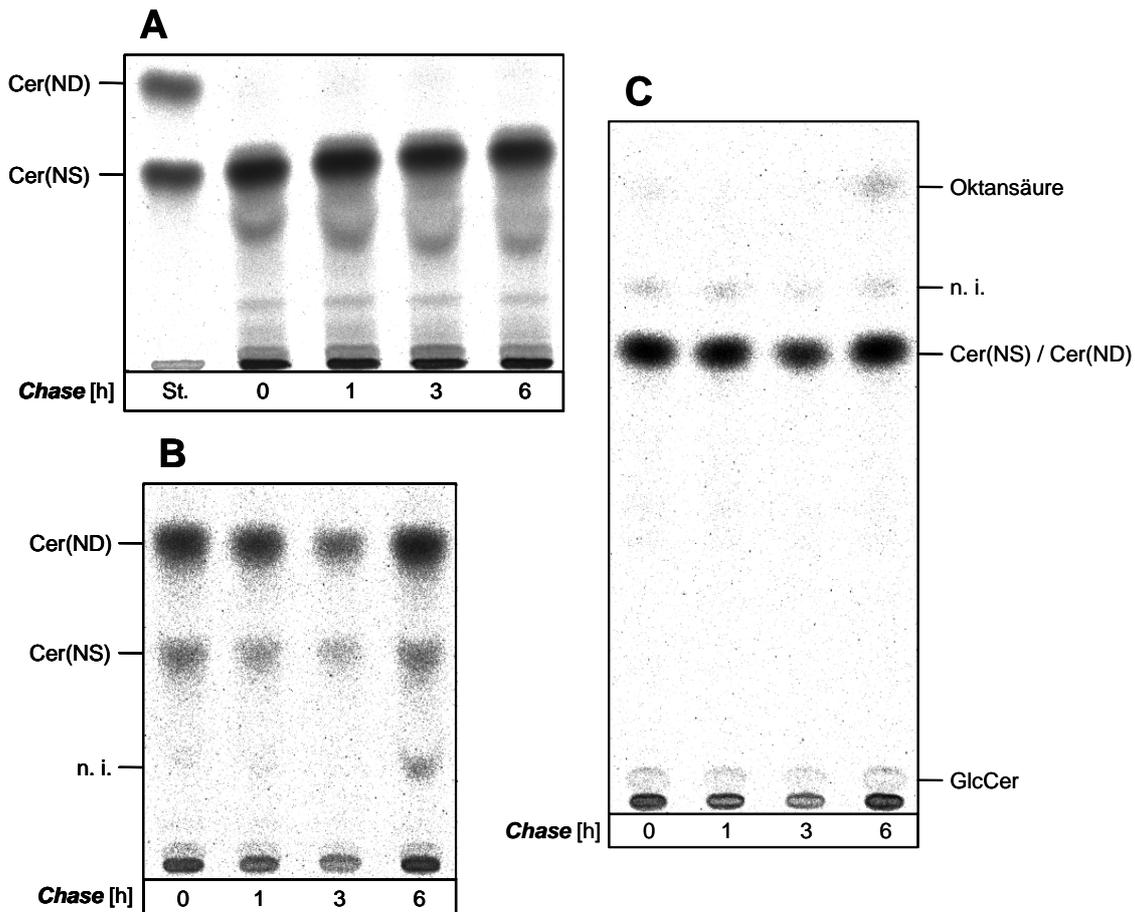
In einem Vorexperiment wurden humane basale Keratinozyten durch Zusatz von [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) bzw. [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) einem einstündigen *Pulse* bei 4 °C und anschließend für unterschiedliche Zeiträume (0, 1, 3 und 6 Stunden) einem *Chase* bei 37 °C ausgesetzt (Abb. 3.11). Auf diese Weise sollte ermittelt werden, welche Bedingungen für die Markierungen in Gegenwart des Dihydroceramid-Analogons Cp-DHC am günstigsten sind.

Es zeigte sich, dass in Keratinozyten, die für eine Stunde bei 4 °C mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) inkubiert und anschließend für unterschiedliche Zeiträume einem *Chase* bei 37 °C ausgesetzt wurden, dünnenschichtchromatographisch kein Cer(ND) nachweisbar war (Abb. 3.11 A). Dies bedeutet, dass selbst nach 6 h *Chase* noch keine Acylierung endogenen Sphingans mit aus dem Markierungsreagenz freigesetzter Oktansäure zu radiomarkiertem Cer(ND) stattgefunden hat.

Bei der metabolischen Markierung mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) war schon nach einstündiger Inkubation bei 4 °C, ohne dass anschließend eine *Chase*-Phase folgte, eine deutliche Desaturierung des Markierungsreagenzes zu Cer(NS) zu beobachten (Abb. 3.11 B). Auch in den anderen Proben (1, 3 und 6 h *Chase*) wurden deutliche Mengen Cer(NS) gebildet. Die Quantifizierung zeigte, dass hierbei das Verhältnis der Mengen von nicht umgesetztem [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) zu Cer(NS) weitgehend konstant und damit unabhängig von der Dauer der *Chase*-Phase war.

Des Weiteren wurde überprüft, ab welchem Zeitpunkt die Freisetzung der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure aus den Markierungsreagenzien detektierbar war. Bei Markierung mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) zeigte sich die Oktansäure-Bande erstmals nach 6 h *Chase* (Abb. 3.11 C). Unter den gewählten Bedingungen kam es also nach 3 bis 6 h *Chase* zur lysosomalen Freisetzung der Oktansäure aus dem Markierungsreagenz. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass ein Teil des in der 6 h *Chase*-Probe detektierten Cer(NS) (Abb. 3.11 B) nicht über die Desaturase-Reaktion gebildet wurde, sondern über Acylierung endogenen Sphingosins.

In einem weiteren Experiment wurden die Keratinozyten nach dem *Pulse*, also vor Beginn der *Chase*-Phase, bei 4 °C mit einer BSA-Lösung inkubiert. Auf diese Weise sollte an der Plasmamembran haftendes oder inseriertes, aber nicht in die Zelle aufgenommenes [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) bzw. -Cer(NS) entfernt werden („*back exchange*“, van Meer *et al.*, 1987). Der *back exchange* führte jedoch zu keiner nennenswerten Veränderung der oben beschriebenen Ergebnisse (ohne Abbildung).



**Abb. 3.11 Einfluss unterschiedlicher Chase-Zeiträume auf den Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) (A) und [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) (B, C) in die Lipide humaner basaler Keratinozyten**

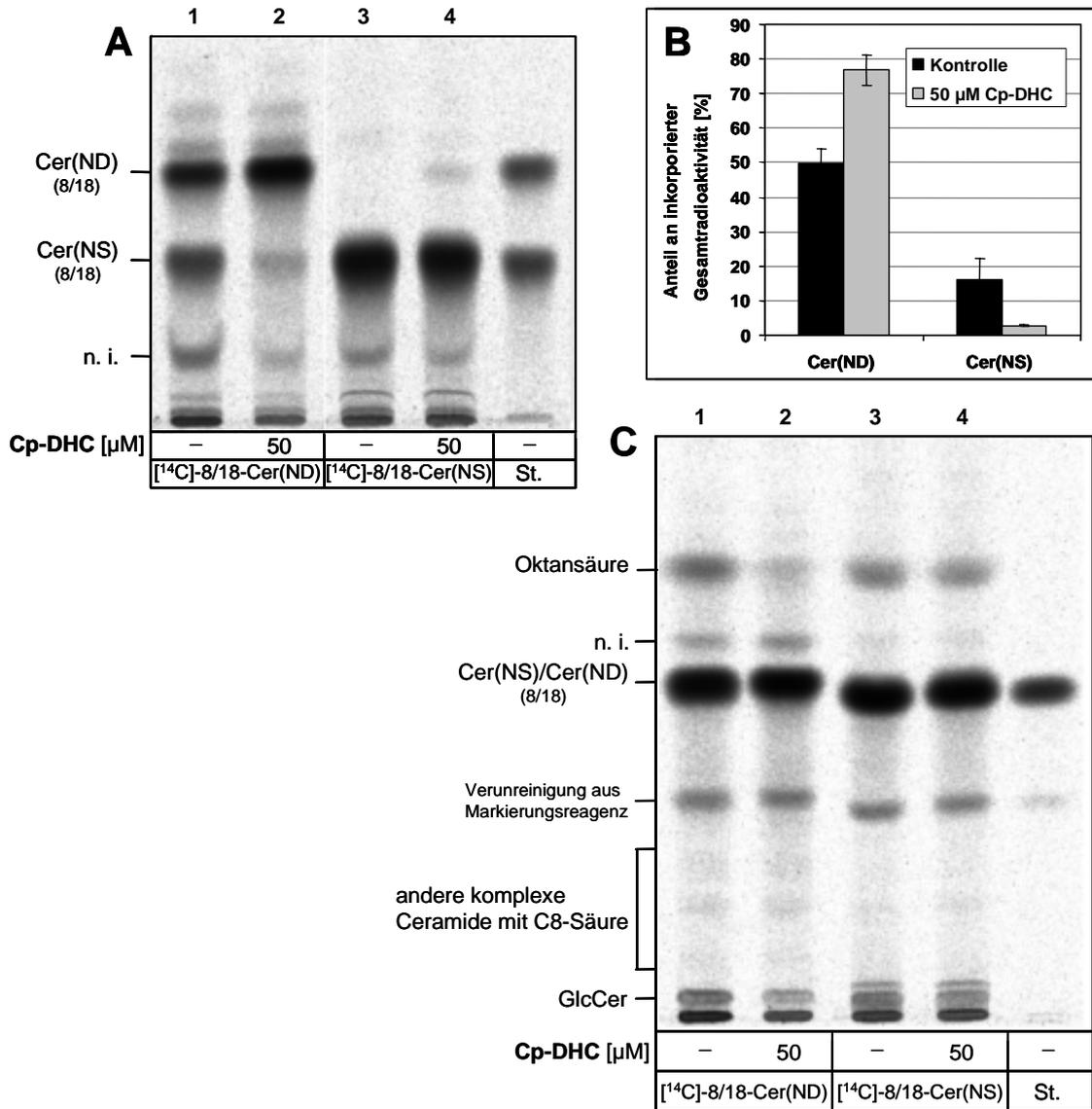
Humane Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 1 h mit 5  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) (A) oder [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) (B, C) (als BSA-Komplexe, spezifische Aktivität jeweils 57 Ci/mol) in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bei 4 °C inkubiert (*Pulse*). Dann wurden die Zellen entweder geerntet (0 h *Chase*) oder für weitere 1, 3 oder 6 h in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium ohne Zusatz der Markierungsreagenzien bei 37 °C weiter inkubiert (1, 3, 6 h *Chase*). Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt (A, B: Borat-imprägnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (v/v); C: Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v), zweimal entwickelt) und mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert und quantifiziert. Zum Vergleich wurde auf alle Bahnen die gleiche Radioaktivitätsmenge aufgetragen. (Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, St. = Standard, n. i. = nicht identifiziert)

Da bereits nach 1 h *Chase* ein deutlicher Umsatz von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) zu Cer(NS) zu verzeichnen war, ohne dass gleichzeitig eine Freisetzung der Oktansäure beobachtet werden konnte, wurde diese Inkubationszeit im Folgenden für die Untersuchung des Dihydroceramid-Analogons Cp-DHC gewählt. Auf eine Reextraktion mit BSA wurde dabei verzichtet.

Humane Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium zur Differenzierung angeregt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit Cp-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium erfolgte der *Pulse* durch Inkubation mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) bzw. -Cer(NS) in Gegenwart von Cp-DHC für 1 h bei 4 °C. Nach 1 h Chase bei 37 °C unter erneutem Zusatz von Cp-DHC wurden die Zellen geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Auf den Bahnen 1 und 2 in Abb. 3.12 A sind die Lipide der Markierung mit dem kurzkettigen Substratanalogon der Dihydroceramid-Desaturase [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) aufgetragen. Wie schon im Vorexperiment (Abb. 3.11 B) wurde auch hier ohne Zusatz von Cp-DHC ein deutlicher Umsatz des Markierungsreagenzes zum Produkt der Desaturase-Reaktion Cer(NS) beobachtet (Abb. 3.12 A, Bahn 1). Unter Einfluss von 50 µM Cp-DHC (Bahn 2) reduzierte sich der Anteil von Cer(NS) an der insgesamt in die Lipide inkorporierten Radioaktivität jedoch von 16 % auf 3 %, also auf etwa ein Fünftel des Kontrollwertes (Abb. 3.12 B). Gleichzeitig stieg der Anteil von nicht umgesetztem Cer(ND) auf das 1.6-Fache. Wie die Ergebnisse der metabolischen Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin deutet auch die hier beobachtete Erniedrigung des Anteils von Cer(NS) bei gleichzeitiger Erhöhung des Cer(ND)-Anteils an der inkorporierten Gesamtradioaktivität auf eine Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase durch das Substratanalogon Cp-DHC hin.

Die Bahnen 3 und 4 in Abb. 3.12 A zeigen die Trennung der Lipide aus dem Markierungsexperiment mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS), dem kurzkettigen Produktanalogon der Desaturase-Reaktion. Unter Zusatz von 50 µM Cp-DHC wurde eine schwache Bande für Cer(ND) detektiert (Bahn 4). Diese kann nur durch Acylierung endogenen Sphinganins mit aus [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) freigesetzter [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure entstanden sein (Abb. 3.9). Offensichtlich konnte die lysosomale Spaltung des Markierungsreagenzes durch den Temperaturblock der Endozytose nicht vollständig unterbunden werden. Dies wurde durch die Detektierung von freier Oktansäure in einem anderen Trennsystem (Abb. 3.12 C) bestätigt. Diese dem Vorexperiment (Abb. 3.11) widersprechende Beobachtung könnte darin begründet sein, dass die saure Ceramidase, die die lysosomale Spaltung der kurzkettigen Ceramide katalysiert, in differenzierten Keratinozyten stärker exprimiert wird als in basalen Keratinozyten, an denen die Inkubationszeiten für den Temperaturblock der Endozytose optimiert wurden. Frühere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Expressionsrate der sauren Ceramidase während der Differenzierung humaner Keratinozyten nur unwesentlich ansteigt (Gallala *et al.*, 2004; Houben *et al.*, 2006). Bemerkenswert ist aber, dass in der Kontrollprobe nahezu kein Cer(ND) detektiert wurde (Abb. 3.12 A, Bahn 3). Dies spricht dafür, dass durch Acylierung endogenen Sphinganins gebildetes Cer(ND) ohne Zusatz von Cp-DHC so schnell zu Cer(NS) desaturiert wurde, dass es dünnschichtchromatographisch nicht nachweisbar war. 50 µM Cp-DHC führte jedoch zu einer Akkumulation von Cer(ND) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.12 A, Bahn 4), wie sie im Falle einer Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC zu erwarten war. Dies wurde außerdem dadurch bestätigt, dass bei dem Markierungsexperiment mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) unter Zusatz von Cp-DHC wesentlich weniger [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure als in der Kontrollproben freigesetzt wurde (Abb. 3.12 C, Bahnen 1 und 2). Da die saure Ceramidase *N*-Octanoylsphingosin fünfmal schneller spaltet als *N*-Octanoylsphinganin (Linke, 2000), weist auch diese Beobachtung auf eine Akkumulation von Cer(ND) in Gegenwart von Cp-DHC und damit eine Hemmung der Desaturase hin.



**Abb. 3.12 Einfluss von Cp-DHC auf den Einbau von [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) und [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) in die Ceramide humaner differenzierter Keratinozyten unter Temperaturblock der Endozytose**

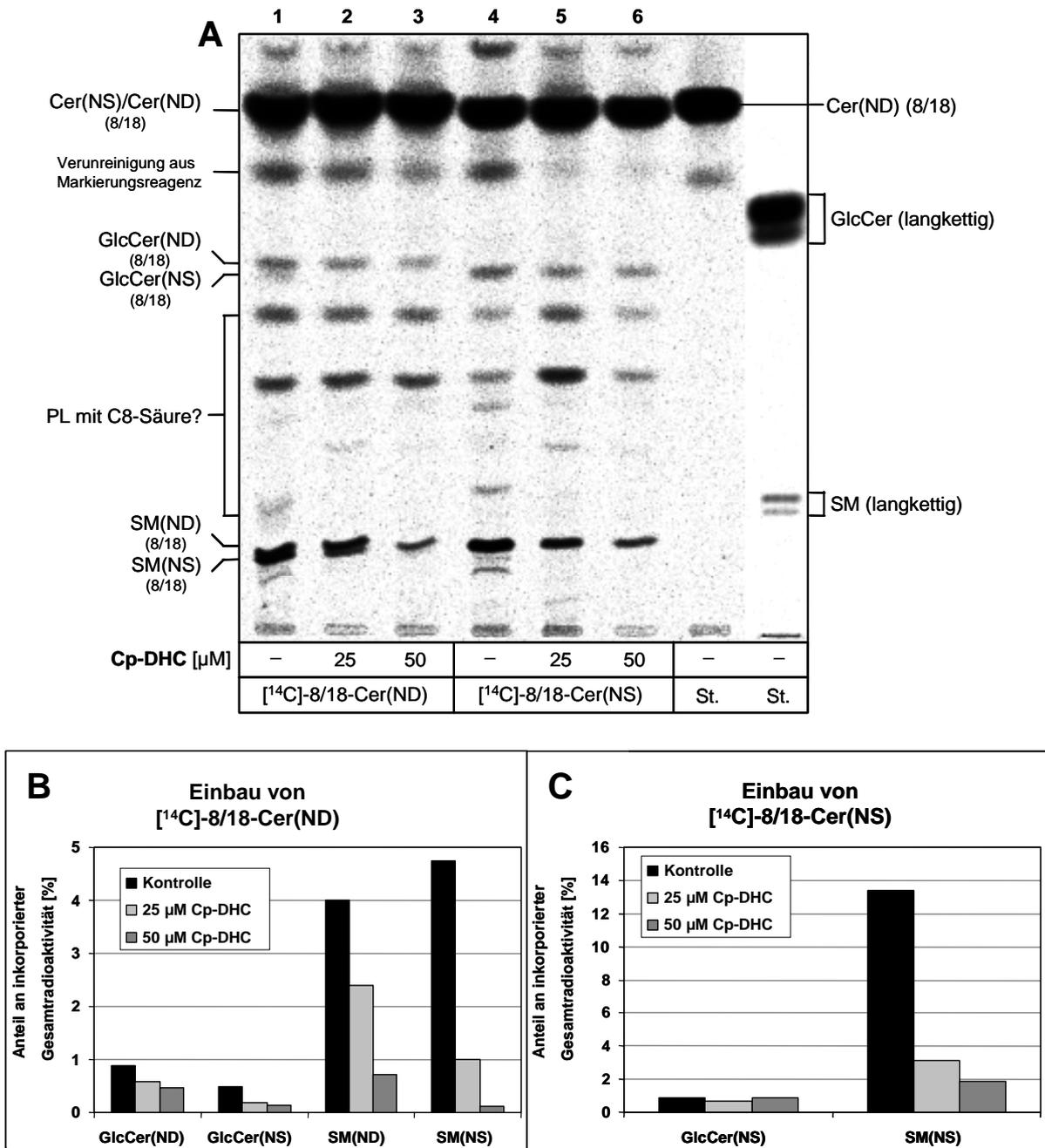
Humane Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium zur Differenzierung angeregt. Dann wurden die Zellen 24 h mit 50 µM Cp-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium vorinkubiert und nachfolgend in Gegenwart der gleichen Konzentration Cp-DHC 1 h mit 5 µM [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) bzw. [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) (als BSA-Komplexe, spezifische Aktivität jeweils 57 Ci/mol) in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium bei 4 °C inkubiert (*Pulse*). Nachfolgend wurden die Zellen 1 h in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium in Gegenwart von Cp-DHC, aber ohne Zusatz der Markierungsreagenzien, bei 37 °C weiter inkubiert (*Chase*). Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt (**A**: Borat-impregnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (v/v); **C**: Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v), zweimal entwickelt) und mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert und quantifiziert. Zum Vergleich wurde auf alle Bahnen die gleiche Radioaktivitätsmenge aufgetragen. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Bahnen 1 und 2 aus **A** sind in **B** dargestellt (Mittelwerte ± SEM, n=2).

(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, St. = Standard, n. i. = nicht identifiziert)

Einige sehr schwache Banden oberhalb der Glucosylceramide (Abb. 3.12 C) weisen auf die Bildung geringer Mengen anderer komplexer Ceramide durch Acylierung verschiedener endogener Sphingoidbasen mit [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure hin. Cer(NP) jedoch, das durch Hydroxylierung von [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) unter Katalyse der Dihydroceramid-Hydroxylase gebildet werden und etwa in Höhe der bereits im Markierungsreagenz enthaltenen Verunreinigung laufen sollte, konnte nicht detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte in den recht kurzen Inkubationszeiten liegen, die möglicherweise zur Bildung von Cer(NP) nicht ausreichten.

Unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen wurde außerdem die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Cp-DHC auf die Bildung der biosynthetisch auf Cer(ND) bzw. Cer(NS) folgenden Glucosylceramide und Sphingomyeline untersucht (Abb. 3.13). Auf den Bahnen 1 bis 3 in Abb. 3.13 A wurden die Lipide aus dem Markierungsexperiment mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) aufgetragen. Da im Gegensatz zur Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin hier nur Glucosylceramid- und Sphingomyelin-Strukturen mit einem einheitlichen Acylteil, nämlich der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure, detektiert wurden, gelang in diesem System sowohl die Trennung von GlcCer(ND) und GlcCer(NS) als auch von SM(ND) und SM(NS). Die Strukturen mit ungesättigter Sphingoidbase zeigten dabei im Vergleich zu den entsprechenden gesättigten Molekülen etwas kleinere R<sub>f</sub>-Werte. Aus Abb. 3.13 A geht hervor, dass ohne Zusatz von Cp-DHC sowohl das Markierungsreagenz [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) selbst als auch das daraus unter Katalyse der Dihydroceramid-Desaturase entstandene Cer(NS) zu GlcCer(ND) bzw. GlcCer(NS) und SM(ND) bzw. SM(NS) umgesetzt wurden (Bahn 1). Unter Einfluss von 25 µM Cp-DHC (Bahn 2) reduzierte sich der Anteil von GlcCer(NS) an der insgesamt in die Lipide inkorporierten Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle auf etwa ein Drittel (Abb. 3.13 B), mit 50 µM Cp-DHC (Bahn 3) verschwand die GlcCer(NS)-Bande nahezu vollständig. Ähnliches galt für SM(NS), dessen Anteil an der inkorporierten Gesamtradioaktivität bei Zusatz von 25 µM Cp-DHC (Bahn 2) gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 80 % erniedrigt war (Abb. 3.13 B). Auch hier wurde unter Einwirkung von 50 µM Cp-DHC (Bahn 3) fast kein SM(NS) mehr gebildet. Diese mit zunehmenden Konzentrationen Cp-DHC abnehmende Umsetzung zu GlcCer(NS) und SM(NS) ist in Übereinstimmung mit der konzentrationsabhängigen Abnahme des Cer(NS)-Anteils und einer Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase unter Einfluss von Cp-DHC. Aus Abb. 3.13 A und B geht jedoch hervor, dass auch die Anteile von GlcCer(ND) und SM(ND) mit gesättigter Sphingoidbase unter Zusatz von Cp-DHC abnehmen. Dies steht im Widerspruch zu der durch Cp-DHC bewirkten Zunahme der Cer(ND)-Menge (Abb. 3.12 A, B), aufgrund derer eher eine Zunahme der GlcCer(ND)- und SM(ND)-Anteile zu erwarten gewesen wären. Möglicherweise liegt hier eine zusätzliche Hemmung der GlcCer-Synthase und der SM-Synthase durch Cp-DHC vor.

Bei den Markierungsexperimenten mit dem kurzkettigen Produktanalogon der Dihydroceramid-Desaturase, [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS), wurde weder in der Kontrollprobe (Abb. 3.13 A, Bahn 4) noch unter Zusatz verschiedener Konzentrationen Cp-DHC (Bahnen 5 und 6) die Bildung von GlcCer(ND) oder SM(ND) beobachtet. Das durch Acylierung endogenen Sphinganins mit freigesetzter [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure gebildete Cer(ND) wurde also nicht weiter zu GlcCer(ND) oder SM(ND) umgesetzt. Dazu reichten die hier gewählten Inkubationszeiten offensichtlich nicht aus. Nur die von der GlcCer-Synthase bzw. der SM-Synthase katalysierten Umsetzungen des Markierungsreagenzes selbst wurden detektiert. Die Mengen des dabei gebildeten GlcCer(NS) blieben nahezu unverändert, die von SM(NS) nahmen gegenüber der Kontrolle unter Zusatz von Cp-DHC jedoch konzentrationsabhängig ab (Abb. 3.13 C). Auch dies ist ein Hinweis auf eine durch Cp-DHC bewirkte zusätzliche Hemmung der SM-Synthase.



**Abb. 3.13** Einfluss von Cp-DHC auf den Einbau von  $[^{14}\text{C}]-8/18\text{-Cer(ND)}$  (A, B) und  $[^{14}\text{C}]-8/18\text{-Cer(NS)}$  (A, C) in die Glucosylceramide und Sphingomyeline humaner differenzierter Keratinozyten unter Temperaturblock der Endozytose

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.12 beschrieben kultiviert und in Gegenwart von 25 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC metabolisch markiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (A) erfolgte durch Entwicklung in Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5 (v/v/v). Die Ergebnisse der Quantifizierung (n=1) sind in B (Einbau von  $[^{14}\text{C}]-8/18\text{-Cer(ND)}$ ) und C (Einbau von  $[^{14}\text{C}]-8/18\text{-Cer(NS)}$ ) dargestellt.

(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, PL = Glycerophospholipid, SM = Sphingomyelin, St. = Standard)

Ebenso wurden oberhalb der Glucosylceramide einige Banden detektiert, bei denen es sich aufgrund der  $R_f$ -Werte um Glycerophospholipide handeln könnte, die durch aus dem jeweiligen Markierungsreagenz freigesetzte Oktansäure radiomarkiert wurden (Abb. 3.13 A). Auch hierbei war zum Teil eine Regulation durch Cp-DHC festzustellen, bei der sich aber keine klare Konzentrationsabhängigkeit erkennen ließ.

### 3.1.2.2.2 Hemmung der Ceramid-Synthasen durch Fumonisin B1

Unter dem Temperaturblock der Endozytose (Kap. 3.1.2.2.1) wurden keine detektierbaren Mengen Cer(NP) gebildet, was möglicherweise auf die kurzen Inkubationszeiten zurückzuführen ist. Der Einsatz von FB1 zur Hemmung der Reacylierung endogener Sphingoidbasen durch aus den Markierungsreagenzien freigesetzte  $[1-^{14}\text{C}]$ -Oktansäure sollte dagegen längere Inkubationszeiten ermöglichen.

Dazu wurden humane Keratinozyten in *low*  $\text{Ca}^{2+}$ -Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high*  $\text{Ca}^{2+}$ /LA-Medium zur Differenzierung angeregt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen Cp-DHC und 25  $\mu\text{M}$  FB1 in *high*  $\text{Ca}^{2+}$ /LA-Medium wurden die Keratinozyten 24 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC und FB1 mit  $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(ND) bzw. -Cer(NS) bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert.

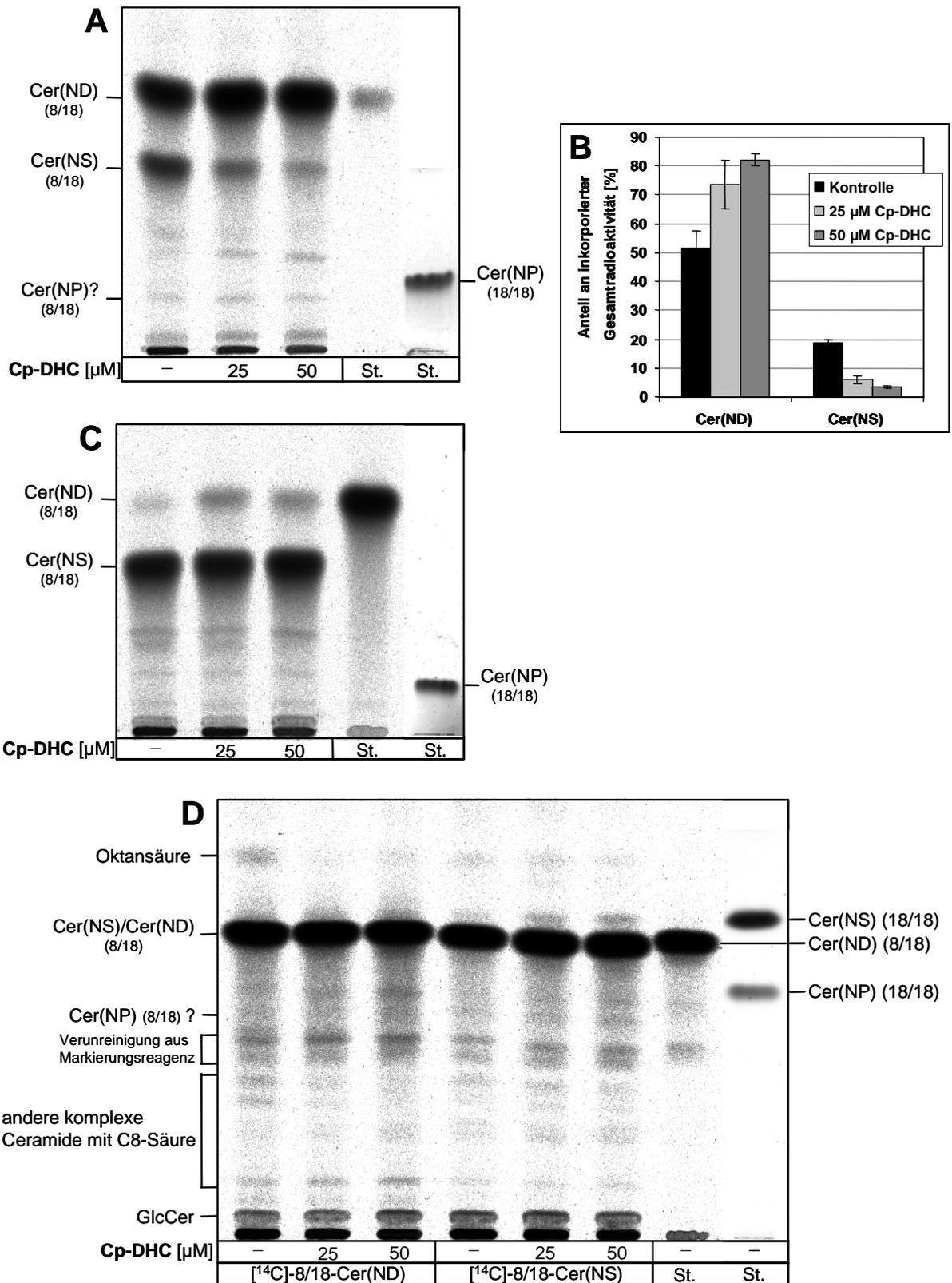
Die Markierung mit  $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(ND) ergab unter den hier gewählten Bedingungen ähnliche Ergebnisse wie unter dem Temperaturblock der Endozytose. So konnte auch hier eine Reduktion des Anteils von Cer(NS) an der insgesamt in die Lipide inkorporierten Radioaktivität unter Einfluss von Cp-DHC beobachtet werden (Abb. 3.14 A). Dabei nahm der Effekt mit steigenden Konzentrationen Cp-DHC zu. In einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  senkte Cp-DHC den Cer(NS)-Anteil auf 32 % des Wertes von Keratinozyten, die lediglich mit FB1 behandelt worden waren.

→

#### Abb. 3.14 Einfluss von Cp-DHC auf den Einbau von $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(ND) und $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(NS) in die Ceramide humaner differenzierter Keratinozyten in Gegenwart von FB1

Humane Keratinozyten wurden in *low*  $\text{Ca}^{2+}$ -Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high*  $\text{Ca}^{2+}$ /LA-Medium zur Differenzierung angeregt. Dann wurden die Zellen 24 h mit 25 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC und 25  $\mu\text{M}$  FB1 in *high*  $\text{Ca}^{2+}$ /LA-Medium vorinkubiert und nachfolgend 24 h in Gegenwart der gleichen Konzentrationen Cp-DHC und FB1 mit 5  $\mu\text{M}$   $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(ND) bzw.  $[^{14}\text{C}]$ -8/18-Cer(NS) (als BSA-Komplexe, spezifische Aktivität jeweils 57 Ci/mol) bei 37 °C inkubiert. Nach der Zellernte wurden die Lipide extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt (**A**, **C**: Borat-impregnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol 9:1 (v/v); **D**: Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v), zweimal entwickelt) und mittels Phosphoimager-Analyse visualisiert und quantifiziert. Zum Vergleich wurde auf alle Bahnen die gleiche Radioaktivitätsmenge aufgetragen. Die Quantifizierung der getrennten Lipide aus **A** ist in **B** dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=2).

(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, St. = Standard)



Durch Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC wurde der Cer(NS)-Anteil weiter auf 18 % der Kontrolle erniedrigt (Abb. 3.14 B).

Außerdem zeigte sich auch hier erneut, dass mit steigenden Konzentrationen Cp-DHC weniger [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) umgesetzt wurde (Abb. 3.14 A). In Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  Cp-DHC erhöhte sich der Anteil von nicht umgesetztem Cer(ND) auf das 1.4-Fache des Wertes der nur mit FB1 behandelten Kontrolle, 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC führte zu einer Erhöhung auf das 1.6-Fache (Abb. 3.14 B). Die bei allen bisher durchgeführten Markierungsexperimenten beobachtete konzentrationsabhängige Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase konnte also auch hier bestätigt werden.

Ebenso zeigte sie sich bei der Markierung mit dem kurzkettigen Produktanalogon [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) der Desaturase-Reaktion (Abb. 3.14 C). Aus der Trennung von Cer(ND) und Cer(NS) ging zunächst einmal hervor, dass es auch durch den Einsatz von FB1 nicht gelungen war, die Bildung von Cer(ND) über Acylierung endogenen Sphinganins mit aus [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) freigesetzter [ $^{1-14}\text{C}$ ]-Oktansäure zu unterbinden. Sowohl in der lediglich mit FB1 behandelten Probe als auch in den Proben, denen 25  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC zugesetzt worden war, wurde eine Cer(ND)-Bande detektiert (Abb. 3.14 C). Dass FB1 unter den hier gewählten Bedingungen nicht zu einem vollständigen Block der Acylierung im *salvage pathway* in der Lage ist, wurde schon in einer früheren Arbeit beobachtet (Macheleidt, 2002) und ist möglicherweise auf eine von FB1 unabhängige Ceramidsynthese zurückzuführen (Venkataraman *et al.*, 2002). Dennoch zeigte sich wie schon bei der Markierung unter Temperaturblock der Endozytose (Kap. 3.1.2.2.1) eine Akkumulation von Cer(ND) unter Einfluss von Cp-DHC im Vergleich zur allein mit FB1 behandelten Kontrolle (Abb. 3.14 C). Der Anteil von Cer(ND) nahm hier bereits in Gegenwart von 25  $\mu\text{M}$  Cp-DHC das Vierfache des Kontrollwertes an, was erneut auf eine Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC hinweist.

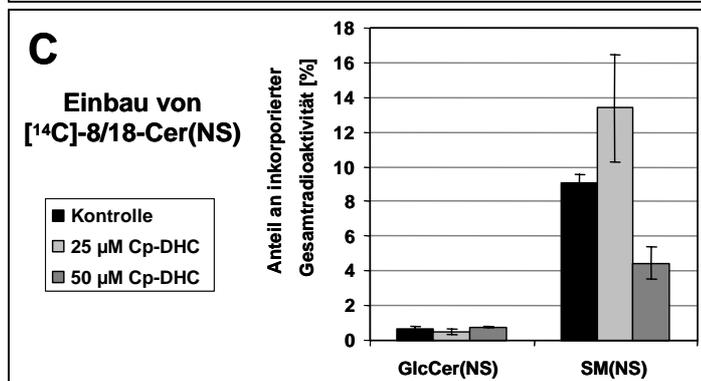
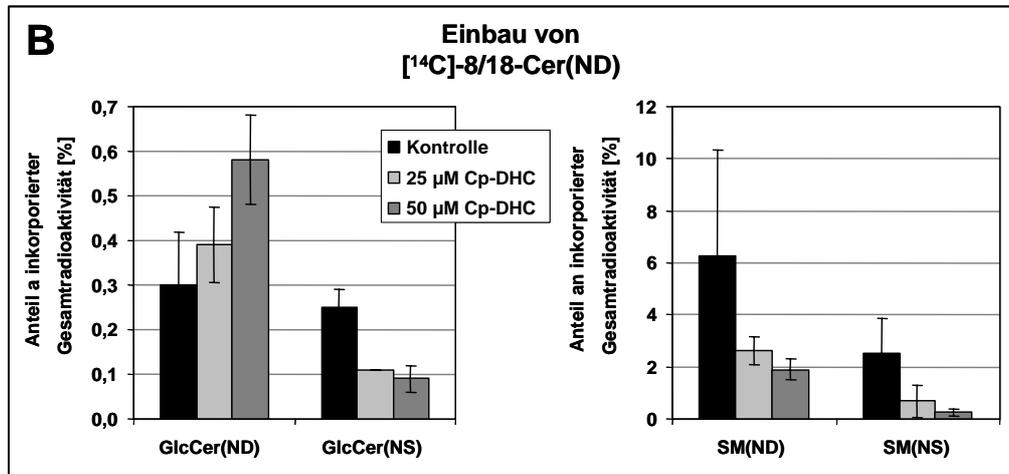
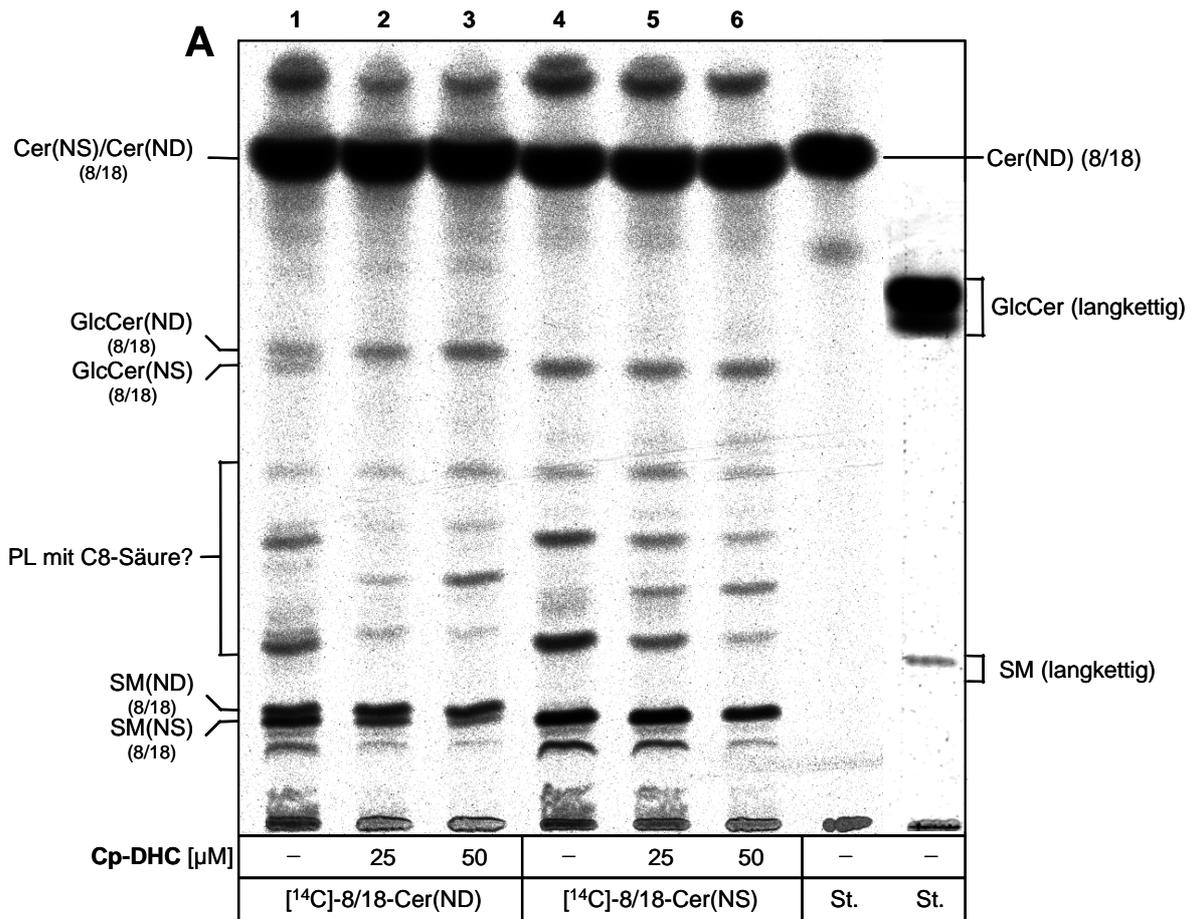
Wie auch bei den Markierungen unter *Pulse-Chase*-Bedingungen (Kap. 3.1.2.2.1) wurden auch in diesem Experiment andere mit [ $^{1-14}\text{C}$ ]-Oktansäure acylierte Ceramide detektiert (Abb. 3.14 D). Darunter befand sich auch eine Bande, die aufgrund eines Vergleichs ihres  $R_f$ -Wertes mit einem mit Stearinsäure acylierten Cer(NP)-Standard auf die Bildung von radiomarkiertem Cer(NP) hinweisen könnte (Abb. 3.14 A, D). Leider erscheint diese Bande in beiden Trennsystemen nur sehr schwach, so dass sich aus den Dünnschichtchromatogrammen keine quantitativen Aussagen zu einer Regulation durch Cp-DHC machen lassen.

→

**Abb. 3.15 Einfluss von Cp-DHC auf den Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND) (A, B) und [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS) (A, C) in die Glucosylceramide und Sphingomyeline humaner differenzierter Keratinozyten in Gegenwart von FB1**

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.14 beschrieben kultiviert und in Gegenwart von 25 bzw. 50  $\mu\text{M}$  Cp-DHC und 25  $\mu\text{M}$  FB1 metabolisch markiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (A) erfolgte durch Entwicklung in Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5 (v/v/v). Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=2) sind in B (Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(ND), Bahnen 1 bis 3) und C (Einbau von [ $^{14}\text{C}$ ]-8/18-Cer(NS), Bahnen 4 bis 6) dargestellt.

(Cer = Ceramid, GlcCer = Glucosylceramid, PL = Glycerophospholipid, SM = Sphingomyelin, St. = Standard)



Den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen Cp-DHC auf die Bildung der biosynthetisch auf Cer(ND) bzw. Cer(NS) folgenden Glucosylceramide und Sphingomyeline unter Zusatz von FB1 zeigt Abb. 3.15 A. In den Bahnen 1 bis 3 ist die Trennung der Lipide aus dem Markierungsexperiment mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) zu sehen. Wie schon bei der Markierung unter Temperaturblock der Endozytose (Kap. 3.1.2.2.1) wurden ohne Zusatz von Cp-DHC sowohl das Markierungsreagenz [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) selbst als auch das daraus durch Desaturierung gebildete Cer(NS) zu GlcCer(ND) bzw. GlcCer(NS) und SM(ND) bzw. SM(NS) umgesetzt (Bahn 1). Mit steigenden Konzentrationen Cp-DHC zeigten sich für die GlcCer- und die SM-Strukturen jedoch unterschiedliche Effekte. Während der Einbau von [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) in GlcCer(ND) unter Zusatz von 25 µM Cp-DHC (Bahn 2) auf das 1.3-Fache und in Gegenwart von 50 µM Cp-DHC (Bahn 3) auf das fast das Doppelte des Kontrollwertes anstieg, nahm die aus [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) durch Desaturierung und anschließende Glucosylierung gebildete Menge an GlcCer(NS) unter Einfluss von Cp-DHC auf nahezu nicht mehr detektierbare Mengen ab (Abb. 3.15 A, B). Auch diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit einem mit steigenden Konzentrationen Cp-DHC zunehmendem Cer(ND)- und einem abnehmendem Cer(NS)-Anteil und damit mit einer Inhibierung der Desaturase. Die bei kurzen Inkubationszeiten (Kap. 3.1.2.2.1) beobachtete zusätzlich Hemmung der GlcCer-Synthase, die zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der GlcCer(ND)-Menge bei Zusatz von Cp-DHC geführt hatte (Abb. 3.13), trat bei der hier gewählten 24-stündigen Markierungszeit in Gegenwart von FB1 offensichtlich in den Hintergrund. Dafür spricht auch, dass sich bei der Markierung mit [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(NS) die Menge des Glucosylierungsproduktes GlcCer(NS) bei Zusatz von Cp-DHC nicht wesentlich änderte (Abb. 3.15 A Bahnen 4 bis 6 und Abb. 3.15 C).

Anders verhielt es sich mit der Bildung von SM, bei der in Anwesenheit von Cp-DHC offenbar weiterhin die Hemmung der SM-Synthase dominierte. Dies zeigte sich darin, dass bei der Markierung mit dem Substratanalogon [<sup>14</sup>C]-8/18-Cer(ND) der Dihydroceramid-Desaturase nicht nur die SM(NS)-Menge unter Einwirkung von Cp-DHC reduziert war, sondern auch diejenige von SM(ND) (Abb. 3.15 A Bahnen 1 bis 3 und Abb. 3.15 B). In diesem Zusammenhang muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Quantifizierung der SM(ND)- und der SM(NS)-Bande aufgrund ihrer unzureichenden Trennung (Abb. 3.15 A) problematisch ist, so dass die ermittelten Werte einen recht hohen Fehler aufweisen (Abb. 3.15 B, C).

Eine Markierung von Glycerophospholipiden durch die aus dem jeweiligen Markierungsreagenz freigesetzte Oktansäure wurde auch unter den hier gewählten Bedingungen beobachtet (Abb. 3.15 A). Dies war jedoch zu erwarten, da der Säureeinbau in Glycerophospholipide nicht durch FB1 gehemmt wird und die Inkubationszeiten hier zudem länger waren als unter dem Temperaturblock der Endozytose. Eine Beeinflussung durch Cp-DHC scheint jedoch auch hier vorzuliegen.

### 3.1.3 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression von Genen ausgewählter Proteine in humanen Keratinozyten

Im Gegensatz zu Cer(NS), das in 4,5-Position der Sphingoidbase eine Doppelbindung enthält, ruft Cer(ND) (Dihydroceramid) keine antimitogenen Effekte wie Anhalten des Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Apoptose hervor (Bielawska *et al.*, 1993). Mit Hilfe des Dihydroceramid-Analogons Cp-DHC sollten daher Erkenntnisse darüber gewonnen werden, in welcher Weise sich eine Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase-Aktivität und damit eine Abnahme des Anteils von Ceramiden mit ungesättigter zugunsten derjenigen mit gesättigter Sphingoidbase (Dihydroceramide) auf die Differenzierungseigenschaften humaner Keratinozyten auswirkt. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von Cp-DHC auf die Expression einiger Proteine, die am Ceramidstoffwechsel und an der Differenzierung humaner Keratinozyten beteiligt sind, untersucht. Zur Quantifizierung der *messenger* RNA-Mengen der zu untersuchenden Proteine wurde dabei die Methode der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet.

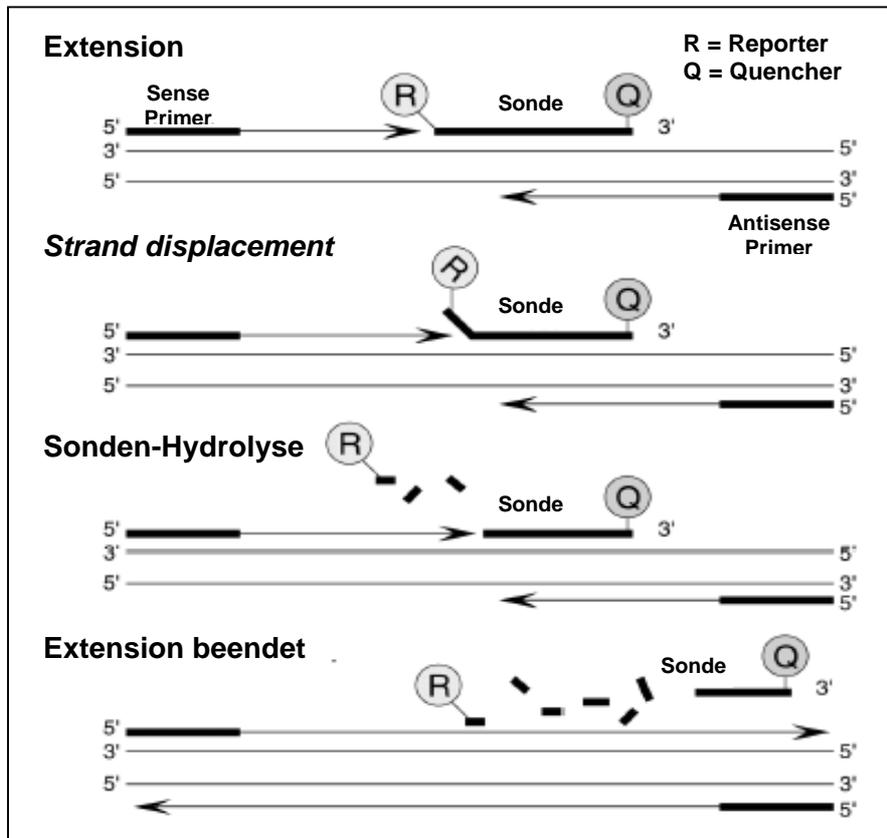
#### 3.1.3.1 Grundlagen der RNA Quantifizierung mittels *real-time* PCR

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen und wurde erstmals von Saiki *et al.*, 1985 beschrieben. Der zu amplifizierende Bereich, das Amplikon, wird hierbei von jeweils einem Primer für den Sense- und den Antisense-Strang flankiert und von einem Enzym, der DNA-Polymerase, vervielfältigt. Die Methode basiert auf der wiederholten Abfolge verschiedener Temperaturzyklen, bei denen die Phasen Denaturierung, Anlagerung (*annealing*) und Extension nacheinander durchlaufen werden. Zunächst wird das Reaktionsgemisch kurz auf 94-98 °C erhitzt, wobei die beiden Stränge der DNA durch Denaturierung getrennt werden. Beim anschließenden Absenken der Temperatur auf 50-60 °C binden die Primer an die komplementären Einzelstränge (*annealing*) und dienen als Starter für die dann folgende DNA-Polymerase-Reaktion, die in 5'→3'-Richtung entlang der einzelnen Matrizenstränge abläuft (Extension). Die Verwendung hitzebeständiger DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-DNA-Polymerase) erübrigt es, nach jedem Denaturierungsschritt frisches Enzym zuzugeben. Die *Taq*-DNA-Polymerase zeigt bei einer Extensionstemperatur von 72 °C die höchste Aktivität. Theoretisch wird in jedem PCR-Zyklus die ursprünglich vorhandene Menge an Ziel-DNA verdoppelt, d. h. der Zuwachs verläuft exponentiell. In der Praxis ist jedoch nur in den ersten 15-20 Zyklen ein exponentieller Verlauf zu beobachten, der anschließend aufgrund der im Verhältnis zur Primerkonzentration hohen Produktzunahme linear wird. Bei zunehmenden Produktkonzentrationen kommt es verstärkt zur Reassoziierung von komplementären DNA-Molekülen, die dann nicht mehr als Matrizen für die DNA-Polymerase zur Verfügung stehen. Ein entscheidender Grund für den Plateau-Effekt der PCR ist außerdem die Abnahme der Polymerase-Aktivität. Die *Taq*-Polymerase hat z. B. bei 95 °C eine Halbwertszeit von 40 Minuten.

Mit der PCR-Methode lässt sich auch *messenger* RNA (mRNA) nachweisen, wenn diese zuvor durch die Reverse Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben wurde.

Die in dieser Arbeit zur Quantifizierung von mRNA-Mengen angewandte *real-time* PCR beruht auf einer Modifizierung eines von Holland *et al.*, 1991 beschriebenen 5'-3'-Exonuklease-Assays. Sie

ermöglicht im Gegensatz zur konventionellen PCR sowohl eine qualitative, als auch eine quantitative Analyse des PCR-Produktes. Die Quantifizierung erfolgt dabei zu einem sehr frühen Zeitpunkt der PCR, zu dem die Reaktion noch exponentiell verläuft. Die Messungen werden dadurch in hohem Maße reproduzierbar. Kernelement der Methode ist ein zusätzliches Oligonukleotid (Sonde), das zu einer Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes komplementär ist und zwischen den Sense- und den Antisense-Primer positioniert wird (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16** Prinzip der *Real-time* quantitativen PCR (TaqMan PCR), modifiziert nach dem „User Bulletin number 2“ (ABI PRISM 7700 Sequence Detector System, Oktober 2001, Applied Biosystems)

An das 5'-Ende der Sonde ist ein Fluorescein-Farbstoff (Reporter) kovalent gebunden, das 3'-Ende ist mit einem Rhodamin-Farbstoff (Quencher) verknüpft. Damit die Sonde nicht selbst als Primer fungieren kann, ist die 3'-OH-Gruppe zusätzlich mit einem Phosphatrest blockiert. Im beheizbaren Deckel des Thermocyclers des *Real-time* PCR Systems (TaqMan) befindet sich über jeder einzelnen der 96 möglichen Proben eine Linse sowie ein optischer Leiter. Der Thermocycler ist mit einem Detektionssystem, das Fluoreszenzstrahlung im Bereich von 500-600 nm detektiert und einem Laser als Lichtquelle verbunden. Während der PCR werden die Proben mit Laserlicht angeregt, und die emittierte Fluoreszenzstrahlung wird in Abständen von sechs Sekunden gemessen und aufgezeichnet. Auf diese Weise kann der Verlauf der PCR in „Echtzeit“ („real-time“) anhand einer Amplifikationskurve verfolgt werden. Solange die Sonde intakt ist, wird die vom Reporter aufgenommene Lichtenergie auf den Quencher übertragen, so dass der Reporter selbst keine Fluoreszenzstrahlung emittiert. Dieser Effekt des Energietransfers (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET), tritt nur auf, wenn sich die beiden Farbstoffe in räumlicher Nähe zueinander

befinden (Förster, 1949). Während der Extensionsphase verlängert die *Taq*-DNA-Polymerase die regulären Primer in 5'→3'-Richtung, trifft auf die Sonde und hebt diese einige Basen weit vom DNA-Strang ab (*strand displacement*). Dadurch wird ein Substrat für die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase geschaffen und die Sonde verdaut (Abb. 3.16). Ungebundene einzelsträngige Sondenmoleküle bleiben hingegen intakt. Durch die Hydrolyse der gebundenen Sonde kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und Quencher, so dass kein Energietransfer mehr stattfindet und der Reporter selbst Fluoreszenzstrahlung emittiert. Die vom TaqMan-System gemessene Intensität des Reportersignals ist der Menge an PCR-Produkt direkt proportional. So kann die DNA- bzw. mRNA-Menge einer bestimmten Zielsequenz in einer unbekannt Probe mit Hilfe einer Standardkurve, die anhand von Proben bekannter Konzentrationen erstellt wurde, bestimmt werden.

Durchführung und Auswertung einer *real-time* quantitativen PCR-Messung sind in Kap. 5.2.6 beschrieben.

Bei den folgenden Experimenten wurde als Reporter-Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM) und als Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA) eingesetzt.

### **3.1.3.2 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression an der Differenzierung beteiligter Proteine in humanen Keratinozyten**

Zur Klärung der Frage, welche Konsequenzen die durch Cp-DHC hervorgerufene Abnahme der Menge von Ceramiden mit ungesättigter Sphingoidbase bei gleichzeitiger Zunahme des Dihydroceramid-Anteils auf die Differenzierungseigenschaften humaner Keratinozyten hat, wurden die Expressionsraten der Gene von Profilaggrin, Keratin 10 und Keratin 14, die während unterschiedlicher Stadien der epidermalen Differenzierung exprimiert werden, untersucht.

Statt des im *stratum basale* vorkommenden Keratins 14 wird mit Beginn der Differenzierung im *stratum spinosum* Keratin 10 als Bestandteil von Filamenten exprimiert, die mit fortschreitender Differenzierung immer dichter gepackt werden (Kirfel *et al.*, 2003). Profilaggrin ist in den Keratohyalin-Granulae enthalten, die im *stratum spinosum* gebildet werden (Kap. 2.4.1). Es wird im Laufe der weiteren Differenzierung zu Filaggrin prozessiert, das die Verdichtung der Keratinfilamente fördert (Nemes und Steinert, 1999; Kirfel *et al.*, 2003). Durch *Northern Blot*-Analyse wurde bereits gezeigt, dass die Transkription der Differenzierungsmarker Keratin 10 und Profilaggrin in kultivierten Keratinozyten durch einen  $Ca^{2+}$ -Shift induziert wird (Roop *et al.*, 1987). RNA-Quantifizierungsexperimente mittels *real-time* PCR bestätigten diese Ergebnisse. Die Expressionsrate des Proliferationsmarkers Keratin 14 nimmt dagegen mit fortschreitender Differenzierung ab (Gallala *et al.*, 2004).

Zur Untersuchung der Expressionsraten der oben genannten Proteine wurden humane Keratinozyten in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 24 Stunden mit 50  $\mu$ M Cp-DHC in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium vorinkubiert. Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen dann einem  $Ca^{2+}$ /LA-Shift unterzogen, indem das *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium gegen das *Differenzierungsmedium (high Ca<sup>2+</sup>/LA-Medium)* ausgetauscht wurde. In diesem wurden die Zellen dann in Gegenwart von 50  $\mu$ M Cp-DHC weiter inkubiert.

Um Aussagen darüber treffen zu können, welchen Einfluss Cp-DHC auf den Übergang von Proliferation zu Differenzierung bei humanen Keratinozyten hat, fand die Zellernte zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt:

- 24 h vor Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (entsprechend 0 h Inkubation mit Cp-DHC)
- unmittelbar vor Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (entsprechend 24 h Inkubation mit Cp-DHC)
- 6 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (entsprechend 30 h Inkubation mit Cp-DHC)
- 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (entsprechend 48 h Inkubation mit Cp-DHC)

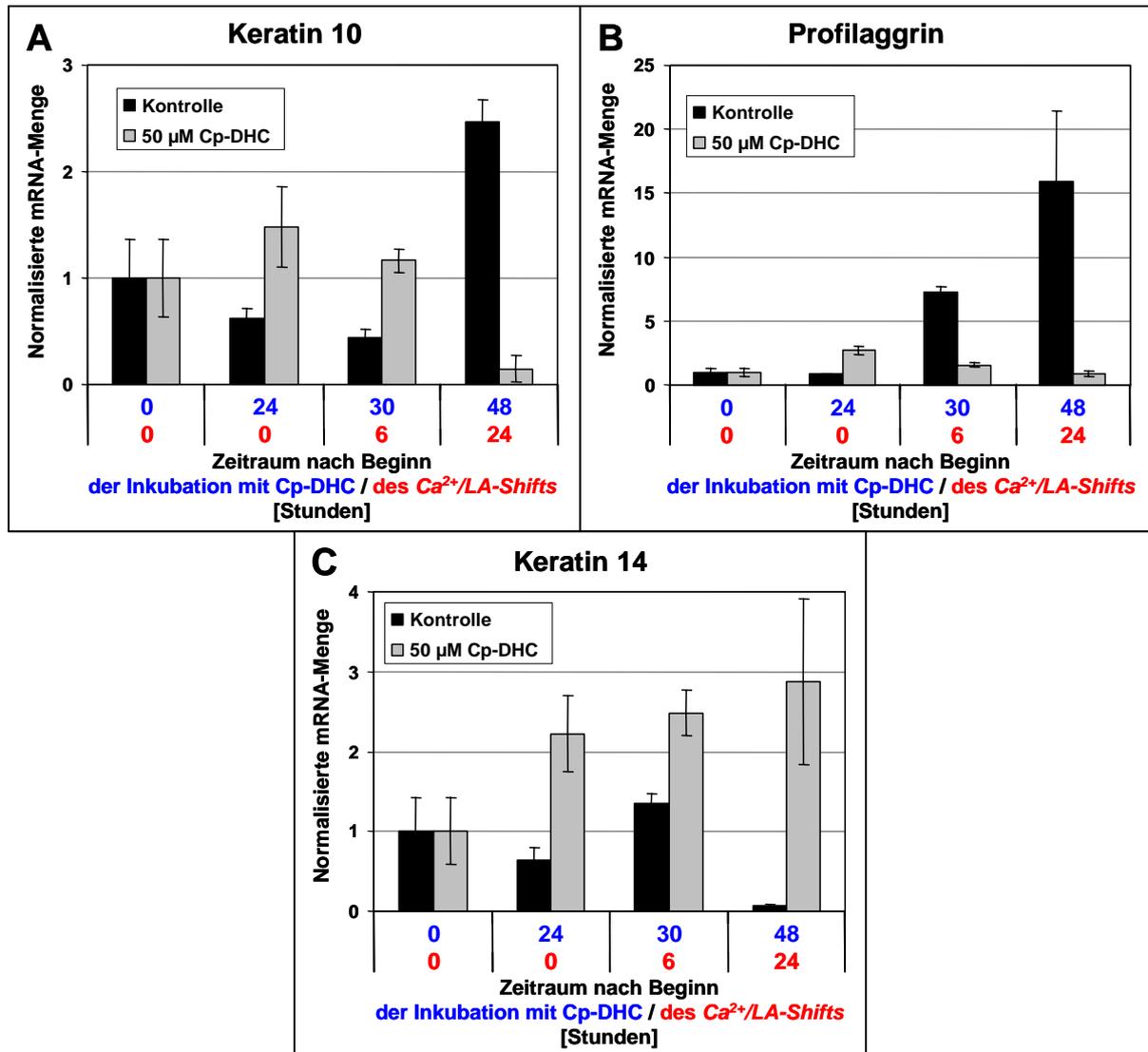
Nach Extraktion der Gesamt-RNA aus den geernteten Keratinozyten erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Anteile der zu untersuchenden Proteine mittels *real-time* PCR (Abb. 3.17).

Erwartungsgemäß wurde ohne Zusatz von Cp-DHC im Laufe der Differenzierung der Keratinozyten ein Anstieg der Expressionsrate der beiden Differenzierungsmarkerproteine Keratin 10 und Profilaggrin beobachtet. Die mRNA-Mengen von Profilaggrin waren 6 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts bereits 8-fach höher als vor Beginn der Differenzierung und nahmen in den folgenden 18 h weiter bis auf das 16-Fache des Ausgangswertes zu (Abb. 3.17 B). Für Keratin 10 zeigte sich die Erhöhung der Expressionsrate erst 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts. Zu diesem Zeitpunkt war sie etwa 2.5-fach höher als zu Beginn der Differenzierung (Abb. 3.17 A).

Unter Zusatz von 50  $\mu$ M Cp-DHC änderten sich die Expressionsraten dieser beiden Proteine jedoch grundlegend. 6 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts war die mRNA-Menge von Keratin 10 in Keratinozyten, die mit Cp-DHC behandelt worden waren, noch 2.6-fach höher als in den Kontrollzellen (Abb. 3.17 A). Die Expressionsrate des anderen Differenzierungsmarkers Profilaggrin war dagegen schon zu diesem Zeitpunkt auf 20 % des Kontrollwertes gesunken (Abb. 3.17 B). 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts waren dann die Expressionsraten beider Differenzierungsmarker in Gegenwart von Cp-DHC um rund 95 % niedriger als in unbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt.

Bei der Untersuchung des Basalmarkerproteins Keratin 14 wurden zu Keratin 10 und Profilaggrin gegenläufige Effekte beobachtet. Die mit zunehmender Differenzierung erwartete Abnahme der mRNA-Menge zeigte sich deutlich 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts. Zu diesem Zeitpunkt war die Expressionsrate von Keratin 14 um 93 % niedriger als zu Beginn der Differenzierung (Abb. 3.17 C). In mit Cp-DHC behandelten Keratinozyten wurden dagegen wesentlich höhere Transkriptmengen gemessen. 6 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts betrug die mRNA-Menge von Keratin 14 unter Zusatz von Cp-DHC fast das Doppelte des Kontrollwertes, nach 24 h  $Ca^{2+}/LA$ -Shift war sie 40-fach höher als in unbehandelten Keratinozyten zum selben Zeitpunkt.

Die in Gegenwart von Cp-DHC veränderten Expressionsmuster der hier untersuchten Proteine sprechen dafür, dass die Hemmung der Bildung von Ceramiden mit 4,5-ungesättigter Sphingoidbase zu einer Störung der Differenzierung führt, die zur Folge hat, dass die Keratinozyten in einem proliferierenden Zustand verbleiben.



**Abb. 3.17 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression an der Differenzierung beteiligter Proteine in humanen Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden in *low*  $Ca^{2+}$ -Medium bis zur Konfluenz kultiviert und dann 24 h mit 50  $\mu$ M Cp-DHC in *low*  $Ca^{2+}$ -Medium vorinkubiert. Die Induktion der Differenzierung erfolgte anschließend durch einen Wechsel zu *high*  $Ca^{2+}$ /LA-Medium ( $Ca^{2+}$ /LA-Shift), in dem die Zellen in Gegenwart der gleichen Konzentration Cp-DHC weiter inkubiert wurden. Die Zellernte fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt: 24 h vor Beginn des  $Ca^{2+}$ /LA-Shifts, unmittelbar vor Beginn des  $Ca^{2+}$ /LA-Shifts und 6 bzw. 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}$ /LA-Shifts. Diese Zeitpunkte entsprachen einer Inkubation mit Cp-DHC über 0, 24, 30 und 48 h. Nach Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Mengen von Keratin 10 (A), Profilaggrin (B) und Keratin 14 (C) mittels *Real-time* quantitativer PCR wie in Kap. 5.2.6 beschrieben. Dargestellt sind gegen Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) als Haushaltsgen normalisierte mRNA-Mengen. Die mRNA-Mengen der Zellen, die 24 h vor Beginn des  $Ca^{2+}$ /LA-Shifts (0 h Inkubation mit Cp-DHC) geerntet worden waren, wurden gleich 1 gesetzt. Die mRNA-Mengen der zu späteren Zeitpunkten geernteten Zellen sind als n-fache Werte dieser Probe angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von Mittelwerten, die sich aus der jeweils dreimaligen Vermessung zweier getrennter Experimente ergaben.

### 3.1.3.3 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression am Ceramidstoffwechsel beteiligter Enzyme in humanen Keratinozyten

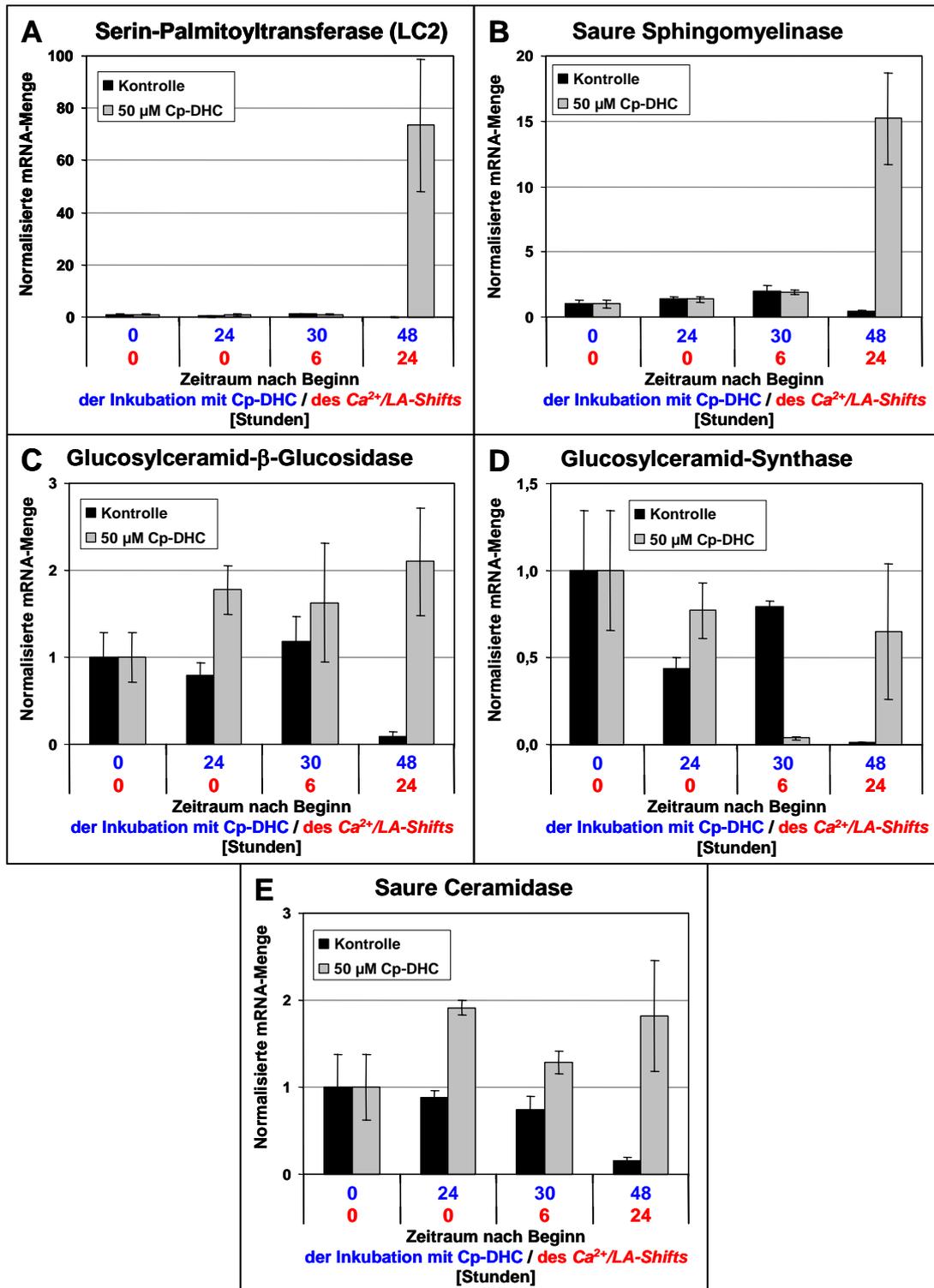
Auch der Einfluss von Cp-DHC auf die Expression einiger am Ceramidstoffwechsel beteiligter Enzyme in humanen Keratinozyten wurde untersucht (Abb. 3.18). Experimentell wurde dabei wie bereits in Kap. 3.1.3.2 beschrieben vorgegangen.

Es zeigte sich, dass die Transkription der Gene von Enzymen, die zur Bildung von Ceramid nötig sind, im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten durch 50  $\mu$ M Cp-DHC hochreguliert wurde. Die Expressionsrate der LC2-Untereinheit der Serin-Palmitoyltransferase (Abb. 3.18 A), des Schrittmacherenzyms der Ceramid-Biosynthese, blieb während der ersten Stunden der Inkubation mit Cp-DHC wie in den Kontrollzellen weitgehend konstant. 48 h nach Beginn der Inkubation mit Cp-DHC (24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts) war die mRNA-Menge der SPT jedoch 70-fach höher als zu Beginn der Inkubation mit Cp-DHC. In den Kontrollzellen blieb sie dagegen niedrig.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung der sauren Sphingomyelinase (Abb. 3.18 B), die durch Spaltung von Sphingomyelin ebenfalls Ceramid liefert. Bis 30 h nach Beginn der Inkubation mit Cp-DHC unterschieden sich die mRNA-Mengen der Sphingomyelinase in Zellen mit und ohne Zusatz von Cp-DHC nicht wesentlich voneinander. 18 h später war die Expressionsrate in mit Cp-DHC behandelten Keratinozyten jedoch rund 35-fach höher als in den Kontrollzellen zum selben Zeitpunkt.

Auch die Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase (Abb. 3.18 C), die durch Spaltung von Glucosylceramid Ceramid liefert, und die Glucosylceramid-Synthase (Abb. 3.18 D), welche umgekehrt Ceramid zu Glucosylceramid glucosyliert, wurden auf Transkriptionsebene durch Cp-DHC beeinflusst. Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Ceramiden für die Wasserpermeabilitätsbarriere der Epidermis (Kap. 2.4.2). Glucosylceramide dienen dabei als molekulare Vorläufer (*pro barrier*-Lipide) der frei extrahierbaren und der Protein-gebundenen Ceramide, die unter Wirkung der GlcCerase und Sap-C freigesetzt werden (Kap. 2.4.2) (Doering *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit diesem Modell wurden die GlcCerase- und die GlcCer-Synthase-mRNA von Cp-DHC in humanen Keratinozyten in die gleiche Richtung reguliert, nämlich in Richtung einer erhöhten mRNA-Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts. Zwar war die mRNA-Menge der GlcCer-Synthase 6 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts in den Kontrollzellen noch 20-fach höher als in Keratinozyten, die mit Cp-DHC behandelt worden waren, doch 18 h später hatte sich das Verhältnis umgekehrt. Zu diesem Zeitpunkt war die Expressionsrate der GlcCer-Synthase in Gegenwart von Cp-DHC mehr als 50-fach höher als in den unbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt (Abb. 3.18 D). Zu allen gewählten Zeitpunkten wurden für die GlcCerase in Gegenwart von Cp-DHC höhere mRNA-Mengen als in den Kontrollzellen gemessen. Der maximale Unterschied wurde 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts beobachtet, als die mit Cp-DHC behandelten Keratinozyten eine mehr als 20-fach höhere GlcCerase-mRNA-Menge enthielten als die unbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt (Abb. 3.18 C).

Ebenfalls in Gegenwart von Cp-DHC hochreguliert wurde Transkription der sauren Ceramidase (Abb. 3.18 E), die Ceramid in Sphingosin und eine freie Fettsäure spaltet. Zu allen gewählten Zeitpunkten wurden für die Ceramidase in mit Cp-DHC behandelten Keratinozyten höhere Expressionsraten als in den Kontrollzellen gemessen.



**Abb. 3.18 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression am Ceramidstoffwechsel beteiligter Enzyme in humanen Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.17 beschrieben kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Nach Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Mengen der Untereinheit LC2 der Serin-Palmitoyltransferase (A), der sauren Sphingomyelinase (B), der Glucosylceramid-β-Glucosidase (C), der Glucosylceramid-Synthase (D) und der sauren Ceramidase (E) mittels *Real-time* quantitativer PCR wie in Kap. 5.2.6 beschrieben. Die Darstellung der Daten entspricht derjenigen in Abb. 3.17.

48 h nach Beginn der Inkubation mit Cp-DHC (24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}$ /LA-Shifts) war die mRNA-Menge der sauren Ceramidase schließlich auf das 12-Fache des Kontrollwertes in den unbehandelten Zellen zum selben Zeitpunkt gestiegen.

Die hier beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Hemmung der Desaturase-Reaktion durch Cp-DHC den Keratinozyten-Stoffwechsel unter den gewählten Bedingungen insgesamt in Richtung einer vermehrten Bildung von Sphingosin dirigiert. Der weitere Metabolismus von Sphingosin führt schließlich zu Sphingosin-1-phosphat, welches im Gegensatz zu Ceramid in den meisten Zelltypen mitogene Effekte wie Proliferation vermittelt (Chalfant und Spiegel, 2005). Hierin liegt also ein weiterer Hinweis darauf, dass durch Hemmung der Insertion einer 4,5-Doppelbindung in das Sphingoidgerüst von Dihydroceramid die Differenzierung humaner Keratinozyten gestört wird.

### 3.1.4 Massenspektrometrischen Analyse von Metaboliten der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC

Wie endogen in der Zelle gebildet werden auch exogen an Zellkulturen verabreichte Ceramid-Analoga von verschiedenen Enzymen als Substrat gebunden und nachfolgend zu einer Vielzahl von Metaboliten verstoffwechselt (van Echten-Deckert *et al.*, 1998). Dazu gehören anabole Enzyme, die die Bildung von Glucosylceramid, Galaktosylceramid, Sphingomyelin und Ceramid-1-phosphat katalysieren, aber auch Ceramidasen mit unterschiedlichen pH-Optima, die Ceramid zu Sphingosin und einer freien Fettsäure abbauen.

Bei den Verbindungen Cp-DHC und Db-DHC handelt es sich um in 4,5-Position der Sphingoidbase modifizierte zellgängige Analoga des (Dihydro)ceramids mit verkürzter C12-Fettsäurekette (Abb. 3.1). Es ist deshalb denkbar, dass beide Verbindungen nach exogener Gabe und Eintritt in die Zelle dem gleichen Metabolismus unterliegen wie endogenes Ceramid und neben der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. 4-Hydroxylase auch Ceramid metabolisierenden Enzymen als Substrat dienen. So könnten Cp-DHC und Db-DHC z. B. in 1-Position glucosyliert oder mit Phosphorylcholin verestert werden, so dass Analoga von Glucosylceramid und Sphingomyelin entstünden. Weiterhin ist es möglich, dass die Sphingoidbasen der beiden Ceramid-Derivate nach Abspaltung der Laurinsäure durch eine Ceramidase mit endogenen langkettigen Fettsäuren reacyliert werden, so wie es bereits für andere kurzkettige Ceramid-Analoga beschrieben wurde (Ogretmen *et al.*, 2002).

Mit dem Ziel, Erkenntnisse über die Metabolisierung der beiden Ceramid-Derivate in humanen Keratinozyten zu gewinnen, sollten Lipidextrakte aus mit Cp-DHC bzw. Db-DHC behandelten Keratinozyten massenspektrometrisch analysiert werden.

Die massenspektrometrische Identifizierung einzelner Lipidspezies im Gesamtextrakt von Zellkulturen ist jedoch oft nicht eindeutig. Die Peaks exogen verabreichter Lipidanaloga und ihrer in geringen Konzentrationen im Extrakt vorliegenden Metabolite werden in im *full scan mode* aufgenommenen MS-Spektren von einer Vielzahl endogener Lipide überlagert (Daten nicht gezeigt). Im positiven Ionenmodus werden außerdem neben den Molekülionen  $[M+H]^+$  häufig die meist wesentlich intensiveren Peaks der Wasserabspaltungsprodukte  $[M-H_2O+H]^+$  detektiert, wodurch die Zahl der Signale zusätzlich erhöht wird. Die Interpretation der Spektren wird zudem dadurch erschwert, dass unterschiedliche Lipide isomer zueinander sein können. Insbesondere die Ceramide der Haut und humaner Keratinozyten sind einzigartig in ihrer strukturellen Vielfalt. Die Kettenlängen sowohl der Fettsäuren als auch der Sphingoidbasen erstrecken sich über einen großen Bereich und können auch ungeradzahlig sein (Wertz *et al.*, 1987). Hinzu kommt, dass beide Lipidbausteine bezüglich Hydroxylierung und Sättigungsgrad variieren können. Das hat zur Folge, dass zwei strukturell unterschiedliche Ceramide die gleiche Masse haben können. Das gilt unter Voraussetzung gleicher Kettenlängen z. B. für Cer(AS), das aus Sphingosin und einer in  $\alpha$ -Position hydroxylierten Fettsäure besteht, und Cer(NH), bei dem statt der Fettsäure die Sphingoidbase eine zusätzliche Hydroxylgruppe trägt. Strukturell unterschiedliche Ceramide gleicher Masse lassen sich jedoch anhand ihrer unterschiedlichen Fragmentierungsmuster in Tandem-MS-Messungen (MS/MS-Messungen) identifizieren. So entstehen bei der Fragmentierung von Cer(AS) hydroxylierte Fettsäurefragmente, während im Falle von Cer(NH) die Fragmente der Sphingoidbase eine zusätzliche Hydroxylgruppe tragen. Umgekehrt lassen sich bei Kenntnis eines bestimmten Fragmentions (Tochterions) Mutterionen registrieren, bei deren Fragmentierung dieses

spezifische Tochterion entsteht. Dieses Verfahren wird *parent ion scan* oder *precursor ion scan* genannt. Beim *neutral loss scan* werden dagegen nur jene Tochterionen registriert, die durch Abspaltung eines bestimmten Neutralteilchens entstanden sind, und dann die dazugehörigen Mutterionen angegeben.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde ein Massenspektrometer verwendet, in dem die Massen der durch *Electrospray Ionization* (ESI) erzeugten Ionen mittels eines Quadrupol-Flugzeit-Analysators (*Quadrupol Time of Flight*, QToF) vermessen werden. Die über MS/MS zu analysierenden Ionen werden von einem zweiten Quadrupol durch eine Kollisionskammer geleitet, wo sie mit Argonmolekülen zusammenstoßen und weiter zerfallen. Die dabei entstandenen Fragmentionen treten anschließend in ein feldfreies und evakuiertes Flugrohr ein und werden dort anhand ihrer massenabhängigen Flugzeit aufgetrennt und registriert.

#### 3.1.4.1 Analyse von Cp-DHC und Db-DHC mittels ESI-MS/MS

Die Analyse von Metaboliten der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC im Gesamtlipidextrakt von Keratinozyten sollte durch Kenntnis ihrer Fragmentierungsmuster in MS/MS-Messungen erleichtert werden. Ließen sich nämlich für beide Verbindungen jeweils ein oder mehrere spezifische Fragmentionen identifizieren, könnte im Gesamtlipidextrakt mittels eines *parent ion scans* gezielt nach Mutterionen des jeweiligen Fragmentions gesucht werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, neben den im Extrakt in hohen Konzentrationen vorliegenden endogenen Ceramiden Metabolite von Cp-DHC bzw. Db-DHC zu identifizieren.

Mit dem Ziel, für Cp-DHC und Db-DHC spezifische Fragmentionen zu finden, wurden zunächst ESI-MS/MS-Spektren der beiden reinen Verbindungen sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus vermessen. Den zu vermessenden Proben wurde dazu Ammoniumacetat zugesetzt, um die Bildung von Natriumaddukten zu unterdrücken. Natriumaddukte lassen sich in der Regel nur schlecht fragmentieren bzw. zeigen komplizierte und schwer interpretierbare Fragmentierungsmuster.

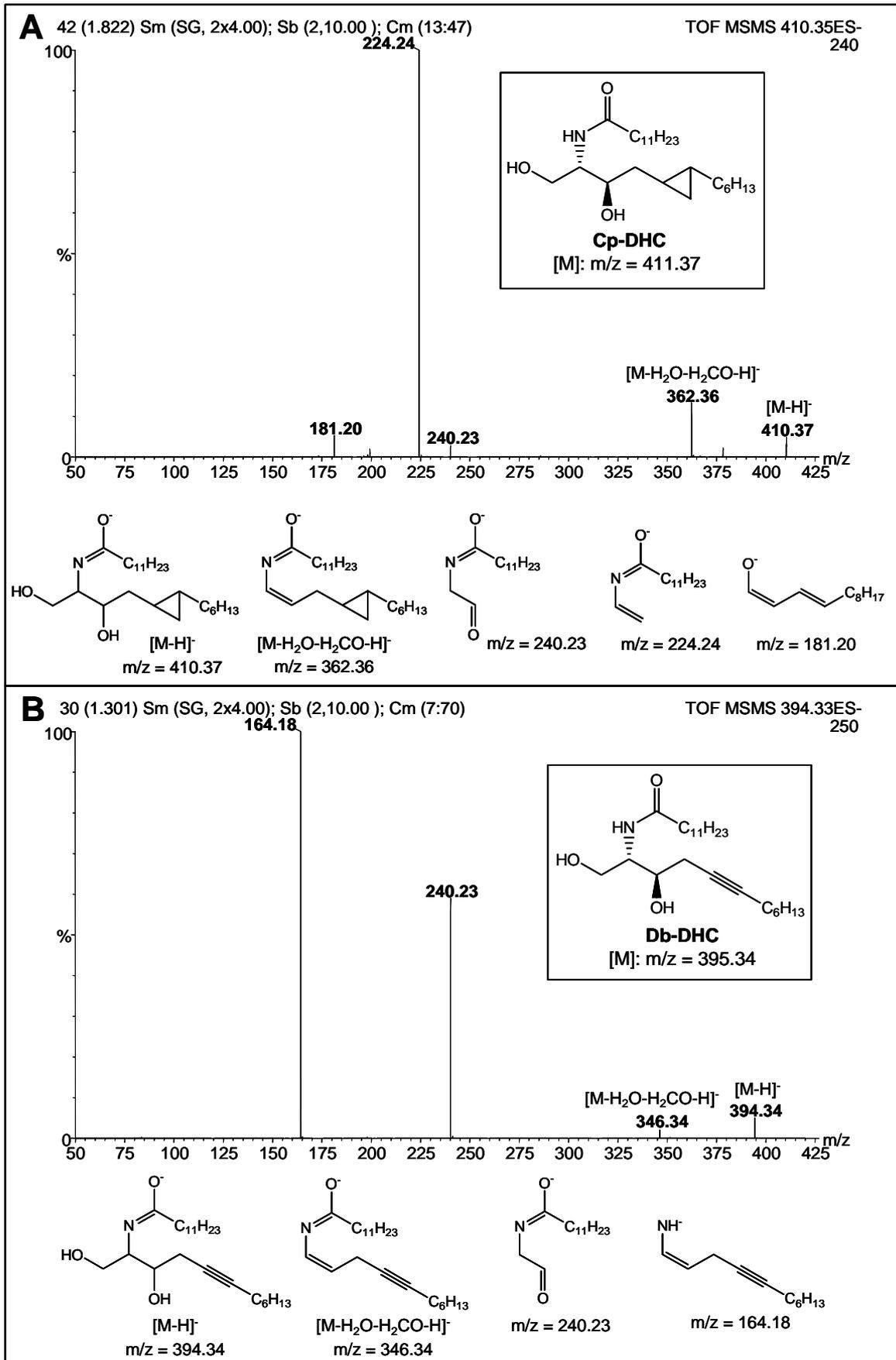
Je nach Polarität wurden für Cp-DHC und Db-DHC verschiedene Fragmentspektren erhalten. Im positiven Ionenmodus entsprach die Art der Fragmentierung von Cp-DHC (Abb. 3.19) und Db-DHC (Abb. 3.20) im wesentlichen derjenigen, die für natürliche Ceramide beschrieben wurde (Gu *et al.*, 1997). So dominierten in den Spektren beider Analoga das durch Abspaltung der Fettsäure freigesetzte Ion der Sphingoidbase ( $[B+H]^+$ ) und diejenigen Fragmente, die durch Verlust von ein oder zwei Molekülen Wasser aus dem Molekülion ( $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M-2H_2O+H]^+$ ) bzw. aus der Sphingoidbase ( $[B-H_2O+H]^+$ ,  $[B-2H_2O+H]^+$ ) entstanden waren. Die Strukturen dieser Fragmentionen zeigten, dass während der Fragmentierung sowohl der Cyclopropyl-Ring von Cp-DHC als auch die Dreifachbindung von Db-DHC weitgehend stabil waren und erhalten blieben. Die Fragmentionen  $[B-H_2O+H]^+$  und  $[B-2H_2O+H]^+$  sollten beim Zerfall der meisten in Zellkultur gebildeten Metabolite von Cp-DHC und Db-DHC entstehen, so z. B. auch bei der Fragmentierung von glucosylierten oder mit endogenen Fettsäuren reacylierten Stoffwechselprodukten der beiden Analoga. Die Fragmentmassen 194.19 amu und 212.20 amu (Abb. 3.19) bzw. 178.16 amu und 196.17 amu (Abb. 3.20) sind spezifisch für Cp-DHC bzw. Db-DHC und daher als Tochterionen bei Durchführung eines *parent ion scans* zur Identifizierung von Metaboliten im Gesamtlipidextrakt von Keratinozytenkulturen geeignet.





Bei der Fragmentierung natürlicher Sphingomyeline wird das Ceramidgerüst als Neutralteilchen abgespalten, so dass die Ladung bei der Phosphorylcholin-Kopfgruppe verbleibt. Diese liefert ein spezifisches Fragmentation mit  $m/z = 184.07$  amu (Merrill *et al.*, 2005), das auch bei der MS/MS-Fragmentierung möglicher Sphingomyelinanaloge von Cp-DHC und Db-DHC auftreten sollte. Dagegen sind die oben genannten Fragmentationen der Sphingoidbase nicht zu erwarten. Möglicherweise lassen sich jedoch Cp-DHC- bzw. Db-DHC-Metabolite mit Phosphorylcholin-Kopfgruppe mittels eines *parent ion scans* nach dem Fragment mit  $m/z = 184.07$  amu unter Berücksichtigung der Gesamtmasse möglicher Sphingomyelinanaloge von Cp-DHC bzw. Db-DHC identifizieren.

Im negativen Ionenmodus wurden für beide untersuchten Verbindungen nur wenige Fragmente erhalten und in Anlehnung an ESI-MS/MS-Spektren von Ceramiden des *stratum corneum* (Vietzke *et al.*, 2001) identifiziert (Abb. 3.21). Neben einem Peak von schwacher Intensität, der jeweils durch den Verlust von Wasser und Formaldehyd entstanden war ( $m/z = 362.36$  amu für Cp-DHC in Abb. 3.21 A und  $m/z = 346.34$  amu für Db-DHC in Abb. 3.21 B), zeigten Cp-DHC und Db-DHC im Gegensatz zu den im Positivmodus vermessenen Spektren im Negativmodus unterschiedliche Fragmentierungsmuster. Mit Ausnahme des für Db-DHC erhaltenen Fragmentations bei  $164.18$  amu (Abb. 3.21 B) enthielten die anderen Zerfallsprodukte nicht die charakteristischen Strukturelemente der beiden untersuchten Verbindungen. Offensichtlich wiesen der Cyclopropyl-Ring und die Dreifachbindung bei Fragmentierung im negativen Ionenmodus nicht so eine hohe Stabilität auf wie bei einer Vermessung im Positivmodus. Die Identifizierung von Metaboliten der Verbindungen Cp-DHC und Db-DHC im negativen Ionenmodus ist daher allenfalls über *neutral loss scans* denkbar, bei denen nach Tochterionen gesucht wird, die durch Abspaltung von Teilen der Sphingoidbase als Neutralteilchen entstanden sind. Ein weiterer allgemeiner Nachteil ist die schlechtere Ionisierbarkeit von Sphingolipiden im negativen Ionenmodus.



**Abb. 3.21** ESI-MS/MS-Spektren (negativer Ionenmodus) und Strukturen möglicher Fragmentationen von Cp-DHC (**A**) und Db-DHC (**B**)

### 3.1.4.2 Massenspektrometrische Analyse von Metaboliten von Cp-DHC und Db-DHC im Gesamtlipidextrakt humaner Keratinozyten

Zur massenspektrometrischen Analyse von Metaboliten der beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC wurden humane Keratinozyten in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium zur Differenzierung angeregt. Dann wurden die Zellen 4 Tage mit Cp-DHC bzw. Db-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium inkubiert und anschließend geerntet. Die Lipide wurden extrahiert und die Phospholipide durch eine milde alkalische Hydrolyse abgebaut. Zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Bestandteile von RP-18-Material, die die massenspektrometrische Analyse stören könnten, wurden die Lipidextrakte anschließend in einem alternativen Reinigungsverfahren in Anlehnung an die Bligh-Dyer-Methode entsalzt (Signorelli und Hannun, 2002). Die gereinigten Gesamtlipidextrakte wurden mittels ESI-MS im positiven Ionenmodus analysiert. Über *parent ion scans* wurde nach Mutterionen gesucht, die die zuvor ermittelten Fragmentationen von Cp-DHC (194.19 amu und 212.20 amu) bzw. Db-DHC (178.16 amu und 196.17 amu) abgespalten hatten. Dabei wurden *N*-Acyl-Metabolite sowohl von Cp-DHC als auch von Db-DHC identifiziert, die aus Abspaltung der Laurinsäure durch eine Ceramidase und anschließender Reacylierung mit endogenen Fettsäuren entstanden waren (Tab. 3.1).

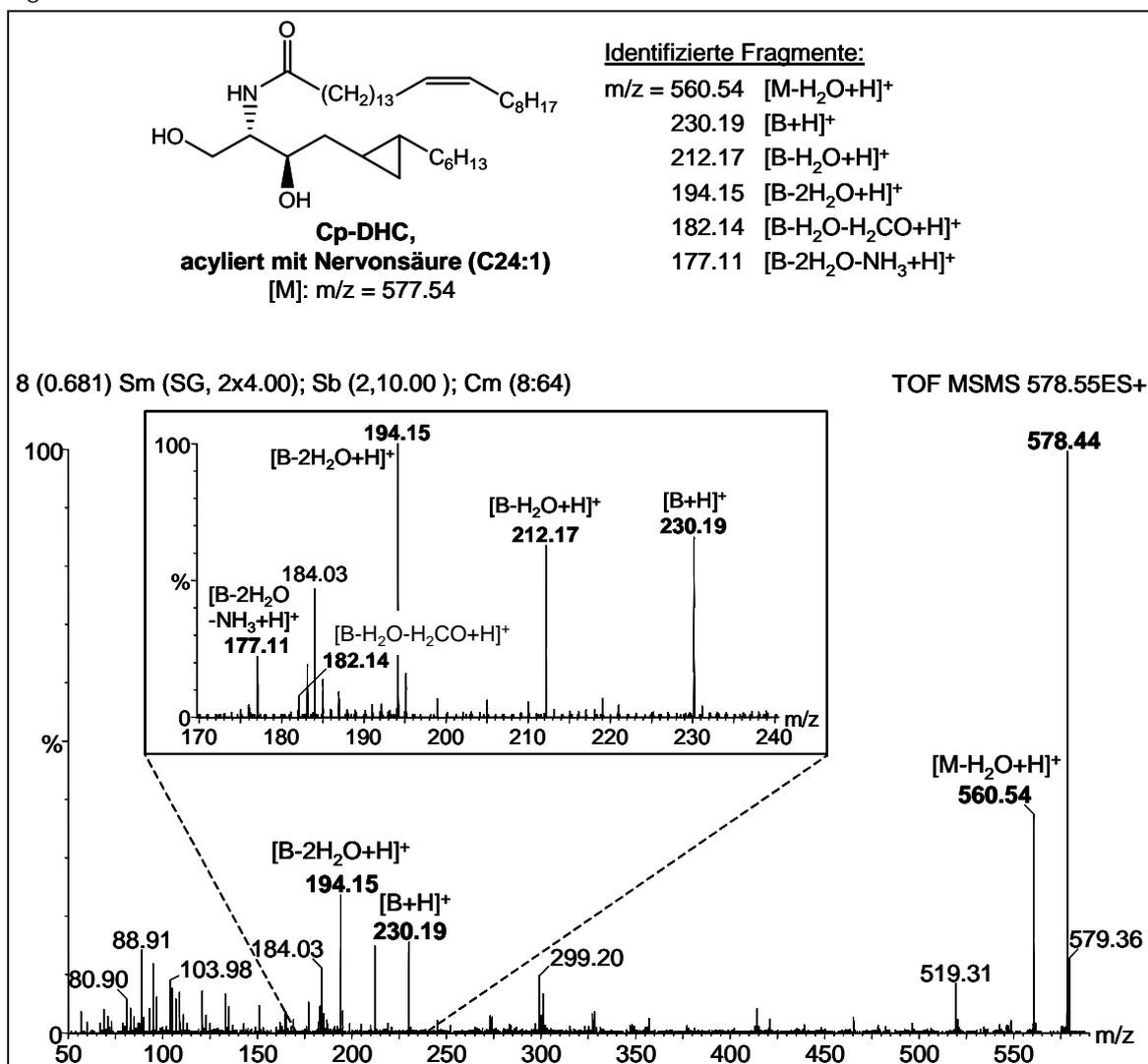
<b><i>N</i>-Acyl-Metabolite von Cp-DHC</b>				
Molekulare Massen				
<b>Art der Fettsäure</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> exp. bestimmt</b>	<b>[M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> exp. bestimmt</b>
C14:0	440.41	440.38	422.40	422.39
C16:0	468.44	468.36	450.43	450.41
C16:0, $\alpha$ -hydroxyliert	484.43	484.34	466.42	466.41
C18:0	496.47	496.38	478.46	478.45
C18:1	494.46	494.37	476.45	476.45
C22:0	552.54	552.39	534.53	534.49
C24:1	578.55	578.44	560.54	560.54
C26:0	608.60	608.44	590.59	590.59
C28:1	634.61	634.46	616.60	616.60
<b><i>N</i>-Acyl-Metabolite von Db-DHC</b>				
Molekulare Massen				
<b>Art der Fettsäure</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> exp. bestimmt</b>	<b>[M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> berechnet</b>	<b>[M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> exp. bestimmt</b>
C16:0	452.40	452.34	434.39	434.34
C24:0	564.54	564.54	546.53	546.55
C26:0	592.57	592.48	574.56	574.58
C28:1	618.58	618.59	600.57	600.60

**Tab. 3.1** Berechnete und bei der massenspektrometrischen Analyse im Gesamtlipidextrakt humaner differenzierter Keratinozyten bestimmte Massen von *N*-Acyl-Metaboliten von Cp-DHC und Db-DHC. Angegeben sind jeweils die Massen des Moleküliions [M+H]<sup>+</sup> und des Ions nach Wasserabspaltung aus dem Moleküliion [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>

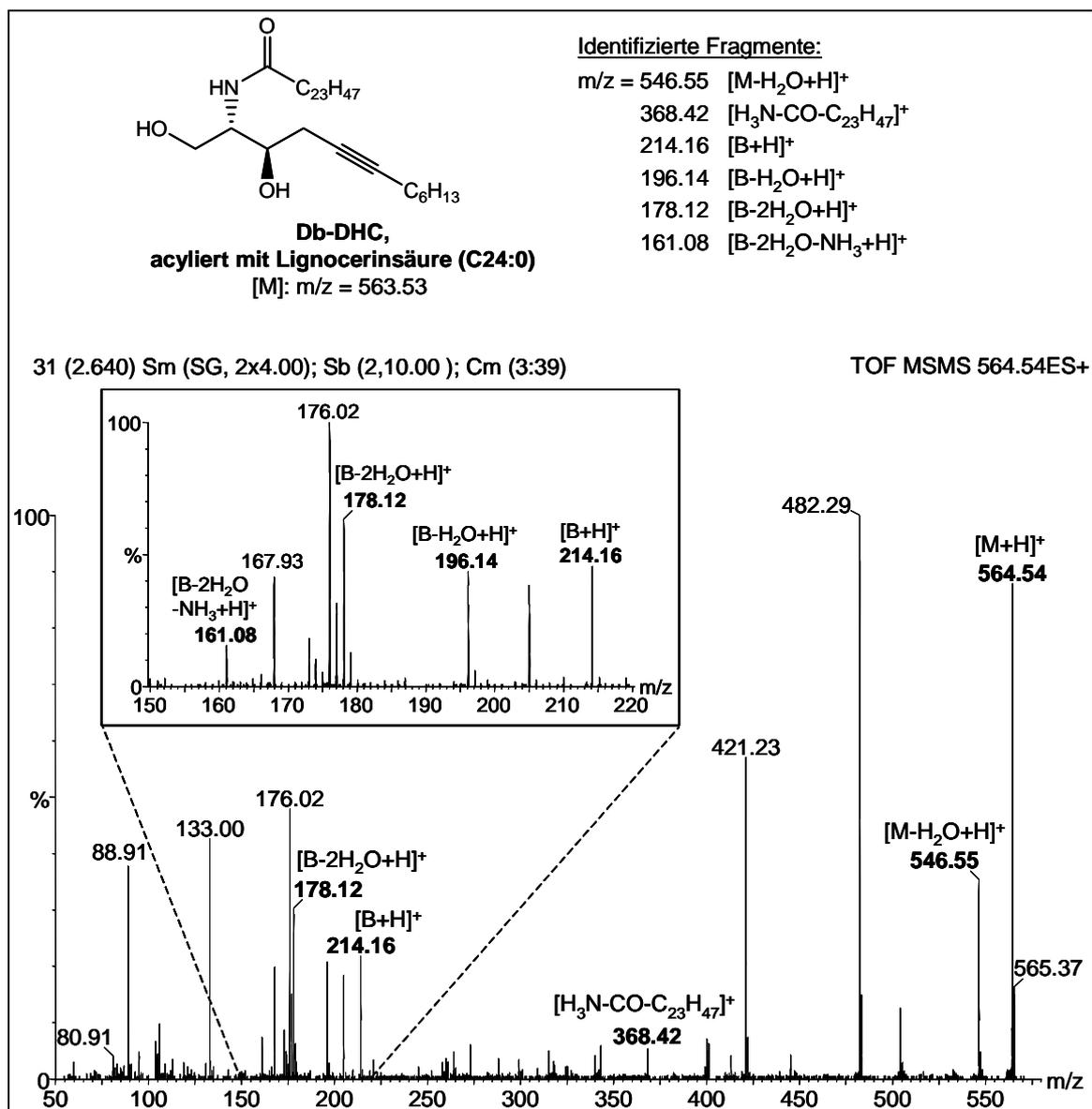
Parallel wurde zur Kontrolle ein Lipidextrakt aus Keratinozyten, die ohne Zusatz der beiden Dihydroceramid-Analoga kultiviert worden waren, analog behandelt und massenspektromterisch untersucht. Die in Tab. 3.1 angegebenen Mutterionen wurde darin nicht gefunden.

Aus Tab. 3.1 geht hervor, dass von beiden untersuchten Verbindungen Metabolite gefunden wurden, die sowohl mit recht kurzen (C14, C16) als auch mit langkettigen Fettsäuren (C24, C26, C28) acyliert waren. Ebenso wurden Derivate mit einfach ungesättigten (C18:1, C24:1, C28:1) und im Falle von Cp-DHC auch ein Metabolit mit in  $\alpha$ -Position hydroxylierter Palmitinsäure identifiziert. Stoffwechselprodukte von Cp-DHC und Db-DHC, die die in differenzierten Keratinozyten vorkommenden sehr langkettigen  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren mit bis zu 36 Kohlenstoffatomen enthielten, wurden dagegen nicht gefunden. Dass für Db-DHC insgesamt weniger *N*-Acyl-Metabolite identifiziert wurden als für Cp-DHC, ist wahrscheinlich darin begründet, dass der Lipidextrakt der mit Db-DHC inkubierten Zellen niedriger konzentriert war.

Von den identifizierten *N*-Acyl-Metaboliten von Cp-DHC und Db-DHC wurden ESI-MS/MS-Spektren aufgenommen, von denen jeweils eines in Abb. 3.22 und Abb. 3.23 exemplarisch dargestellt ist.



**Abb. 3.22** Struktur, ESI-MS/MS-Spektrum und Fragmentationen des mit Nervonsäure (C24:1) acylierten Metaboliten von Cp-DHC aus dem Gesamtlipidextrakt von mit Cp-DHC inkubierten humanen differenzierten Keratinozyten (B = Sphingoidbase)



**Abb. 3.23** Struktur, ESI-MS/MS-Spektrum und Fragmentationen des mit Lignocerinsäure (C24:0) acylierten Metaboliten von Db-DHC aus dem Gesamtlipidextrakt von mit Db-DHC inkubierten humanen differenzierten Keratinozyten (B = Sphingoidbase)

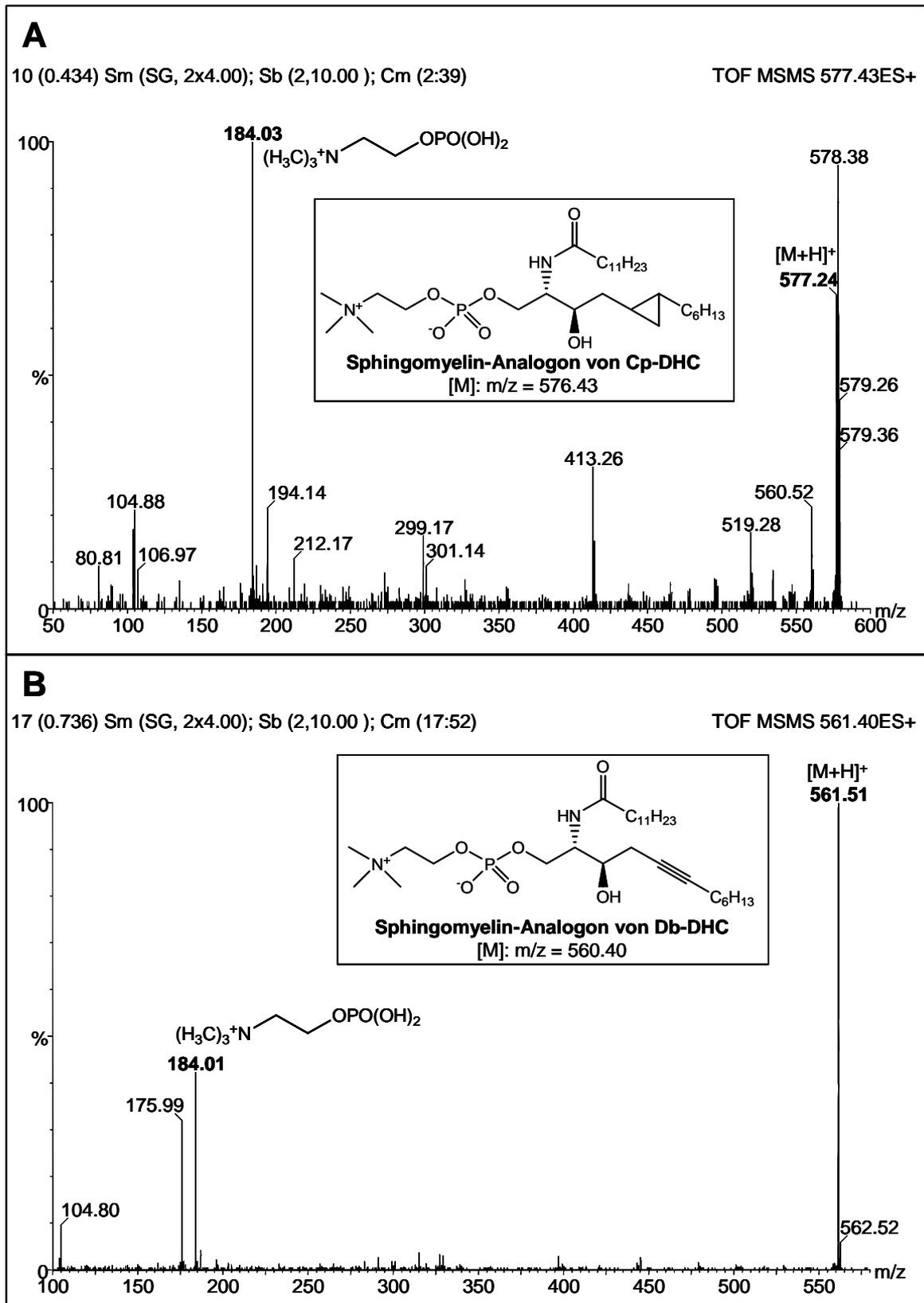
Die aus dem jeweiligen MS/MS-Spektrum für die einzelnen *N*-Acyl-Metabolite ermittelten Massen der Molekülonen [M+H]<sup>+</sup> wichen häufig um bis zu 0.16 amu von den berechneten Werten ab (Tab. 3.1, Abb. 3.22). Der Grund dafür liegt darin, dass der zu fragmentierende Massenpeak des jeweiligen Metaboliten im ESI-MS-Spektrum häufig von einer Vielzahl von Peaks anderer, endogener Lipide des Extraktes überlagert war, die annähernd die gleiche Masse hatten. Der zu fragmentierende Bereich ist nicht beliebig klein wählbar, so dass im MS/MS-Spektrum auch nicht zuzuordnende Fragmentmassen, die von der Fragmentierung überlagernder Lipide herrühren, auftreten. Die Massen der bei der Fragmentierung durch Wasserabspaltung entstandenen und für die Metabolite spezifischen Fragmentationen [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> stimmten jedoch mit den berechneten Werten überein (Tab. 3.1).

Glucosylceramid-Analoga von Cp-DHC oder Db-DHC, d. h. in 1-Position durch die Glucosylceramid-Synthase glucosylierte Metabolite, konnten nach der oben beschriebenen Methode über *parent ion scans* im Lipidextrakt nicht identifiziert werden. Auch *neutral loss scans*, bei denen nach Tochterionen gesucht wurde, die durch Abspaltung von Neutralteilchen wie Glucose (162.05 amu) oder Glucose und Wasser (162.05 amu + 18.01 amu = 180.06 amu) entstanden waren, brachten diesbezüglich keinen Erfolg.

Dagegen konnten Sphingomyelin-Analoga von Cp-DHC (Abb. 3.24 A) und Db-DHC (Abb. 3.24 B), die durch Veresterung der 1-Hydroxgruppe mit Phosphorylcholin durch die Sphingomyelin-Synthase entstanden waren, im Gesamtlipidextrakt der mit Cp-DHC bzw. Db-DHC behandelten Keratinozyten identifiziert werden. Dies geschah über *parent ion scans*, bei denen nach Mutterionen gesucht wurde, die das für Sphingomyeline spezifische Phosphorylcholin-Fragment mit  $m/z = 184.07$  amu abgespalten hatten. In ESI-MS/MS-Spektren von Sphingomyelinen ist dieses Fragment in der Regel dominierend. Fragmente des Ceramid-Rückgrats oder der Sphingoidbase treten dagegen kaum auf (Merrill *et al.*, 2005). So war auch im MS/MS-Spektrum des Sphingomyelin-Analogons von Db-DHC (Abb. 3.24 B) keines der im Spektrum der Reinsubstanz (Abb. 3.20) auftretenden Fragmentationen zu finden. Aufgrund der Molekülionmasse  $[M+H]^+$  mit  $m/z = 561.51$  amu handelte es sich jedoch tatsächlich um einen Metabolit von Db-DHC, da endogene Sphingomyeline wegen ihrer wesentlich längeren Fettsäureketten und Sphingoidbasen deutlich höhere Molekulargewichte haben.

Im MS/MS-Spektrum des Sphingomyelin-Analogons von Cp-DHC traten dagegen neben dem Peak bei 184.07 amu auch die bereits beschriebenen Fragmentationen der Sphingoidbase (194.14 amu und 212.17 amu) auf, allerdings in geringer Intensität (Abb. 3.24 B). Auffällig war außerdem, dass der Peak des Molekülions  $[M+H]^+$  (577.24 amu) von einem sehr intensiven Peak mit  $m/z = 578.38$  amu überlagert war. Bei diesem Peak handelte es sich um den Molekülpeak des mit Nervensäure acylierten Metaboliten von Cp-DHC (Abb. 3.22). Dieser wurde bei der Vermessung des MS/MS-Spektrums des Sphingomyelin-Analogons von Cp-DHC offensichtlich mit fragmentiert, so dass das Auftreten der Sphingoidbasen-Fragmente erklärbar ist. Dafür spricht auch, dass Phosphorylcholin-Fragment bei 184.07 amu auch in geringer Intensität im MS/MS-Spektrum des mit Nervensäure acylierten Metaboliten von Cp-DHC zu finden ist (Abb. 3.22).

Sphingomyelin-Analoga von Cp-DHC und Db-DHC, bei denen möglicherweise die *N*-Acylkette durch endogene längerkettige Fettsäuren ersetzt waren, konnten im Lipidextrakt nicht zweifelsfrei identifiziert werden, da ihre Molekulargewichte nicht eindeutig von denjenigen endogener Sphingomyeline unterscheidbar waren.



**Abb. 3.24** Strukturen und ESI-MS/MS-Spektren der mit einer Phosphorylcholin-Kopfgruppe versehenen Metabolite (Sphingomyelin-Analoga) von Cp-DHC (**A**) und Db-DHC (**B**) aus dem Gesamtlipidextrakt von mit Cp-DHC bzw. Db-DHC inkubierten humanen differenzierten Keratinozyten



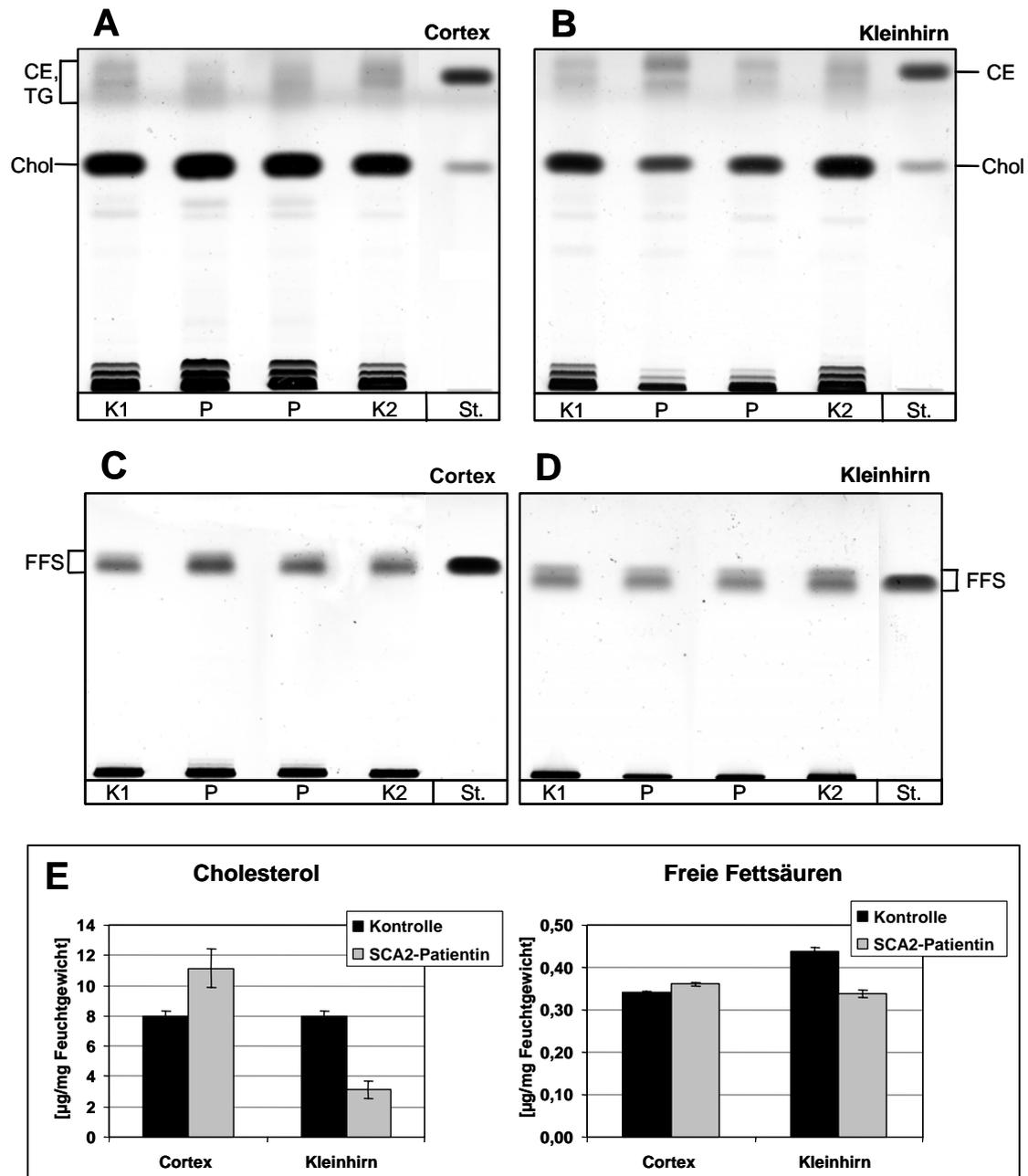
## 3.2 Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 (SCA2)

In jüngerer Zeit mehren sich die Hinweise, dass an neurodegenerativen Polyglutaminerkrankungen wie den Spinocerebellären Ataxien oder Chorea Huntington eine Störung des Lipidstoffwechsels beteiligt sein könnte (Clifford *et al.*, 2002; Djousse *et al.*, 2002). Zwar zeigen homozygote SCA2-*knock out*-Mäuse keine Anzeichen einer neuronalen Bewegungsstörung (Kiehl *et al.*, 2006), jedoch leiden sie im Vergleich zu Kontrolltieren bereits 12 Wochen postnatal an einer ausgeprägten Adipositas (I. Lastres-Becker, persönliche Mitteilung). Dagegen beobachtet man bei SCA2-Patienten schon sehr früh im Krankheitsverlauf eine Reduktion des Unterhautfettgewebes (C. Seifried, persönliche Mitteilung). Mit dem Ziel, Erkenntnisse über eine mögliche Störung des Lipidstoffwechsels im Zusammenhang mit SCA2 zu gewinnen, sollten im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. Georg Auburger, Klinik für Neurologie der Universität Frankfurt/Main, die Lipidzusammensetzungen von unterschiedlichen Hirnarealen sowohl einer SCA2-Patientin als auch von SCA2-*knock out*-Mäusen analysiert werden.

### 3.2.1 Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen einer SCA2-Patientin

Die Analysen wurden an gefrorenen Autopsien, die von Frau Dr. Carola Seifried aus dem Arbeitskreis von Prof. Auburger zur Verfügung gestellt worden waren, durchgeführt. Sie stammten aus dem Kleinhirn und dem Cortex einer Patientin mit einer Expansion im SCA2-Gen auf 52 CAG-Codons, die im Alter von 25 Jahren im Endstadium der Erkrankung verstorben war. Zum Vergleich diente Kontrollgewebe aus den gleichen Hirnarealen zweier Patientinnen ähnlichen Alters, von denen die eine mit 21 Jahren an Primärer Lungenfibrose und die andere 23-jährig an der chronischen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* verstorben war. Während das Kleinhirn bei SCA2 stark betroffen ist, bleibt der Cortex weitgehend erhalten (Prof. H. Braak, unveröffentlichte Beobachtung). Aus diesem Grund waren im Kleinhirn weitaus stärkere Veränderungen als im Cortex zu erwarten.

Nach Homogenisierung der Gewebeproben wurden die Lipide extrahiert, in anionische und neutrale Lipidfraktionen getrennt und dünnschichtchromatographisch analysiert. Dabei waren im Cortex und im Kleinhirn der SCA2-Patientin im wesentlichen entgegengesetzte Veränderungen zu beobachten. Während der Cholesterolgehalt im SCA2-Cortex auf das 1.4-Fache des Wertes im Kontrollgewebe erhöht war (Abb. 3.25 A, E), war er im Kleinhirn der SCA2-Patientin stark erniedrigt und betrug nur noch 40 % des Kontrollhirns (Abb. 3.25 B, E). Bei der Untersuchung des Gehalts an freien Fettsäuren ergab sich ein ähnliches Bild, wenn auch die Unterschiede hier nicht so stark ausgeprägt waren. Im Cortex der SCA2-Patientin war die Fettsäuremenge gegenüber dem Kontrollgewebe nahezu unverändert (Abb. 3.25 C, E), das SCA2-Kleinhirn zeigte dagegen einen um 23 % niedrigeren Fettsäuregehalt als das gesunde Gewebe (Abb. 3.25 D, E).



**Abb. 3.25** Gehalt an Cholesterol (A, B) und freien Fettsäuren (C, D) in Cortex und Kleinhirn einer SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe

Gewebeprobe aus dem Cortex und dem Kleinhirn der SCA2-Patientin (P) und zweier Kontrollpatientinnen (K1 und K2) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Nach Extraktion der Lipide wurden diese mittels Anionenaustauschchromatographie in anionische und neutrale Lipidfraktionen getrennt und dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v)). Die Lipidbanden wurden durch Anfärben mit einem Phosphorsäure-Kupfersulfat-Reagenz bei 180 °C visualisiert und densitometrisch anhand von mit Standardsubstanzen erstellten Eichkurven quantifiziert. Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 10 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=4) sind in E dargestellt.

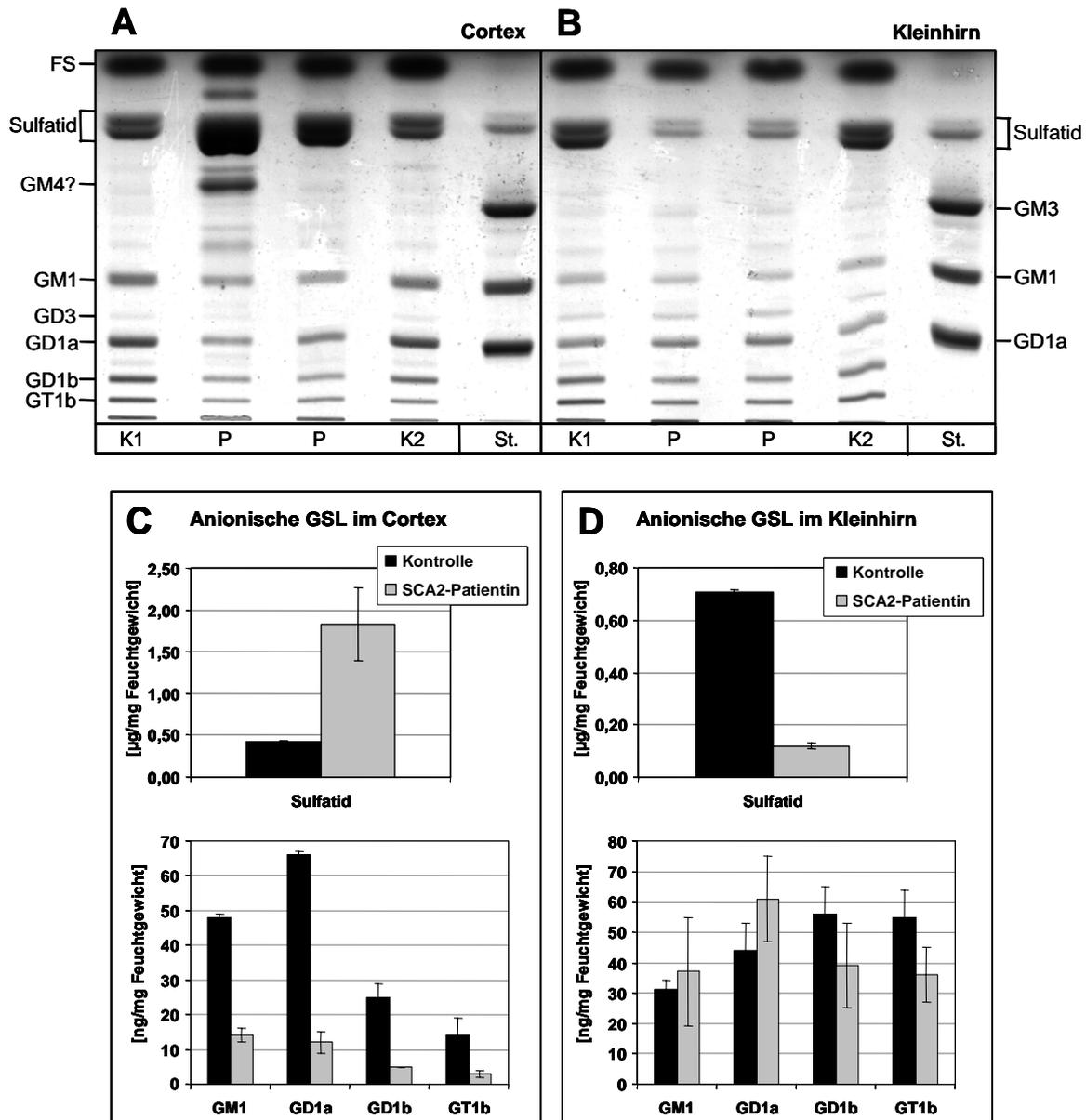
(CE = Cholesterolester, Chol = Cholesterol, TG = Triacylglyceride, FFS = freie Fettsäuren, St. = Standard)

Auch bei Betrachtung des Gehalts an anionischen GSL (Abb. 3.26) zeigten sich starke, in Cortex und Kleinhirn entgegengesetzt verlaufende Veränderungen. Besonders auffällig war der Unterschied beim Sulfatid, das in hohen Konzentrationen in den multilamellaren Schichten des die Nervenzellaxone umgebenden Myelins auftritt und biosynthetisch aus dem nach Cholesterol zweithäufigsten Myelinlipid Galaktosylceramid (GalCer) entsteht (Sundaram und Lev, 1992; Coetzee *et al.*, 1998). Die Sulfatidmenge im SCA2-Cortex war wie der Cholesterolgehalt erhöht und betrug das 4.3-Fache des Wertes im Kontrollgewebe (Abb. 3.26 A, C). Im Kleinhirn der SCA2-Patientin war der Sulfatidgehalt dagegen im Vergleich zum Kontrollhirn um 83 % niedriger (Abb. 3.26 B, D), was auf eine Schädigung der Myelinscheiden im von der Krankheit stark betroffenen Kleinhirn von SCA2-Patienten hinweist.

Bemerkenswert war außerdem das Auftreten einer recht starken unbekanntes Bande in einigen Cortexproben der SCA2-Patientin (Abb. 3.26 A). Aufgrund des  $R_f$ -Wertes der Bande könnte es sich hierbei möglicherweise um das Gangliosid GM4 handeln, das durch Übertragung einer durch Cytidinmonophosphat aktivierten *N*-Acetylneuraminsäure (CMP-NeuAc) auf GalCer gebildet wird. GM4 geht damit biosynthetisch aus dem gleichen Vorläufermolekül hervor wie Sulfatid und tritt wie dieses in wesentlich höheren Mengen in der Myelin-haltigen weißen als in der grauen Hirnsubstanz auf (Sasstry, 1985). Ob es sich bei der unbekanntes Bande tatsächlich um GM4 handelt, muss jedoch noch geklärt werden.

Die Ganglioside GM1, GD1a, GD1b und GT1b, die im Vergleich zu GalCer und Sulfatid nur in geringen Konzentrationen im Myelin, sondern hauptsächlich in der neuronalen Plasmamembran und damit in der grauen Hirnsubstanz zu finden sind (Ledeen und Wu, 1992), waren in ihrem Gehalt im Cortex der SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Gewebe um bis zu 80 % erniedrigt (Abb. 3.26 A, C). Im Kleinhirn wurden dagegen nicht so starke Unterschiede wie im Cortex beobachtet. Zudem ergaben sich für die hier ermittelten Werte zum Teil recht hohe Abweichungen. Während die Mengen an GM1 und GD1a im Kleinhirn der SCA2-Patientin ein wenig höher zu sein schienen als in den Kontrollproben, waren GD1b und GT1b in ihrem Gehalt eher erniedrigt (Abb. 3.26 B, D).

Auch die quantitative Analyse der neutralen Sphingolipide zeigte, dass im von der Erkrankung stark geschädigten Kleinhirn der SCA-Patientin vor allem ein Mangel an Myelinlipiden vorlag und eben diese Lipide dagegen im Cortex der Patientin in größeren Mengen als in Cortexgewebe von gesunden Patientinnen vorkamen. So betrug die GalCer-Menge im Cortex der SCA2-Patientin das 2.4-Fache des Wertes im Kontrollgewebe (Abb. 3.27), während sie im SCA2-Kleinhirn stark reduziert war. Hier war der GalCer-Gehalt um 85 % niedriger als im gesunden Kleinhirn (Abb. 3.28). Während GalCer und sein 4-Epimer GlcCer bei Chromatographie auf nicht vorbehandelten Kieselgelplatten den gleichen  $R_f$ -Wert aufweisen, lassen sie sich auf mit Natriumborat imprägnierten DC-Platten voneinander trennen. Bei Verwendung solch vorbehandelter Platten konnte in keiner der untersuchten Hirnproben GlcCer nachgewiesen werden (Abb. 3.27 A, Abb. 3.28 A). Die beobachteten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgewebe betrafen also ausschließlich das Myelinlipid GalCer und wurden nicht von möglichen Abweichungen im GlcCer-Gehalt überlagert.



**Abb. 3.26** Gehalt an anionischen Glykosphingolipiden in Cortex (A, C) und Kleinhirn (B, D) einer SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe

Gewebeprobe aus dem Cortex und dem Kleinhirn der SCA2-Patientin (P) und zweier Kontrollpatientinnen (K1 und K2) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Nach Extraktion der Lipide wurden die Phospholipide durch eine milde alkalische Hydrolyse abgebaut. Die verbleibenden Lipide wurden mittels Anionenaustauschchromatographie in anionische und neutrale Lipidfraktionen getrennt und die anionischen Fraktionen dünnstichtchromatographisch analysiert (Laufmittel: Chloroform/Methanol/0.22 % Calciumchlorid in Wasser 55:45:10 (v/v/v)). Die Lipidbanden wurden durch Anfärben mit einem Phosphorsäure-Kupfersulfat-Reagenz bei 180 °C visualisiert und densitometrisch anhand von mit Standardsubstanzen erstellten Eichkurven quantifiziert. Die bei der alkalischen Hydrolyse freigesetzten Fettsäuren wurden nicht quantifiziert. Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 10 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=4) sind in **C** (Cortex) und **D** (Kleinhirn) dargestellt.

(GSL = Glykosphingolipide, FS = Fettsäuren, St. = Standard)

Sphingomyelin (SM) tritt wie andere Sphingolipide aufgrund der Acylierung der Sphingoidbase mit unterschiedlich langen Fettsäuren im DC als Doppelbande auf. Bei Chromatographie an Kieselgel weisen Sphingomyeline mit kürzeren Fettsäureketten aufgrund ihrer höheren Polarität einen geringeren  $R_f$ -Wert auf als ihre langkettigen Analoga. Bei der Untersuchung des SM-Gehalts im SCA2-Hirngewebe fiel auf, dass die Mengen langkettigen Sphingomyelins hier im Vergleich zum Kontrollgewebe sehr viel stärkeren Veränderungen unterworfen waren als die Mengen kurzkettigen Sphingomyelins. So war der Gehalt an langkettigem SM im Cortex der SCA2-Patientin 3.7-fach höher als in gesundem Cortexgewebe, während die Menge kurzkettigen Sphingomyelins kaum verändert war (Abb. 3.27). Auch im SCA2-Kleinhirn unterschied sich der Gehalt an kurzkettigem SM nur geringfügig vom Kontrollwert. Die Menge langkettigen Sphingomyelins war dagegen stark erniedrigt und betrug nur ein Viertel der Menge in gesundem Kleinhirngewebe (Abb. 3.28). Bezüglich des Gehalts an langkettigem SM wurden also wiederum gegenläufige Veränderungen in Cortex und Kleinhirn der SCA2-Patientin beobachtet.

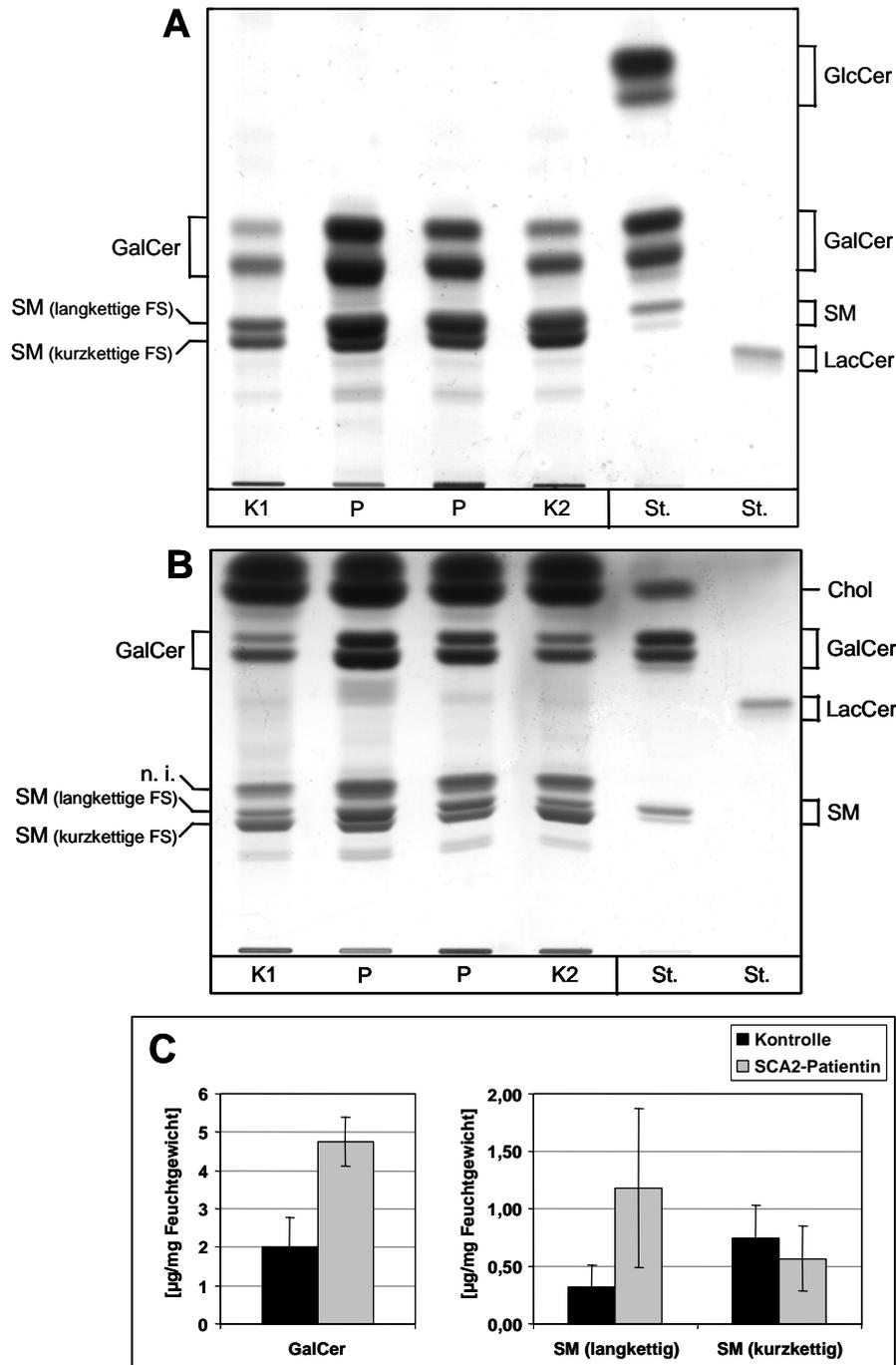
Aus Tab. 3.1 ist die Fettsäurezusammensetzung von SM in humanem Hirngewebe, aufgeschlüsselt nach grauer und weißer Hirnsubstanz, ersichtlich.

Gewebe	Fettsäurezusammensetzung [Gewichts-%]									
	16:0	18:0	18:1	20:0	22:0	23:0	24:0	24:1	25:1	26:1
Hirn	6.4	47.0	3.2	1.0	3.6		4.5	30.9		
Graue Substanz	6.8	61.9	2.6	2.7	1.1	1.5	1.9	12.0	2.5	2.4
Weißer Substanz	10.2	20.1	6.5	1.1	1.7	2.8	6.9	30.2	8.3	5.5

**Tab. 3.1** Fettsäurezusammensetzung von Sphingomyelin im humanen Hirn, modifiziert nach Sastry, 1985

Daraus geht hervor, dass Stearinsäure (18:0) und Nervensäure (24:1) mit 47.0 bzw. 30.9 Gewichts-% die häufigsten Fettsäuren in SM aus humanem Hirn sind (Rouser *et al.*, 1965). Dabei ist Stearinsäure die mit Abstand häufigste Fettsäure (61.9 %) in SM der grauen Hirnsubstanz und kommt dort etwa dreimal häufiger vor als in SM aus der weißen Substanz. SM aus der weißen Hirnsubstanz enthält dagegen in den meisten Fällen die langkettige Nervensäure (30.2 %), die hier ca. 2.5 mal häufiger vorliegt als in SM aus der grauen Substanz (O'Brien und Sampson, 1965). Die bei den Untersuchungen des SM-Gehalts beobachtete starke Reduktion an langkettigem SM im SCA2-Kleinhirn weist damit auf einen selektiven Mangel an SM aus der weißen Hirnsubstanz hin und ist damit ein weiteres Zeichen für ein Defizit an Myelinlipiden im Kleinhirn von SCA2-Patienten.

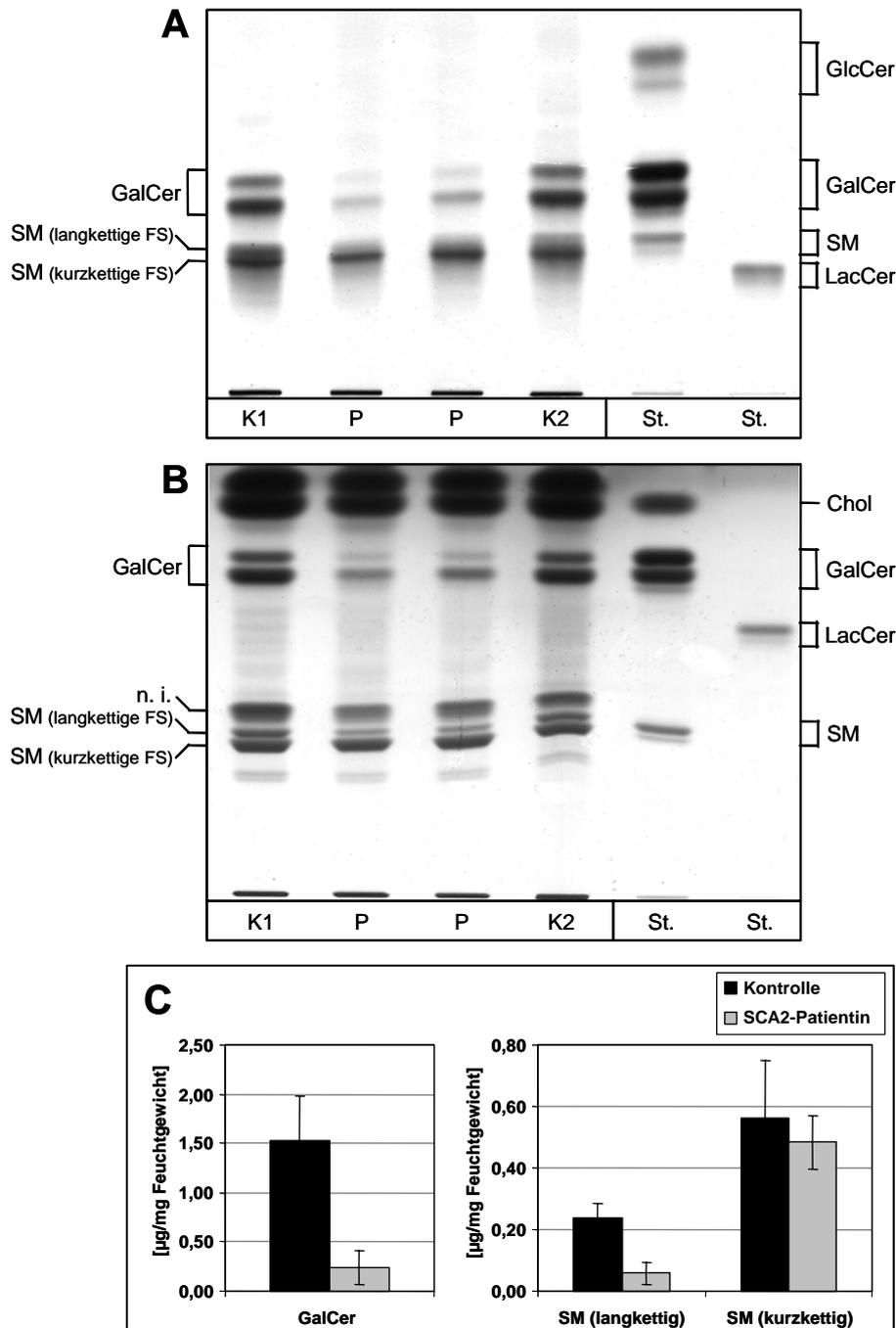
Zur Klärung der Frage, ob der Mangel an Myelinlipiden im Kleinhirn der SCA2-Patientin mit einer Änderung der Fettsäure- bzw. Sphingoidbasenzusammensetzung der verbleibenden Myelinlipide verbunden ist, wurden exemplarisch die Galaktosylceramide massenspektrometrisch untersucht. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf strukturelle Unterschiede zwischen den Galaktosylceramiden im Kleinhirn der SCA2-Patientin und gesundem Kleinhirngewebe.



**Abb. 3.27 Gehalt an Galaktosylceramid und Sphingomyelin im Cortex einer SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe**

Gewebeproben aus dem Cortex der SCA2-Patientin (P) und zweier Kontrollpatientinnen (K1 und K2) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Die Lipide wurden extrahiert und wie in Abb. 3.26 beschrieben aufgearbeitet. Die neutralen Lipidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (**A**: Borat-impregnirte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v); **B**: Chloroform / Methanol / 0.22 % Calciumchlorid in Wasser 60:35:8 (v/v/v)). Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 10 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=4) sind in **C** dargestellt.

(Chol = Cholesterol, GalCer = Galaktosylceramid, LacCer = Laktosylceramid, SM = Sphingomyelin, FS = Fettsäuren, n. i. = nicht identifiziert, St. = Standard)

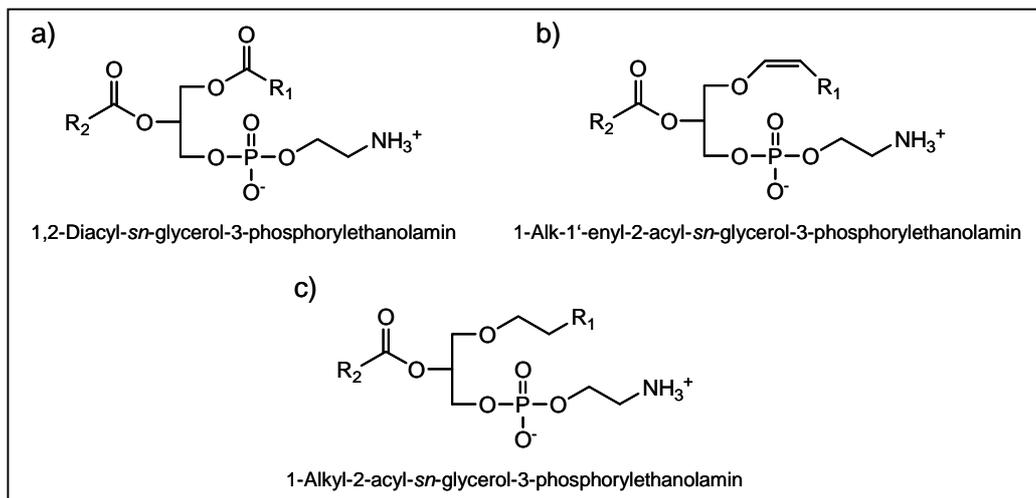


**Abb. 3.28 Gehalt an Galaktosylceramid und Sphingomyelin im Kleinhirn einer SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe**

Gewebeproben aus dem Kleinhirn der SCA2-Patientin (P) und zweier Kontrollpatientinnen (K1 und K2) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Die Lipide wurden extrahiert und wie in Abb. 3.26 beschrieben aufgearbeitet. Die neutralen Lipidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (**A**: Borat-impregnierte DC-Platte, Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v); **B**: Chloroform / Methanol / 0.22 % Calciumchlorid in Wasser 60:35:8 (v/v/v)). Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 10 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=4$ ) sind in **C** dargestellt.

(Chol = Cholesterol, GalCer = Galaktosylceramid, LacCer = Laktosylceramid, SM = Sphingomyelin, FS = Fettsäuren, n. i. = nicht identifiziert, St. = Standard)

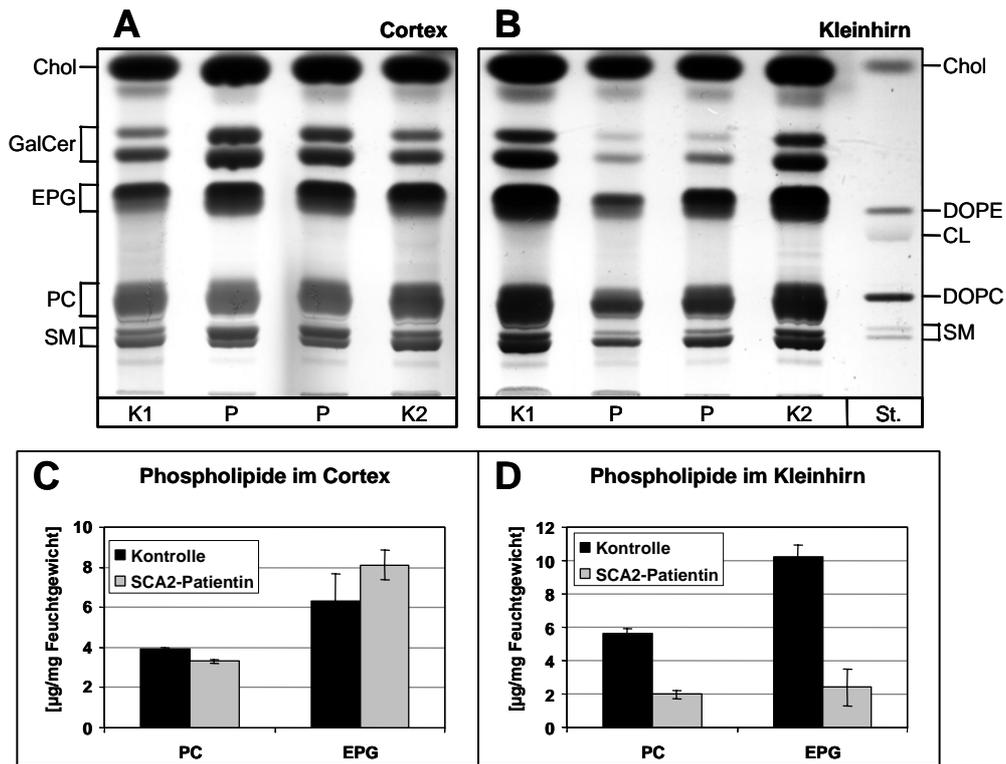
Die Ethanolaminphosphoglyceride (EPG) sind mit 30-40 % die mengenmäßig häufigsten Phospholipide im Nervengewebe (Sastry, 1985). Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe im Gehirn, das Ethanolamin-Plasmalogen (Abb. 3.29 b), macht 50-60 % der EPG im gesamten Hirn der meisten Spezies und sogar 70-80 % in der weißen Substanz und im Myelin aus (Horrocks und Sharma, 1982). Das Alkylacylanalogon (Abb. 3.29 c) trägt 3-7 % zu den EPG im Gehirn bei (Dorman *et al.*, 1976), und Phosphatidylethanolamin (Abb. 3.29 a) macht die restliche Menge aus.



**Abb. 3.29** Strukturen der Ethanolaminphosphoglyceride a) Phosphatidylethanolamin, b) Ethanolamin-Plasmalogen und c) dem Alkylanalogon von Phosphatidylethanolamin

Im Unterschied zu den EPG ist in der Gruppe der Cholinphosphoglyceride nicht Cholin-Plasmalogen, sondern Phosphatidylcholin (PC) das bedeutendste Mitglied. PC hat an der Gesamtmenge der Phospholipide im Gehirn einen Anteil von 30-35 %. Nur bei etwa 2 % der Cholinphosphoglyceride des Hirns handelt es sich um Cholin-Plasmalogen oder das entsprechende Alkylacylanalogon (Sastry, 1985).

Die quantitative Analyse der genannten Phospholipide zeigte eine deutliche Reduktion im Kleinhirn der SCA2-Patientin. Die PC-Menge betrug dort lediglich 35 % des Wertes im gesunden Kleinhirngewebe, der EPG-Gehalt war sogar um mehr als 75 % niedriger (Abb. 3.30 B, D). Im SCA2-Cortex zeigten sich wie schon bei den vorherigen Untersuchungen im Vergleich zum Kleinhirn nicht so starke bzw. entgegengesetzte Veränderungen. Der PC-Gehalt im Cortex der SCA2-Patientin war im Vergleich zum Kontrollgewebe nur leicht erniedrigt. Die Menge der EPG war im Gegensatz zu den Beobachtungen im Kleinhirn geringfügig erhöht und betrug das 1.3-Fache des Wertes der Kontrolle (Abb. 3.30 A, C).



**Abb. 3.30 Phospholipidgehalt in Cortex (A, C) und Kleinhirn (B, D) einer SCA2-Patientin im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe**

Gewebeproben aus dem Cortex und dem Kleinhirn der SCA2-Patientin (P) und zweier Kontrollpatientinnen (K1 und K2) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Die Lipide wurden extrahiert und wie in Abb. 3.25 beschrieben aufgearbeitet. Die neutralen Lipidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 60:25:4 (v/v/v)). Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 10 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=2) sind in **C** (Cortex) und **D** (Kleinhirn) dargestellt. (Chol = Cholesterol, GalCer = Galaktosylceramid, SM = Sphingomyelin, EPG = Ethanolaminphosphoglyceride, (DO)PC = (Dioleoyl-)Phosphatidylcholin, DOPE = Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin, CL = Cardiolipin, St. = Standard)

### 3.2.2 Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen von *SCA2-knock out*-Mäusen

Zur Klärung der Frage, ob die für SCA2 verantwortliche Expansion des Polyglutaminstrangs in Ataxin-2 zu einem Funktionsverlust des Proteins führt, wurde die Lipidzusammensetzung im Cortex und Kleinhirn von 3 Monate alten *SCA2-knock out (ko)*-Mäusen analysiert. Die *SCA2-ko*-Mäuse wurden von Frau Dr. Isabel Lastres-Becker im Arbeitskreis von Prof. Auburger etabliert. Proben aus dem Cortex und dem Kleinhirn der Mäuse wurden für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die Analyse der Lipidzusammensetzung im Kleinhirn der SCA2-Patientin hatte eine starke Verminderung des Gehalts an Cholesterol und der für Myelin spezifischen Lipide GalCer, Sulfatid und SM mit langkettigen Fettsäuren gezeigt. Im Cortex der Patientin traten diese Lipide dagegen in erhöhten Mengen auf. Bei der Untersuchung der Hirnlipidzusammensetzung der *SCA2-ko*-Mäuse wurden diese Veränderungen jedoch nicht beobachtet. Die Mengen an Cholesterol und GalCer im Cortex der *SCA2-ko*-Mäuse unterschieden sich nicht wesentlich von denjenigen im Wildtypgewebe (Abb. 3.31 A, B, C). Auch der SM-Gehalt im Cortex der *SCA2-ko*-Mäuse und der Wildtyp-Mäuse war vergleichbar. Das galt sowohl für die SM-Spezies der grauen Hirnsubstanz mit kurzkettigen Fettsäuren (untere Bande) als auch für diejenigen mit langkettigen Fettsäuren (obere Bande), die bevorzugt in der weißen Substanz vorkommen. Lediglich für den Ceramidgehalt wurde eine leichte Erhöhung (1.2-fach) im Cortex der *SCA2-ko*-Mäuse gegenüber den Kontrolltieren beobachtet.

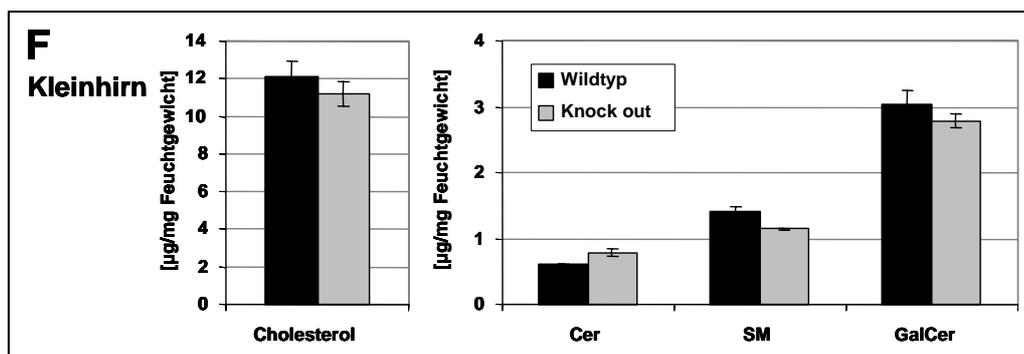
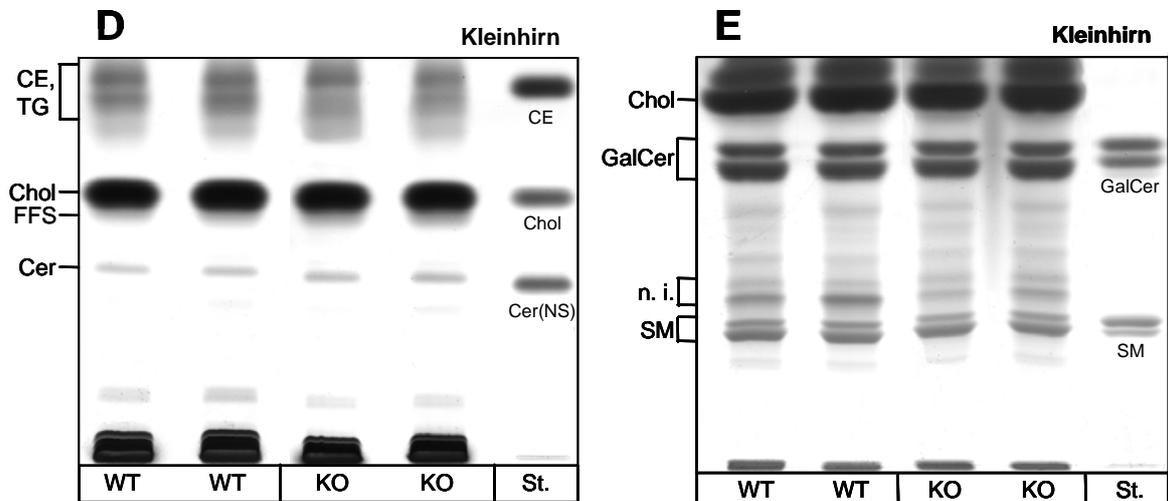
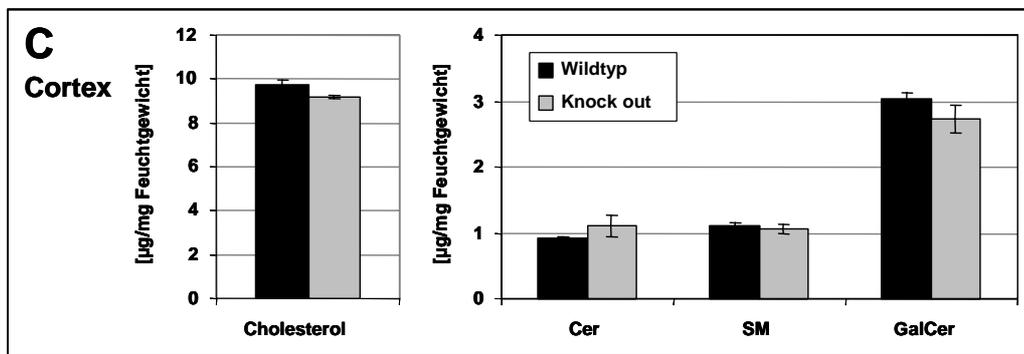
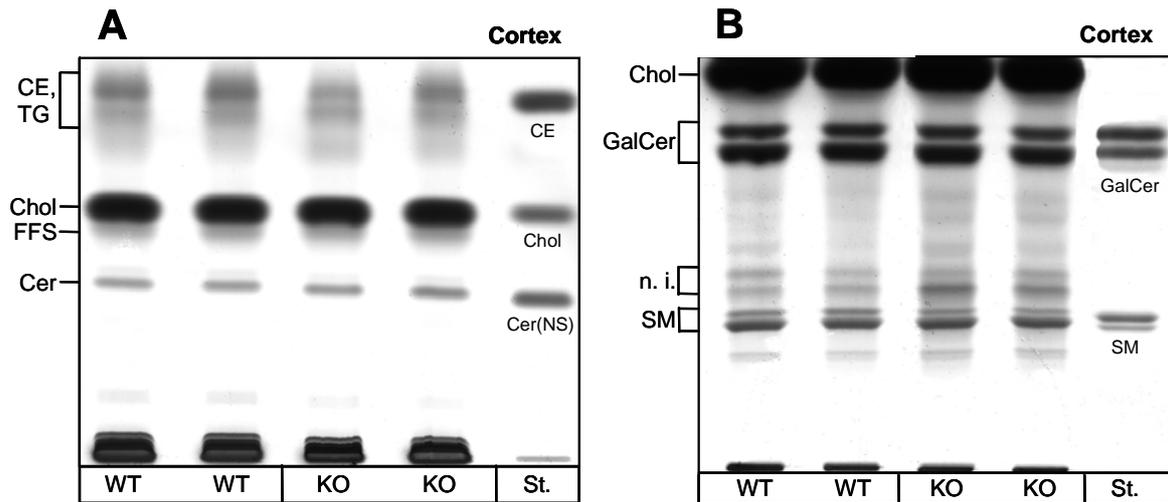
Ein ähnliches Bild ergab die Analyse der Lipidzusammensetzung des Kleinhirns Ataxin-2-defizienter Mäuse. Auch hier waren die Mengen an Cholesterol und GalCer im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kaum verändert (Abb. 3.31 D, E, F). Ebenso konnte wiederum eine leichte Erhöhung des Ceramidgehalts auf das 1.3-Fache des Wertes im Wildtypgewebe festgestellt werden.

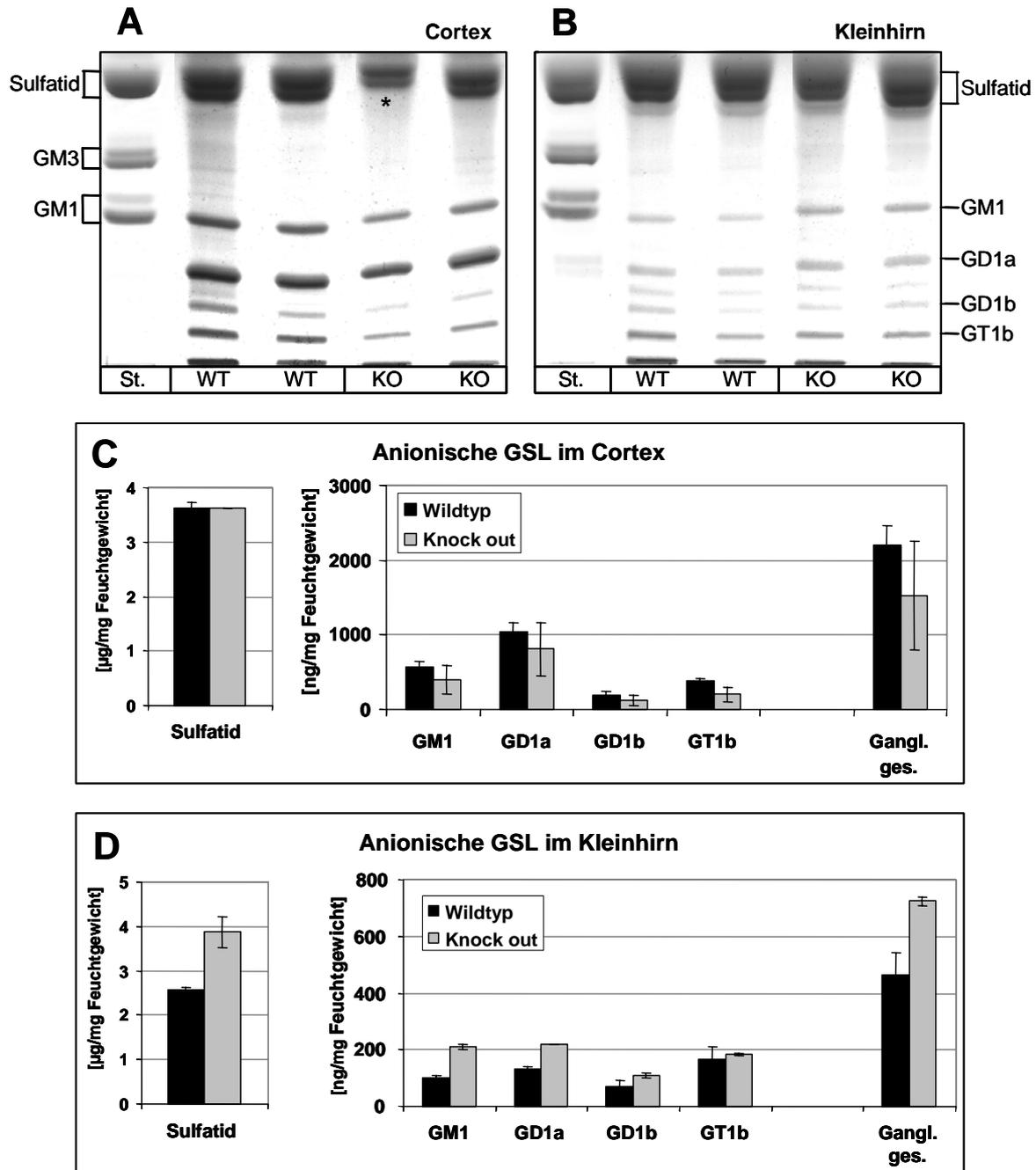
→

#### Abb. 3.31 Gehalt an neutralen Lipiden in Cortex (A, B, C) und Kleinhirn (D, E, F) von *SCA2-knock out*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypgewebe

Gewebeprobe aus dem Cortex und dem Kleinhirn von *SCA2-knock out*-Mäusen (KO) und Wildtyp-Mäusen (WT) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Die Lipide wurden extrahiert und anschließend dünnschichtchromatographisch analysiert (**A, D**: Laufmittel: Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1 (v/v/v)). Die Phospholipide wurden durch eine milde alkalische Hydrolyse abgebaut. Die verbleibenden Lipide wurden mittels Anionenaustauschchromatographie in anionische und neutrale Lipidfraktionen getrennt und die neutralen Fraktionen dünnschichtchromatographisch analysiert (**B, E**: Laufmittel: Chloroform/Methanol/0.22 % Calciumchlorid in Wasser 60:35:8 (v/v/v)). Die Lipidbanden wurden durch Anfärben mit einem Phosphorsäure-Kupfersulfat-Reagenz bei 180 °C visualisiert und densitometrisch anhand von mit Standardsubstanzen erstellten Eichkurven quantifiziert. Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 5 mg (**A, D**) bzw. 8 mg (**B, E**) Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=2) sind in **C** (Cortex) und **F** (Kleinhirn) dargestellt.

(CE = Cholesterolester, Chol = Cholesterol, Cer = Ceramid, TG = Triacylglyceride, FFS = freie Fettsäuren, GalCer = Galaktosylceramid, SM = Sphingomyelin, n. i. = nicht identifiziert, St. = Standard)





**Abb. 3.32** Gehalt an anionischen Glykosphingolipiden in Cortex (A, C) und Kleinhirn (B, D) von *SCA2-knock out*-Mäusen im Vergleich zu Wildtypgewebe

Gewebeprobe aus dem Cortex und dem Kleinhirn von *SCA2-knock out*-Mäusen (KO) und Wildtyp-Mäusen (WT) wurden wie in Kap. 5.2.3.2 beschrieben homogenisiert. Die Lipide wurden extrahiert und wie in Abb. 3.31 beschrieben aufgearbeitet. Die anionischen Lipidfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert (Laufmittel: Chloroform/Methanol/0.22% Calciumchlorid in Wasser 55:45:10 (v/v/v)). Die auf alle Bahnen aufgetragene Menge entspricht 8 mg Feuchtgewicht der jeweiligen Gewebeprobe. Die Ergebnisse der Quantifizierung (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=2$ ) sind in **C** (Cortex) und **D** (Kleinhirn) dargestellt. Die mit \* gekennzeichnete Sulfatidbande wurde wegen der hohen Abweichung nicht in die Quantifizierung mit einbezogen. (GSL = Glykosphingolipide, St. = Standard)

Zusätzlich wurde im Kleinhirn der SCA2-*ko*-Mäuse ein im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erniedrigter SM-Gehalt beobachtet. Die Reduktion betrug sowohl für kurzkettiges als auch für langkettiges SM etwa 20 %.

Auch die Untersuchung der anionischen Glykosphingolipide ergab ein anderes Bild als die Analyse der Hirnlipidzusammensetzung der SCA2-Patientin (Kap. 3.2.1). Die im Cortex der Patientin beobachtete erhöhte Menge des Myelinlipids Sulfatid zeigte sich im Cortex der SCA2-*ko*-Mäuse nicht (Abb. 3.32 A, C). Der Gangliosidgehalt im Cortex der SCA2-*ko*-Mäuse war jedoch wie bei der Patientin erniedrigt, allerdings nicht in so starkem Maße. Hinzu kommt, dass die für die einzelnen Ganglioside ermittelten Werte recht große Abweichungen zeigten.

Signifikant verändert waren dagegen die Mengen anionischer Glykosphingolipide im Kleinhirn der SCA2-*ko*-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Während die Sulfatidmenge im Kleinhirn der SCA2-Patientin stark erniedrigt war, war sie bei den *ko*-Mäusen auf das 1.5-Fache des Wertes in den Kontrolltieren erhöht (Abb. 3.32 B, D). Ebenso war der Gangliosidgehalt im Kleinhirn der SCA2-*ko*-Mäuse deutlich erhöht. Die stärkste Veränderung zeigte hierbei GM1, dessen Gehalt im Kleinhirn der *ko*-Mäuse 2.1-fach höher als im Wildtypgewebe war.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase auf den Sphingolipidstoffwechsel kultivierter Zellen

#### 4.1.1 Metabolische Markierungsstudien in kultivierten Zellen unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC

Nachdem die beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase Cp-DHC und Db-DHC (Abb. 3.1) bereits in einem *in vitro*-Testsystem zu einer zeitabhängig zunehmenden Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase aus Rattenleber-Mikrosomen geführt hatten (Abb. 2.12) (Brodesser, 2002), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC bzw. Db-DHC auch in Zellkultur nachweisbar ist und wie sich diese gegebenenfalls auf den Sphingolipidstoffwechsel der Zellen auswirkt. Zu diesem Zweck wurden metabolische Markierungsstudien an kultivierten Zellen in Gegenwart der beiden Dihydroceramid-Analoga durchgeführt.

Zur Untersuchung der Wirkung der beiden Verbindungen auf die Biosynthese von Ceramid und der darauf aufbauenden Sphingolipide wurden zunächst metabolische Markierungen mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin, dem radioaktiv markierten Ausgangsmolekül der Ceramid-Biosynthese, durchgeführt. Dabei konnten sowohl in humanen Fibroblasten als auch in humanen differenzierten Keratinozyten Veränderungen in den Lipidmustern nachgewiesen werden, die auf eine Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase durch Cp-DHC und Db-DHC schließen lassen (Abb. 3.2 und 3.5). Beide Verbindungen führten zu einer mit steigenden Konzentrationen zunehmenden Menge biosynthetisierten Dihydroceramids (Cer(ND)), dem Substrat der Desaturase-Reaktion, und einer Abnahme des Anteils des Reaktionsproduktes Cer(NS). Wie bereits bei der *in vitro*-Messung der Enzymaktivität in Rattenleber-Mikrosomen zeigte Cp-DHC auch bei den Markierungsexperimenten mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin in Zellkultur deutlich stärkere Effekte als Db-DHC. Durch Zusatz von 50 µM Cp-DHC erhöhte sich die relative Cer(ND)-Menge in humanen differenzierten Keratinozyten auf das 3.6-Fache der Kontrolle, während Db-DHC in der gleichen Konzentration lediglich zum 1.8-Fachen des Kontrollwertes führte. Die Cer(NS)-Menge wurde durch Db-DHC auf ein Drittel der Kontrolle gesenkt, Cp-DHC rief dagegen eine Erniedrigung auf 18 % des Kontrollwertes hervor.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Zelltypen bilden humane Keratinozyten während ihrer Differenzierung ein breites Spektrum strukturell vielfältiger Ceramide, Glucosylceramide und Sphingomyeline (Holleran *et al.*, 2006). Mit einem Anteil von 20 mol-% ist Cer(NP), das Phytosphingosin (D-ribo-4-Hydroxysphinganin) als Sphingoidbase enthält, ein wichtiges Ceramid der menschlichen Epidermis (Yamamoto *et al.*, 1991). Bei der [3-<sup>14</sup>C]-Serin-Markierung humaner differenzierter Keratinozyten unter Einfluss der beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC wurde eine starke Zunahme des Cer(NP)-Anteils beobachtet. Bei Zusatz von 50 µM Db-DHC stieg die relative Cer(NP)-Menge auf das 2.5-Fache des Kontrollwertes, Cp-DHC führte in der gleichen Konzentration sogar zu einer 6.5-fachen Erhöhung der Cer(NP)-Markierung.

Biosynthetisch entsteht Cer(NP) beim Menschen durch Hydroxylierung von Dihydroceramid in Position 4 des Sphinganin-Rückgrats unter Katalyse einer Dihydroceramid-4-Hydroxylase. Dihydroceramid ist damit das gemeinsame Substrat der Dihydroceramid-4-Desaturase und der 4-Hydroxylase, die auf Proteinebene verwandt sind und nach einem ähnlichen Mechanismus arbeiten sollten (Abb. 2.4). So wurden bifunktionelle Enzyme in Maus (Ternes *et al.*, 2002; Omae *et al.*, 2004) und in *Candida albicans* (Beckmann *et al.*, 2003) identifiziert, die sowohl Aktivität als Sphingolipid-4-Desaturase als auch als 4-Hydroxylase zeigten (Kap. 2.3.2). Zudem wurde ein humanes Homologes (*hDes2*) der murinen 4-Desaturase/4-Hydroxylase beschrieben, deren mRNA-Expression in humanen Keratinozyten während der Differenzierung hochreguliert wurde. Diese Hochregulierung des *hDes2*-Gens war mit der Produktion von Cer(NP) verbunden (Mizutani *et al.*, 2004). Die in humanen differenzierten Keratinozyten durch Cp-DHC bzw. Db-DHC ausgelöste Reduktion des Cer(NS)-Gehaltes bei gleichzeitiger Erhöhung des Cer(NP)-Anteils deuten darauf hin, dass beide Verbindungen nur eine Aktivität des bifunktionellen Enzyms, nämlich die der Desaturase, hemmten. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Epidermis von Mäusen, bei denen der Transkriptionsfaktor *Arnt* (Kap. 2.4.2) in Keratinozyten ausgeschaltet wurde, einen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduzierten Gehalt Sphingosin- und Phytosphingosin-haltiger Ceramidspezies und erhöhte Mengen Dihydroceramid aufwies. Die *Arnt-knock out*-Mäuse starben innerhalb eines Tages nach der Geburt an durch transepidermale Wasserverlust bedingter Austrocknung (Takagi *et al.*, 2003). Ceramide mit Doppelbindung bzw. Hydroxylgruppe in Position 4 der Sphingoidbase sind also für die Funktion der Epidermis essentiell und können nicht durch Dihydroceramide ersetzt werden. Der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. 4-Hydroxylase kommt demnach eine große Bedeutung beim Aufbau der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere zu, so dass die Hemmung bzw. Stimulierung nur einer der beiden Enzymaktivitäten für ihre Untersuchung von großem Wert sein könnte. Versuche, kinetische Daten zum Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC auf die Dihydroceramid-4-Desaturase und 4-Hydroxylase zu gewinnen, blieben aber aufgrund von Problemen beim Aufbau eines *in vitro*-Testsystems in differenzierten Keratinozyten bisher ohne Erfolg.

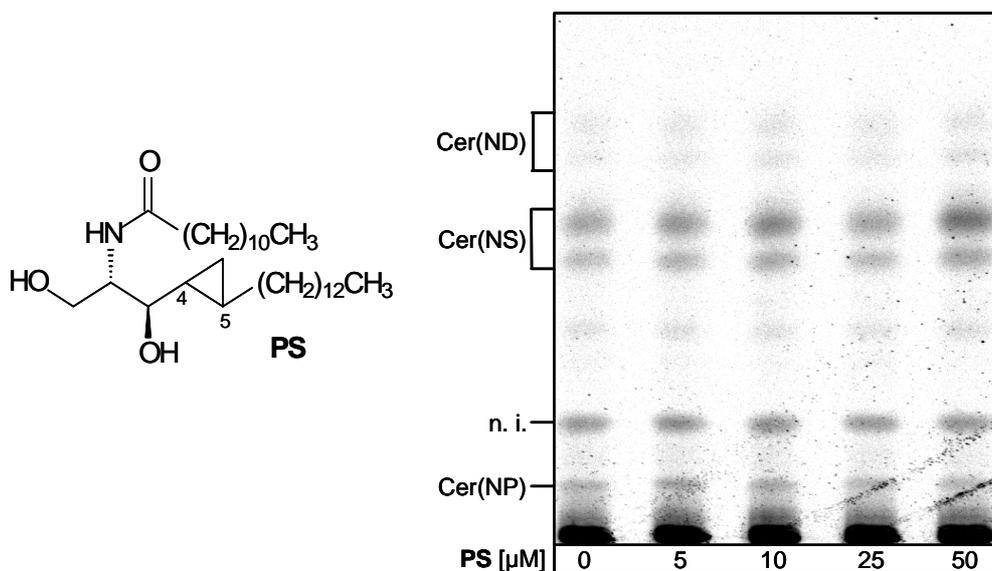
Kürzlich wurden auf einer Konferenz aktuelle Daten zum Phänotyp von Mäusen vorgestellt, bei denen das *Des1*-Gen ausgeschaltet wurde<sup>[3]</sup>. Das Genprodukt von *Des1* zeigt Aktivität als Dihydroceramid-4-Desaturase, jedoch nicht als 4-Hydroxylase (Kap. 2.3.2) (Ternes *et al.*, 2002). Die *Des1-knock out*-Mäuse sind klein, zittrig, spärlich behaart und zeigen bei Kälte einen ungewöhnlich starken Abfall der Körpertemperatur. Ihr Blut weist neben vielen anderen Abnormalitäten einen erniedrigten Glucosespiegel auf. Viele Gewebe der *Des1-knock out*-Mäuse wie Herz, Leber, weißes Fettgewebe, Pankreas und Skelettmuskel enthalten keine detektierbaren Mengen Ceramid, weisen aber einen stark erhöhten Dihydroceramidgehalt auf. Über den Hautphänotyp oder eine verminderte Leistung der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere infolge eines Mangels an Barrierelipiden sind jedoch keine Informationen erhältlich. In diesem Zusammenhang wäre sicher auch die Ausschaltung des *Des2*-Gens, das für die bifunktionelle Dihydroceramid-4-Desaturase/4-Hydroxylase codiert (Kap. 2.3.2) (Ternes *et al.*, 2002; Omae *et al.*, 2004), von Interesse. Es ist zu erwarten, dass eine *Des2*-Defizienz zu einem Mangel aller Sphingosin- und Phytosphingosin-haltiger Barrierelipide und infolgedessen zu transepidermalem

---

<sup>[3]</sup> Narra, K., Holland, W., Wang, L.-P., Sargent, K., Liu, Y., Fontenot, G., Summers, S. (2007). An Update on the Dihydroceramide Desaturase Knockout Mice. *Abstracts of: "4<sup>th</sup> International Charleston Ceramide Conference"*: Pacific Grove, CA, USA.

Wasserverlust und Austrocknung führt, ähnlich wie es bei den *Arnt-knock out*-Mäusen beobachtet wurde. *Des2-knock out*-Tiere wurden aber bisher nicht beschrieben.

In analoger Weise wie die beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC wurden zwei weitere Verbindungen bezüglich ihres Einfluss auf den Einbau von L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin in die Lipide humaner differenzierter Keratinozyten untersucht. Die bereits als Inhibitor der Dihydroceramid-Desaturase beschriebene Verbindung GT11 (Abb. 2.8) (Triola *et al.*, 2001) zeigte dabei eine völlig andere Wirkung als Cp-DHC und Db-DHC. Konzentrationen bis 1 µM GT11 führten zu der schon in kultivierten Kleinhirneuronen (Triola *et al.*, 2004) beobachteten Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase mit einer Erhöhung der relativen Cer(ND)-Menge und reduziertem Cer(NS)-Anteil (B. Breiden, persönliche Mitteilung). Im Unterschied zur Analyse in Gegenwart von Cp-DHC und Db-DHC wurde dabei keine Veränderung der Cer(NP)-Menge beobachtet. In höheren Konzentrationen ab 5 µM bewirkte GT11 die ebenfalls aus Neuronen bekannte Abnahme der Bildung aller Sphingolipide, die in einer zusätzlichen Inhibierung der Sphingosin-1-phosphat-Lyase und einer daraus resultierenden Feedback-Hemmung der Serin-Palmitoyltransferase durch Sphingosin-1-phosphat begründet ist (Triola *et al.*, 2004).



**Abb. 4.1 Einfluss verschiedener Konzentrationen PS auf den Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in Cer(ND) und Cer(NS) in humanen differenzierten Keratinozyten**

Humane Keratinozyten wurden wie in Abb. 3.5 beschrieben kultiviert und in Gegenwart von 5, 10, 25 und 50 µM PS metabolisch markiert. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte durch Entwicklung einer Borat-imprägnierten DC-Platte in Chloroform/Methanol 9:1 (v/v). Die mit „n. i.“ (= nicht identifiziert) gekennzeichnete Bande kann einer im Markierungsreagenz L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin enthaltenen Verunreinigung zugeordnet werden. Das Dünnschichtchromatogramm wurde freundlicherweise von Dr. Bernadette Breiden zur Verfügung gestellt.

Die von P. Sawatzki synthetisierte Verbindung PS (Abb. 4.1) (Sawatzki, 2003) ist wie Verbindung Cp-DHC eine Dihydroceramid-Analoga mit Cyclopropyl-Ring, der sich jedoch in 4,5-Position und damit ein Kohlenstoffatom weiter vorne als bei Cp-DHC innerhalb der Sphingoidbase befindet. Hier besteht im Falle der homolytischen C-H-Bindungsspaltung durch die Dihydroceramid-

Desaturase bzw. -Hydroxylase in Position 4 der Sphingoidbase, gefolgt von einer Einelektronenübertragung, die Möglichkeit der elektrozyklischen Ringöffnung. Als reaktive Zwischenstufe entstünde dabei ein Carbeniumion, dessen Ladung delokalisiert wäre und das eine kovalente Bindung mit nucleophilen Aminosäureseitenketten des Enzyms eingehen könnte (Kolter, 2002). Auf den Einbau von [3-<sup>14</sup>C]-Serin in Cer(ND), Cer(NS) und Cer(NP) in humanen differenzierten Keratinozyten hatte Verbindung PS jedoch keinen Einfluss (Abb. 4.1) (B. Breiden, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird bereits der erste Schritt der Desaturase-Reaktion, die homolytische C-H-Bindungsspaltung in Position 4, durch den Cyclopropyl-Ring zwischen den Positionen 4 und 5 in Verbindung PS behindert.

Bezüglich der oben beschriebenen Effekte, die die beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC auf die Biosynthese der Ceramide humaner differenzierter Keratinozyten ausübten, wurde eine Abhängigkeit von der Fettsäurekettenlänge festgestellt. Auffällig ist, dass die beobachteten Veränderungen stets hauptsächlich die untere der jeweiligen Doppelbanden betrafen. Die beiden Substratanaloga der Dihydroceramid-Desaturase bewirkten also vorwiegend eine Zunahme derjenigen Anteile von Cer(ND) und Cer(NP), die mit kurzkettigen Fettsäuren (C16-C18) acyliert waren. Die langkettigen Spezies (hauptsächlich C26) blieben dagegen nahezu unbeeinflusst. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf eine mögliche Substratspezifität der Dihydroceramid-4-Desaturase bzw. der 4-Hydroxylase sein. So sind z. B. auch von der  $\Delta^9$ -Stearoyl-CoA-Desaturase der Maus vier Isoformen (SCD1-4) bekannt, die unterschiedliche Substratspezifitäten zeigen. Während SCD1 sowohl Stearoyl-CoA zu Oleoyl-CoA ( $\Delta^9$ -18:1) als auch Palmitoyl-CoA zu Palmitoleoyl-CoA ( $\Delta^9$ -16:1) desaturiert, sind SCD2 und SCD3 absolut spezifisch für Stearoyl-CoA (Binczek *et al.*, 2007). Die Fettsäure-Desaturasen zeigen damit nicht nur Regiospezifität, sondern auch Spezifität für die Kettenlänge der zu desaturierenden Fettsäure. Ähnliches gilt für die (Dihydro)ceramid-Synthasen, die Sphinganin bzw. Sphingosin mit einer durch CoA aktivierten Fettsäure acylieren. Sie werden von den *Lass*- (*longevity assurance homologue*-)Genen codiert, von denen in der Maus bisher sechs (*Lass1* bis *Lass6*) bekannt sind. Die von den einzelnen *Lass*-Genen codierten Acyltransferasen zeigen ähnlich wie die Fettsäure-Desaturasen Spezifität für bestimmte Kettenlängen der zu übertragenden Fettsäure. So synthetisiert das *Lass1*-Genprodukt hauptsächlich (Dihydro)ceramide, die mit Stearinsäure acyliert sind, durch *Lass 2* und *Lass4* werden Fettsäuren mit 22 und 24 Kohlenstoffatomen übertragen und *Lass5* und *Lass6* führen zur Bildung von mit Myristin- bzw. Palmitinsäure acylierten (Dihydro)ceramiden (Mizutani *et al.*, 2005). Die Fettsäure-Kettenlängen der epidermalen Ceramide sind im Vergleich zu denjenigen anderer Gewebe besonders variabel. Die nicht-hydroxylierten Fettsäuren sind 14 bis 30 Kohlenstoffatome lang, die Länge der  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren beträgt 16 bis 28 und die der  $\omega$ -hydroxylierten 24 bis 36 Kohlenstoffatome, wobei auch ungeradzahlige Ketten möglich sind (Wertz *et al.*, 1987). Es ist also denkbar, dass, wie von den Fettsäure-Desaturasen und den (Dihydro)ceramid-Synthasen bekannt, verschiedene Dihydroceramid-4-Desaturasen bzw. 4-Hydroxylasen existieren, die sich in ihrer Spezifität für Dihydroceramide mit bestimmten Kettenlängen der Fettsäure und/oder der Sphingoidbase unterscheiden. Hierin läge eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass die beiden Dihydroceramid-Analoga zu einer selektiven Akkumulation der kurzkettigen Cer(ND)- bzw. Cer(NP)-Spezies führen. Da sowohl der Fettsäureteil als auch die Sphingoidbase beider Analoga zwölf Kohlenstoffatomen lang ist, werden sie möglicherweise nur von denjenigen Dihydroceramid-

Desaturasasen bzw. -Hydroxylasen als Substrate akzeptiert, die spezifisch kurzkettige Dihydroceramide umsetzen.

Mit 6-[*N*-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl-dihydroceramid (C6-NBD-Dihydroceramid), einem fluoreszierenden Dihydroceramid-Analogen, wurde nachgewiesen, dass Dihydroceramid in Zellkultur ohne vorherige Desaturierung zu Dihydroglucosylceramid und Dihydrosphingomyelin umgesetzt werden kann. Die Desaturierung findet dagegen ausschließlich auf Dihydroceramid-Ebene und nicht auf der Stufe höherer Dihydrosphingolipide statt (Kok *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Befunde war also zu erwarten, dass bei einer Erniedrigung des Ceramid- und gleichzeitiger Erhöhung des Dihydroceramid-Anteils durch Cp-DHC bzw. Db-DHC statt Ceramid vermehrt Dihydroceramid durch die GlcCer-Synthase glucosyliert bzw. von der SM-Synthase mit Phosphorylcholin verestert würde. Bei den Markierungsexperimenten mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin waren die durch diese enzymatischen Umsetzungen entstehenden Glucosylceramide bzw. Sphingomyeline mit gesättigter Sphingoidbase im Dünnschichtchromatogramm von denjenigen mit ungesättigter Base aufgrund ihrer sehr ähnlichen R<sub>F</sub>-Werte nicht zu unterscheiden. Aus den genannten Gründen war jedoch zu erwarten, dass ihre Gesamtmenge bei Zusatz von Cp-DHC und Db-DHC im Vergleich zu Kontrolle konstant bliebe. Dem widersprechend wurde aber sowohl in humanen differenzierten Keratinozyten als auch in humanen Fibroblasten und primären Kleinhirnneuronen von Mäusen unter Einfluss von Cp-DHC und Db-DHC eine Abnahme der relativen Menge der in der Biosynthese auf (Dihydro)ceramid folgenden (Dihydro)sphingolipide beobachtet, wobei sich auch hier der Effekt mit steigenden Konzentrationen der beiden Verbindungen verstärkte. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder erfolgten die Umsetzungen von Dihydroceramid durch die GlcCer-Synthase und die SM-Synthase nicht so schnell wie die von Ceramid oder die beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC übten eine zusätzliche Hemmung auf die GlcCer- und die SM-Synthase aus. Es ist vorstellbar, dass Cp-DHC bzw. Db-DHC mit Ceramid und Dihydroceramid um die Bindungsstellen an den beiden genannten Enzymen konkurrieren. Die bei diesen kompetitiven Umsetzungen entstehenden Produkte, also glucosyliertes bzw. mit Phosphorylcholin verestertes Cp-DHC und Db-DHC, würden nicht durch [3-<sup>14</sup>C]-Serin markiert und wären damit nicht detektierbar, würden aber zu der beobachteten Erniedrigung der Mengen der biosynthetisch auf (Dihydro)ceramid folgenden Verbindungen führen.

Zur Ermöglichung einer Unterscheidung von Dihydroglucosylceramid und Dihydrosphingomyelin von den entsprechenden Spezies mit ungesättigter Base bei dünn-schichtchromatographischer Trennung wurden metabolische Markierungen humaner differenzierter Keratinozyten mit *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoylsphinganin und -sphingosin unter Zusatz von Cp-DHC durchgeführt. Hierbei wurden nur die mit [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure acylierten (Dihydro)ceramide und (Dihydro)sphingolipide radiomarkiert und als einzelne Banden detektiert. Die Unterdrückung der Wiederverwertung von im Lysosom aus den Markierungsreagenzien freigesetzter [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure über einen Temperaturblock der endozytotischen Aufnahme der Markierungsreagenzien oder eine Hemmung der Reacylierung endogener Sphingoidbasen durch FB1 gelang jedoch nur unvollständig. Dennoch konnte in diesen Markierungsexperimenten der inhibierende Effekt von Cp-DHC auf den von der Dihydroceramid-Desaturase katalysierten Schritt bestätigt werden.

Zusätzlich zeigte sich bei den Markierungen mit [<sup>14</sup>C]-Octanoylsphinganin unter Temperaturblock der Endozytose in Gegenwart von Cp-DHC eine konzentrationsabhängige Abnahme der Mengen von Glucosylceramiden und Sphingomyelinen sowohl mit gesättigter als auch mit ungesättigter

Sphingoidbase. Auch hierin lag wieder ein Hinweis für eine Bevorzugung von in der Sphingoidbase ungesättigtem Ceramid durch die GlcCer- und die SM-Synthase oder auf eine durch Cp-DHC bewirkte zusätzliche Inhibierung dieser Enzyme. Die Unterdrückung der Wiederverwertung der [1-<sup>14</sup>C]-Oktansäure mit FB1 ermöglichte gegenüber dem Endozytoseblock eine Verlängerung der Inkubationszeit von 2 h auf 24 h. Hierbei wurde unter Zusatz von Cp-DHC zwar wiederum eine Abnahme der (Dihydro)sphingomyelinspiegel, jedoch diesmal eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mengen von Glucosylceramiden mit gesättigter Base beobachtet. Sollte eine Inhibierung der GlcCer-Synthase durch Cp-DHC vorliegen, tritt sie bei längerer Inkubation mit [<sup>14</sup>C]-Octanoylsphingonin offensichtlich gegenüber der Desaturase-Hemmung in den Hintergrund. Bei den metabolischen Markierungen mit [<sup>14</sup>C]-Octanoylsphingosin wurde sowohl unter Temperaturblock der Endozytose als auch bei Zusatz von FB1 eine von der Cp-DHC-Konzentration abhängige Abnahme der Bildung von Sphingomyelin mit ungesättigter Base beobachtet, während die Glucosylceramidspiegel unverändert blieben. Auch dies weist darauf hin, dass eine potentielle kompetitive Hemmung der SM-Synthase durch Cp-DHC offenbar eine größere Rolle spielt als eine Inhibierung der GlcCer-Synthase. Möglicherweise wird Cp-DHC von der SM-Synthase eher als Substrat akzeptiert als von der GlcCer-Synthase. Dies wäre in Übereinstimmung mit der bereits bekannten höheren Substrattoleranz der SM-Synthase, die im Gegensatz zur GlcCer-Synthase z. B. auch Ceramid mit *L-threo*-Konfiguration umsetzt (Venkataraman und Futerman, 2001).

#### **4.1.2 Massenspektrometrische Analyse von Metaboliten der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC**

Wie endogen in der Zelle gebildetes können auch exogen an Zellkulturen verabreichte kurzkettige Ceramid-Analoga von verschiedenen Enzymen als Substrat gebunden und nachfolgend zu einer Vielzahl von Metaboliten verstoffwechselt werden (van Echten-Deckert *et al.*, 1998). So ist es denkbar, dass auch die beiden (Dihydro)ceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC nach exogener Gabe und Eintritt in die Zelle z. B. in 1-Position glucosyliert oder mit Phosphorylcholin verestert werden, so dass Analoga von Glucosylceramid und Sphingomyelin entstehen. Weiterhin ist es möglich, dass die Sphingoidbasen der beiden Ceramid-Derivate nach Abspaltung der Laurinsäure durch eine Ceramidase mit endogenen langkettigen Fettsäuren reacyliert werden, so wie es bereits für andere kurzkettige Ceramid-Analoga beschrieben wurde (Ogretmen *et al.*, 2002).

Die dünnschichtchromatographische Identifizierung solcher Stoffwechselprodukte von Cp-DHC und Db-DHC ist aufgrund ihrer geringen Konzentration im Gesamtlipidextrakt von Keratinozyten und der Überlagerung mit endogenen Lipiden im DC nicht möglich. Aus denselben Gründen hatten sich auch Versuche, potentielle Metabolit-Banden aus DCs auszukratzen und anschließend massenspektrometrisch zu analysieren, als erfolglos erwiesen. Zur Identifizierung von Metaboliten wurde der Gesamtlipidextrakt von mit Cp-DHC bzw. Db-DHC behandelten Keratinozyten deshalb mit massenspektrometrischen Verfahren wie *parent ion scan* und *neutral loss scan* untersucht.

Dabei wurden *N*-Acyl-Metabolite sowohl von Cp-DHC als auch von Db-DHC identifiziert, die Fettsäuren mit 14 bis 28 Kohlenstoffatomen enthielten, die zum Teil auch einfach ungesättigt waren. Lediglich ein Metabolit von Cp-DHC trug eine in  $\alpha$ -Position hydroxylierte Palmitinsäure. Stoffwechselprodukte von Cp-DHC und Db-DHC, die mit sehr langkettigen  $\omega$ -hydroxylierten

Fettsäuren acyliert waren, wurden nicht gefunden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich darin, dass in submersen Keratinozytenkulturen die Differenzierung nicht vollständig verläuft, d. h. es wird kein *stratum corneum* wie in nativer Epidermis gebildet. Daher enthalten auch die endogenen, frei extrahierbaren Ceramide differenzierter Keratinozyten sehr viel häufiger nicht-hydroxylierte als  $\alpha$ -hydroxylierte oder sehr langkettige  $\omega$ -hydroxylierte Fettsäuren (Breiden *et al.*, 2007).

Zusätzlich wurden Sphingomyelin-Analoga der beiden Verbindungen Cp-DHC und Db-DHC identifiziert, die durch Veresterung der 1-Hydroxygruppe mit Phosphorylcholin unter Katalyse der SM-Synthase entstanden waren. Dies bestätigte die aufgrund der Ergebnisse der metabolischen Markierungsstudien gemachte Hypothese einer kompetitiven Hemmung der SM-Synthase durch Cp-DHC und Db-DHC, die mit endogenem bzw. exogen appliziertem (Dihydro)ceramid um die Bindungsstellen am Enzym konkurrieren. In 1-Position glucosylierte Metabolite von Cp-DHC oder Db-DHC konnten dagegen nicht gefunden werden. Möglicherweise liegt die Erklärung dafür darin, dass glucosylierten Stoffwechselprodukte von Cp-DHC und Db-DHC gar nicht oder nur in so geringen Mengen gebildet wurden, dass sie im Gesamtlipidextrakt nicht detektiert werden konnten. Dies wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass die SM-Synthase die beiden (Dihydro)ceramid-Analoga eher als Substrat akzeptiert als die GlcCer-Synthase und in Übereinstimmung mit der bereits erwähnten größeren Substrattoleranz der SM-Synthase.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass die epidermalen Glucosylceramide und Sphingomyeline (*pro barrier*-Lipide), aus denen durch enzymatischer Hydrolyse die Ceramide des *stratum corneum* entstehen (Kap. 2.4.1), eine unterschiedliche Fettsäurezusammensetzung haben. Alle Ceramid-Spezies, einschließlich derjenigen, die mit den sehr langkettigen  $\omega$ -hydroxylierten Fettsäuren acyliert sind, gehen aus den entsprechenden Glucosylceramiden hervor (Hamanaka *et al.*, 2002). In den epidermalen Sphingomyelinen wurden dagegen nur Fettsäuren mit einer Kettenlänge von bis zu 26 Kohlenstoffatomen gefunden. Die sehr langkettigen Fettsäuren waren darin nur in Spuren enthalten (Uchida *et al.*, 2000). Offensichtlich bevorzugt die epidermale SM-Synthase eher kürzerkettige Ceramide zur Bildung von *pro barrier*-Sphingomyelinen. Dass die beiden kurzkettigen Verbindungen Cp-DHC und Db-DHC zu den entsprechenden Sphingomyelin-Analoga umgesetzt wurden, erscheint daher nachvollziehbar.

Die Entwicklung einer Methode, mit der glucosylierte oder mit Phosphorylcholin veresterte Metabolite von Cp-DHC und Db-DHC von endogenen Glucosylceramiden und Sphingomyelinen differenzierter Keratinozyten vor ihrer massenspektrometrischen Analyse z. B. über Flüssigkeitschromatographie-Verfahren getrennt werden können, würde die Identifizierung weiterer Stoffwechselprodukte der beiden Verbindungen erleichtern.

Ebenso scheint die Einführung einer Radiomarkierung in Cp-DHC sinnvoll. Mit Hilfe von radiomarkiertem Cp-DHC könnten nähere Erkenntnisse über die Zellgängigkeit der Verbindung und ihren Metabolismus innerhalb der Zelle gewonnen werden. Außerdem könnte der Mechanismus der Inhibierung der Dihydroceramid-4-Desaturase näher untersucht werden und möglicherweise eine kovalente Bindung von Cp-DHC an das Enzym nachgewiesen werden.

Die Synthese eines nicht metabolisierbaren Derivates von Cp-DHC, in dem die 1-Hydroxy- durch eine 1-Methyl-Gruppe und die Amid- durch eine Sulfonamidgruppierung ersetzt werden sollte, wurde ausgehend von L-Aminobuttersäure begonnen. Sie scheiterte jedoch auf der Stufe der Epoxidierung mit 3-Chlorperoxybenzoesäure (Abb. 2.11) an der Bildung eines unerwarteten

Nebenproduktes (Brodesser *et al.*, 2003). Erste Versuche zur Optimierung des Syntheseweges wurden bereits durchgeführt (Fandel, 2006).

### **4.1.3 Einfluss von Cp-DHC auf die Expression von Genen ausgewählter Proteine in humanen Keratinozyten**

Während Ceramid mit Doppelbindung in 4,5-Position der Sphingoidbase antimitogene Effekte wie Anhalten des Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Apoptose hervorruft, hatten sich kurzkettige Dihydroceramid-Analoga wie *N*-Acetylsphingarin (C2-Dihydroceramid) in früheren Studien als biologisch inaktiv erwiesen (Bielawska *et al.*, 1993). Mit Hilfe des Dihydroceramid-Analogons Cp-DHC sollten daher untersucht werden, welche Konsequenzen eine Hemmung der Dihydroceramid-Desaturase und damit eine Abnahme des Anteils von Ceramiden mit ungesättigter Sphingoidbase zugunsten des Dihydroceramidgehalts auf den Übergang von Proliferation zu Differenzierung in humanen Keratinozyten hat. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von Cp-DHC auf die Expression von Genen einiger Proteine, die am Ceramidstoffwechsel und an der Differenzierung humaner Keratinozyten beteiligt sind, untersucht. Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen der ausgewählten Proteine wurde dabei die Methode der *real-time* PCR verwendet. Frühere Analysen hatten bereits gezeigt, dass die mRNA-Mengen der untersuchten Proteine unter den gewählten Bedingungen auch mit den jeweiligen Proteinspiegeln korrelierten (Watanabe *et al.*, 1998; Langmann *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 1999; Gallala *et al.*, 2004).

Während die Expressionsraten von Keratin 10 und Profilaggrin in den Kontrollzellen entsprechend ihrer Rolle als Differenzierungsmarkerproteine mit Beginn der durch den  $Ca^{2+}/LA$ -Shift induzierten Differenzierung der Keratinozyten hochreguliert wurden, wurde unter Zusatz von 50  $\mu$ M Cp-DHC eine starke Reduktion der mRNA-Mengen dieser Proteine beobachtet. Dazu passend war die mRNA-Menge des Basalmarkerproteins Keratin 14, die in den Kontrollzellen 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts erwartungsgemäß um über 90 % niedriger war als zu Beginn der Differenzierung, in Gegenwart von Cp-DHC 40-fach höher als in den unbehandelten Keratinozyten zum selben Zeitpunkt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch Cp-DHC hervorgerufene Hemmung der Bildung von Ceramiden mit 4,5-ungesättigter Sphingoidbase zu einer Störung der Differenzierung führte, die zur Folge hatte, dass die Keratinozyten in einem proliferierenden Zustand verblieben.

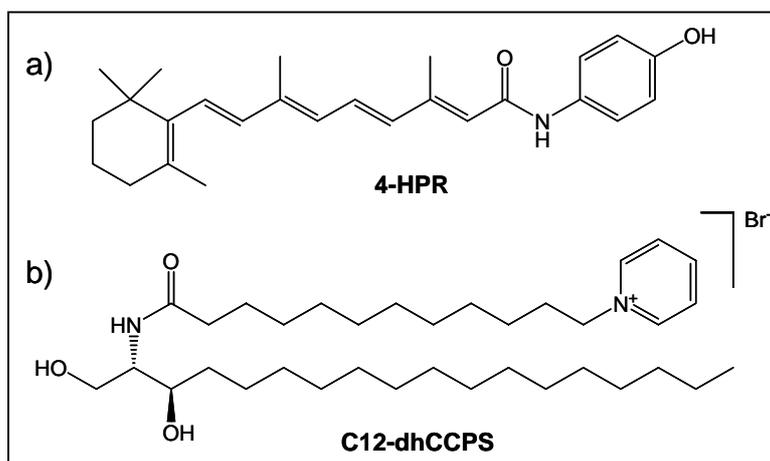
Ein ähnlicher Effekt auf die Differenzierungseigenschaft von Keratinozyten wurde für Stickstoffmonoxid (NO) beschrieben. Es gibt Hinweise, dass NO in höheren Konzentrationen die Proliferation von Keratinozyten begünstigt, während reduzierte NO-Spiegel mit ihrer Differenzierung in Verbindung stehen (Bruch-Gerharz *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2000). Zwar lösen exogen verabreichte NO-freisetzende Substanzen wie *S*-Nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP) in den meisten Zelltypen eine Erhöhung der Ceramidspiegel und Apoptose aus, doch in Konzentrationen unter 0.25 mM kann exogenes NO einen hyperproliferativen Zustand humaner epidermaler Keratinozyten verursachen (Krischel *et al.*, 1998). Das ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass der Prozess der Wundheilung mit der Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase in Verbindung steht. Offensichtlich fördert NO nach einem noch unbekanntem Mechanismus den Wundheilungsprozess, indem es die Differenzierung hemmt und stattdessen die

---

Proliferation stimuliert, damit die Wunde geschlossen werden kann (Stallmeyer *et al.*, 1999). Ähnlich wie Cp-DHC so führte auch der NO-Donor SNAP in einer Konzentration von 0.2 mM zu einer Erhöhung der Keratin 14-Expression (3-fach) und zu einer deutlichen Abnahme der mRNA-Mengen von Keratin 10 und Profilaggrin während der durch  $Ca^{2+}/LA$ -Shift induzierten Differenzierung humaner Keratinozyten. Dabei wurde außerdem eine Reduktion der mRNA-Mengen der meisten Ceramid-metabolisierenden Enzyme zu zum Teil vernachlässigbaren Mengen beobachtet (Gallala *et al.*, 2004). Hierin liegt ein Unterschied zu den Analysen mit Cp-DHC, das eine Hochregulierung der Expressionrate der am Ceramidstoffwechsel beteiligten Enzyme (Serin-Palmitoyltransferase, saure Sphingomyelinase, Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase, Glucosylceramid-Synthase, saure Ceramidase) innerhalb von 24 h nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (48 h Inkubation mit Cp-DHC) bewirkte. Offensichtlich dirigiert eine Hemmung der Desaturase-Reaktion durch Cp-DHC den Keratinozyten-Stoffwechsel unter den gewählten Bedingungen insgesamt in Richtung einer vermehrten Bildung von Sphingosin. Der weitere Metabolismus von Sphingosin würde schließlich zu Sphingosin-1-phosphat führen, welches im Gegensatz zu Ceramid in den meisten Zelltypen mitogene Effekte wie Proliferation vermittelt (Chalfant und Spiegel, 2005). Hierin liegt also ein weiterer Hinweis darauf, dass durch Hemmung der Insertion einer 4,5-Doppelbindung in das Sphingoidgerüst von Dihydroceramid die Differenzierung humaner Keratinozyten gestört wird. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass mit Cp-DHC behandelte Keratinozyten 24 h nach Beginn  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (48 h Inkubation mit Cp-DHC) im Lichtmikroskop nicht die in Kontrollzellen zu beobachtenden, typischen morphologischen Veränderungen einer beginnenden Differenzierung wie Vergrößerung und Abflachung zeigten, sondern wie basale, nicht proliferierende Kontrollzellen aussahen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu hatte SNAP keinen Einfluss auf die Morphologie kultivierter Keratinozyten während des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts (Gallala *et al.*, 2004).

Die Rolle von Dihydroceramiden und Ceramiden in Prozessen der Signaltransduktion, insbesondere bei der Vermittlung mitogener und antimitogener Effekte, wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Den Anlass dazu lieferten Ergebnisse von Untersuchungen mit Fenretinid, *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR, Abb. 4.2 a), einem synthetischen Analogon der *all trans*-Retinsäure. 4-HPR ist ein vielversprechender Wirkstoff für die Krebstherapie, der zur Zeit in klinischen Studien getestet wird. Bisher wurde angenommen, dass die antimitogenen Effekte wie Hemmung des Wachstums und Apoptose, die durch 4-HPR induziert werden, auf eine starke Erhöhung *de novo* gebildeten Ceramids zurückzuführen ist (Wang *et al.*, 2001). Zur Zeit mehren sich jedoch Berichte über Untersuchungen, in denen der Einfluss von 4-HPR auf den endogenen Gehalt an Dihydroceramid und Ceramid in verschiedenen Zelltypen mittels *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC/MS) analysiert wurde. Dabei zeigte sich, dass 4-HPR nicht zu einer Erhöhung des zellulären Ceramidgehalts, sondern zu einem dosisabhängigen Anstieg des Dihydroceramid-Anteils führte (Schulz *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006; Kravka *et al.*, 2007). Offensichtlich liegt der Grund dafür in einer Inhibierung der Dihydroceramid-Desaturase, die unter Verwendung eines neuen wasserlöslichen Dihydroceramid-Analogons (D-erythro-2-*N*-[12'-(1''-Pyridinium)-dodecanoyl]-4,5-dihydrosphingosinbromid, C12-dhCCPS, Abb. 4.2 b) (Szulc *et al.*, 2006) in humanen Neuroblastomazellen beobachtet wurde. Dabei wurde die Überführung von C12-dhCCPS in sein in 4,5-Position der Sphingoidbase ungesättigtes Desaturierungsprodukt C12-CCPS unter Zusatz von 4-HPR mittels LC/MS untersucht. Die Analyse ergab eine dosisabhängige Hemmung der Desaturase-Reaktion durch 4-HPR. Zwar ist der Mechanismus der Inhibierung noch

unbekannt, doch da die mRNA- und Proteinmengen der Dihydroceramid-Desaturase unter Zusatz von 4-HPR unverändert blieben, findet sie wahrscheinlich erst auf posttranslationaler Ebene statt (Kravka *et al.*, 2007). Allerdings wurde auch über eine Aktivierung der Serin-Palmitoyltransferase und der Dihydroceramid-Synthase (Sphinganin-*N*-Acyltransferase) durch 4-HPR berichtet (Wang *et al.*, 2001), so dass die Erhöhung zellulärer Dihydroceramidspiegel wahrscheinlich auf eine Kombination dieser Effekte zurückzuführen ist.



**Abb. 4.2** Strukturen von a) 4-HPR und b) C12-dhCCPS

Die Berichte über 4-HPR sind in Übereinstimmung mit einigen anderen Untersuchungen, die vermuten lassen, dass Dihydroceramiden biologische Funktionen zukommen, die bisher ausschließlich Ceramiden mit 4,5-ungesättigter Sphingoidbase zugesprochen wurden (Jiang *et al.*, 2004; Tserng und Griffin, 2004). Die Hinweise, dass die durch verschiedene Agenzien induzierten antimittogenen Effekte häufig gar nicht auf erhöhte Mengen endogenen Ceramids zurückzuführen sind, sondern mit einem Anstieg des zellulären Dihydroceramidgehalts in Verbindung zu stehen scheinen, führten jüngst zu der Hypothese, dass auch in früheren Studien eigentlich Dihydroceramid und nicht Ceramid das biologisch aktive Molekül gewesen sei (Zheng *et al.*, 2006; Kravka *et al.*, 2007). Aufgrund der bisher angewendeten Techniken zur Ceramid-Quantifizierung sei eine Unterscheidung zwischen Dihydroceramid und Ceramid jedoch meist nicht möglich gewesen. Dass sich Dihydroceramid-Analoga wie *N*-Acetylsphinganin (C2-Dihydroceramid) in früheren Studien als biologisch inaktiv erwiesen hätten (Bielawska *et al.*, 1993), sei möglicherweise auf die im Vergleich zu natürlichen Ceramiden verkürzte Fettsäurekette zurückzuführen. Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass nicht nur durch die exogene Gabe von C2-Ceramid Autophagie in Zellen ausgelöst wird (Scarlati *et al.*, 2004), sondern auch C2-Dihydroceramid dazu in der Lage ist (Zheng *et al.*, 2006). Möglicherweise entscheidet also die Summe aus Dihydroceramid- und Ceramidgehalt über die biologischen Effekte.

## 4.2 Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel bei Spinocerebellärer Ataxie Typ 2 (SCA2)

Da sich in jüngster Zeit die Hinweise mehren, dass Polyglutaminerkrankungen wie Morbus Huntington und SCA2 mit einer Störung des Lipidstoffwechsels verbunden sein könnten, wurde die Lipidzusammensetzung in Hirngewebe einer SCA2-Patientin und von SCA2-*knock out*-Mäusen analysiert. Dazu wurden jeweils Proben aus dem Cortex, der bei SCA2 weitgehend erhalten bleibt, und aus dem Kleinhirn, das von der Krankheit hauptsächlich betroffen ist (Prof. H. Braak, unveröffentlichte Beobachtungen), untersucht.

### 4.2.1 Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen einer SCA2-Patientin

Bei der Analyse der Lipidzusammensetzung im Kleinhirn der SCA2-Patientin zeigte sich ein dramatischer Mangel an Lipiden, die typischerweise im Myelin, das die Axone von Nervenzellen in multilamellaren Schichten umgibt, vorkommen. So war der Sulfatidgehalt im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe um 83 %, die GalCer-Menge um 85 % und der Anteil von SM mit langkettigen Fettsäuren um 75 % erniedrigt. Ebenfalls reduziert waren die Mengen von Lipiden, die sowohl in der Myelin-haltigen weißen als auch in der grauen Hirnsubstanz enthalten sind, wie Cholesterol (40 %), die Ethanolaminphosphoglyceride (25 %) und Phosphatidylcholin (35 %). Nur unwesentlich verändert war dagegen der Gehalt an kurzkettigem SM und an Gangliosiden, die nur in geringen Konzentrationen im Myelin, sondern hauptsächlich in der neuronalen Plasmamembran und damit in der grauen Hirnsubstanz zu finden sind.

Diese Ergebnisse sind Zeichen einer starken Schädigung der Myelinscheiden im Kleinhirn der SCA2-Patientin. Die Myelinschicht, die Nervenfasern wie ein Isolierband umgibt, ist in Abständen von ca. 1 mm von engen, nicht myelinisierten Lücken (Ranvier-Schnürringe) unterbrochen, über die der Nervenimpuls durch saltatorische Erregungsleitung weitergegeben wird. In myelinisierten Nerven pflanzen sich Impulse um den Faktor 10 schneller fort als in Nerven ohne Myelinschicht (Voet und Voet, 1994). Die Bedeutung von GalCer und Sulfatid für die Funktion des Myelins machten *knock out*-Mäuse deutlich, bei denen das Gen der Ceramid-Galaktosyltransferase inaktiv war und die demzufolge kein GalCer und kein Sulfatid bilden konnten. Diese Mäuse bildeten Myelin mit weitgehend normaler Struktur, da sie GlcCer statt GalCer darin einbauten. Dennoch war die Geschwindigkeit der Nervenleitung aufgrund der eingeschränkten Isolierfähigkeit der Myelinscheiden auf den Wert von unmyelinisierten Axonen reduziert. Die Mäuse entwickelten einen starken Tremor und eine Ataxie und starben am Ende der Myelinisierungsperiode (Bosio *et al.*, 1996; Coetzee *et al.*, 1996).

Lichtmikroskopische Untersuchungen bestätigen die Demyelinisierung in Kleinhirn und Rückenmark von SCA2-Patienten. Sie wurde jedoch bisher als sekundärer Effekt, der im Spätstadium der Krankheit als Folge einer allgemeinen Degeneration von Neuronen auftritt, angesehen (Rub *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der Lipidanalyse weisen aber darauf hin, dass es sich bei der

Demyelinisierung eher um einen initialen Effekt, z. B. aufgrund einer Schädigung der Myelinbildenden Oligodendrozyten, handelt, von dem die Nervenzellen selbst primär nicht betroffen sind.

Die Analyse der Lipidzusammensetzung im Cortex der SCA2-Patientin lieferte im wesentlichen den Beobachtungen im Kleinhirn entgegengesetzte Resultate. Die Mengen Myelin-spezifischer Lipide waren dort im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe stark erhöht (Sulfatid 4.3-fach, GalCer 2.4-fach, langkettiges SM 3.7-fach). Der Gangliosidgehalt war dagegen um bis zu 80 % erniedrigt. Eine Erklärung für diese Ergebnisse liegt möglicherweise in einer Interaktion von Ataxin-2 mit einem anderen Protein, das spezifisch nur im Cortex oder im Kleinhirn exprimiert wird.

#### **4.2.2 Analyse der Lipidzusammensetzung von Hirnarealen von SCA2-*knock out*-Mäusen**

Zur Klärung der Frage, ob die für SCA2 verantwortliche Expansion des Polyglutaminstrangs in Ataxin-2 zu einem Funktionsverlust des Proteins führt, wurde die Lipidzusammensetzung in Cortex und Kleinhirn von drei Monate alten SCA2-*ko*-Mäusen analysiert.

Abgesehen von einer geringfügigen Erhöhung der Ceramidmenge und einer leichten Reduktion des Gangliosidgehalts konnten im Cortex der *ko*-Mäuse keine wesentlichen Unterschiede zur Lipidzusammensetzung im Wildtypgewebe festgestellt werden. Das Kleinhirn der Ataxin-2-defizienten Mäuse wies im Vergleich zu den Kontrolltieren neben einem ebenfalls leicht erhöhten Ceramidgehalt und einer geringfügigen Erniedrigung sowohl lang- als auch kurzkettigen Sphingomyelins vor allem deutlich erhöhte Mengen anionischer GSL auf.

Die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung im Kleinhirn Ataxin-2-defizienter Mäuse unterschieden sich damit grundlegend von denjenigen im Kleinhirn der SCA2-Patientin, das einen starken Mangel der für Myelin typischen Lipide aufwies. Dies bedeutet, dass der Verlust von Ataxin-2 in Mäusen nicht zu den gleichen Lipidveränderungen im Gehirn führt wie die Existenz von variantem Ataxin-2 mit expandierter Polyglutaminkette in SCA2-Patienten.

Proteine mit langen Polyglutaminbereichen zeigen eine erhöhte Tendenz zur Bildung von Aggregaten. Für die meisten SCA-Typen wurden, primär in den betroffenen Geweben, intranukleäre Proteinaggregate in Form von Einschlusskörperchen nachgewiesen. Da die Einschlusskörperchen jedoch nur kurze Proteinfragmente, die die verlängerte Polyglutaminkette tragen, enthalten, werden die Proteine offenbar vor ihrem Transport vom Zytosol in den Zellkern proteolytisch gespalten (Schöls und Rieß, 2002). Zwar scheinen intranukleäre, neuronale Einschlusskörper für SCA2 kaum eine Rolle zu spielen, jedoch konnten im Gehirn von SCA2-Patienten zytosolische Aggregate nachgewiesen werden (Huynh *et al.*, 2000). Daher ist es denkbar, dass die Aggregation von Ataxin-2, möglicherweise in Copräzipitation mit anderen Proteinen, zu einer veränderten Funktion des Proteins führt. Es wurde auch über transgene Mäuse berichtet, die das humane SCA2-Gen mit einer Expansion des Polyglutaminstrangs auf 58 CAG-Codons trugen. Zur Lipidzusammensetzung ihres Gehirns sind jedoch keine Informationen erhältlich (Huynh *et al.*, 2000).

Die drei Monate alten SCA2-*ko*-Mäuse litten an Adipositas, hatten erhöhte Insulin- und Leptinspiegel im Blut und wiesen eine Reduktion der Insulinrezeptoren im Kleinhirn und eine

Anhäufung von Fetttropfchen in der Leber auf (Lastres-Becker *et al.*, 2007, in Vorbereitung). Damit zeigten sie typische Symptome eines Diabetes Typ 2 und des Metabolischen Syndroms, die darauf hinweisen, dass Ataxin-2 eine regulierende Funktion in den durch Insulin vermittelten Signalwegen haben könnte. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Erhöhung des Gangliosidgehalts, der im Kleinhirn der Ataxin-2-defizienten Mäuse beobachtet wurde. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Störungen im Sphingolipidstoffwechsels mit erhöhten Konzentrationen von Ceramid oder höheren Sphingolipiden in verschiedenen Geweben häufig mit einer Insulinresistenz, einem typischen Merkmal des Diabetes Typ 2 und des Metabolischen Syndroms, verbunden sind (Summers und Nelson, 2005). So wurde z. B. in Retinae von Ratten, die seit vier Wochen an Diabetes litten, eine Reduktion des Ceramidgehalts um 30 % bei gleichzeitiger Erhöhung der GlcCer-Menge um ebenfalls 30 % im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren beobachtet. Zusätzlich führte die Hemmung der GSL-Biosynthese mit Inhibitoren der GlcCer-Synthase zu einer Erhöhung der Insulinsensitivität in Neuronen der Netzhaut. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, dass durch eine Erhöhung des Gehalts an GlcCer und höheren GSL eine lokale Insulinresistenz ausgelöst wird, die letztendlich zum neuronalen Zelltod führt und damit zur Pathogenese der Diabetischen Retinopathie beiträgt (Fox *et al.*, 2006).

Das Gangliosid GM3 und höhere Ganglioside wurden ebenfalls als negative Regulatoren der durch Insulin vermittelten Signale beschrieben. Mäuse, denen die GM3-Synthase fehlte und die daher nicht in der Lage waren, die am häufigsten im Hirn vorkommenden Ganglioside GM1, GD1a, GD1b und GT1b zu synthetisieren, zeigten eine erhöhte Insulinsensitivität, die auf eine verstärkte Phosphorylierung des Insulinrezeptors im Skelettmuskel zurückzuführen war. Zudem waren diese Mäuse vor einer durch eine fettreiche Ernährung induzierten Insulinresistenz geschützt (Yamashita *et al.*, 2003).

In Anbetracht der offensichtlichen Rolle der GSL bei der Vermittlung von Insulinresistenz als einem typischen Merkmal eines Diabetes Typ 2 deuten die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich erhöhten Gangliosidmengen, die im Kleinhirn Ataxin-2-defizienter Mäuse gefunden wurden, darauf hin, dass Ataxin-2 eine regulierende Funktion im Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel einnimmt und dabei möglicherweise mit anderen bekannten Regulatoren der durch Insulin vermittelten Signalwege interagiert. Dafür sprechen auch Berichte über eine Patientin mit einer Expansion auf 49 CAG-Codons im SCA2-Gen, die seit Jahren täglich 250 g Butter zu sich nimmt und einen sehr milden Krankheitsverlauf ohne Reduktion des Unterhautfettgewebes zeigt (C. Seifried, persönliche Mitteilung). Metabolite der in Butter enthaltenen Lipide (vor allem Cholesterol und Triacylglyceride) dienen als Liganden von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation des Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt sind (Makishima, 2005; Kalaany und Mangelsdorf, 2006). Der Verlust von Unterhautfettgewebe ist auch das Hauptmerkmal der sogenannten Lipodystrophien, von denen es vererbte und erworbene Formen gibt. Zu den erworbenen Formen gehören neben den lokalen, durch Druck, Medikamentinjektionen oder Entzündungen des Unterhautfettgewebes induzierten Formen die durch Proteaseinhibitoren bei der antiretroviralen Therapie des *human immunodeficiency virus* (HIV) ausgelösten Lipodystrophien. HIV-Patienten mit Lipodystrophie entwickeln zusätzlich eine Insulinresistenz. Auch in diesem Zusammenhang wurde über eine Störung der Regulation von an der Adipogenese beteiligten Transkriptionsfaktoren durch Proteaseinhibitoren berichtet (Garg, 2004).

## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Material**

#### **5.1.1 Zellen, Gewebe und Tiere**

##### **5.1.1.1 Humane Keratinozyten**

Vorhäute von unter 10 Jahre alten Patienten wurden von Herrn Dr. Thomas Meyer, Praxisklinik Grevenbroich, zur Verfügung gestellt. In der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Bonn wurden daraus von Frau Petra Gerhards humane epidermale Keratinozyten gewonnen und nach einer Modifikation (O'Keefe *et al.*, 1982) der Methode von Rheinwald und Green (Rheinwald und Green, 1975) in Kultur genommen. Alle Experimente wurden mit Keratinozyten der 2. bis 4. Passage durchgeführt.

##### **5.1.1.2 Humane Fibroblasten**

Humane Normalfibroblasten aus Vorhäuten von 3-4 Jahre alten Jungen standen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

##### **5.1.1.3 Primäre Neuronen aus Kleinhirnen von Mäusen**

Primäre Neuronen aus Kleinhirnen sechs Tage alter Mäuse, die nach der Methode von Trenkner und Sidman (Trenkner und Sidman, 1977) präpariert worden waren, wurden von Frau Priv.-Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert zur Verfügung gestellt.

##### **5.1.1.4 Humanes SCA2-Hirngewebe und gesundes Kontrollhirngewebe**

Gefrorene Autopsien aus dem Kleinhirn und dem Cortex einer Patientin mit einer Expansion auf 52 CAG-Codons im SCA2-Gen, die im Februar 2002 im Alter von 25 Jahren im Endstadium der Erkrankung verstorben war, wurden von Herrn Prof. Dr. Auburger und Frau Dr. Carola Seifried, Klinik für Neurologie der Universität Frankfurt/Main, zur Verfügung gestellt. In Alter und Geschlecht entsprechendes Kleinhirn- bzw.- Cortexgewebe wurde über die Hirngewebebank des *Brain-Net*, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, München, erhalten. Es stammte von zwei Patientinnen, von denen die eine im Alter von 21 Jahren an Primärer Lungenfibrose und die andere 23-jährig an der chronischen Darmerkrankung *Colitis ulcerosa* verstorben war.

### 5.1.1.5 Hirngewebe von SCA2-*knock out*-Mäusen

SCA2-*knock out*-Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Auburger, Klinik für Neurologie, Frankfurt am Main, von Frau Dr. Isabel Lastres-Becker generiert. Hirngewebe aus Kleinhirn und Cortex dieser Mäuse und von Wildtyp-Mäusen von Frau Dr. Lastres-Becker präpariert und zur Verfügung gestellt.

### 5.1.2 Geräte

Gerät	Typ, Hersteller/Vertreiber	Sitz
Apparatur für Gelelektrophorese	Anfertigung der Mechanikwerkstatt der Chemischen Institute der Universität Bonn	
Autoklaven	FVS3, Fedegari Varioklav 50050, H + P Labortechnik	Pavia (I) Oberschleißheim (D)
Bio Imaging Analyzer	Fujix BAS 1000, Raytest	Straubenhardt (D)
Brutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero, Heraeus	Hanau (D)
DC-Horizontalkammern	für 20 × 10 cm, 10 × 10 cm DC-Platten, Camag	Berlin (D)
DC-Plattenheizer	TLC Plate Heater III, Camag	Berlin (D)
DC-Probenauftragegerät	Linomat IV, Camag	Berlin (D)
DC-Tanks	für 20 × 20 cm DC-Platten, Desaga	Heidelberg (D)
Densitometer	CS-9301PC, Shimadzu	Kyoto (J)
ESI-QToF-Massenspektrometer	Q-ToF-2 Hybrid Quadrupol-Massenspektrometer mit Nanoflow-Interface, Micromass	Manchester (GB)
Flüssigszintillationszähler	Tri-Carb 1600 TR, Canberra Packard	Meriden, CT (USA)
Geldokumentationseinheit	CS1, Cybertech	Berlin (D)
Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage	BalTec, Coating System MED 020, Oerlikon Balzers	Bingen (D)
Homogenisator	Typ 853202, B. Braun	Melsungen (D)
Mikroplatten-Photometer	Multiskan Ascent, Labsystems	Helsinki (FIN)
Mikroskop	Lichtmikroskop Diavert, Leitz	Wetzlar (D)
PCR-Thermocycler	DNA Engine Peltier Thermal Cycler PTC-200, Bio-Rad	München (D)
pH-Meter	SevenEasy, Mettler Toledo	Giessen (D)
Pipetten	MicroOne, Starlab Reference, Eppendorf Gilson Pipetman, Abimed Handdispenser HandyStep, Brand Pipet-lite, Rainin EDP3, Rainin	Ahrensburg (D) Hamburg (D) Langenfeld (D) Wertheim (D) Oakland, CA (USA) Oakland, CA (USA)
<i>Real-time</i> PCR System (TaqMan)	ABI PRISM 7700 Sequence Detector System, Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)
Reinstwasseranlage	Super-Q, Millipore	Molsheim (F)
Schüttelwasserbad	Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel (D)
Spannungsgerät	Power Supply, Camag	Berlin (D)
Spektrophotometer	SmartSpec Plus, Bio-Rad	München (D)

Spitzenzieher	Micropipette Puller PC-10, Narishige	Tokyo (J)
Sterilbänke	LaminAir HA 2472 GS, Heraeus	Hanau (D)
	LaminAir HB 2448, Heraeus	Hanau (D)
	Steril GARD vbm-400, Baker	Sanford, ME (USA)
Sterilisator	U50ü, Memmert	Schwabach (D)
Thermomixer	comfort, Eppendorf	Hamburg (D)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100, Bandelin	Berlin (D)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250,	Schwäbisch
	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik	Gmünd (D)
UV-Transilluminator	Biometra	Göttingen (D)
Vortexgerät	MS1 Minishaker, IKA	Staufen (D)
Waagen	LC 621 S, Sartorius	Göttingen (D)
	SBC 31, Sartorius	Göttingen (D)
	Typ E6, Mettler	Zürich (CH)
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R, Kendro	Langensfeld (D)
	Rotina 48 R, Hettich	Mülheim/Ruhr (D)
	Centrifuge 5417 C, Eppendorf	Hamburg (D)
	Centrifuge 5412, Eppendorf	Hamburg (D)
	Micro-Zentrifuge PC-100, Kisker	Steinfurt (D)

### 5.1.3. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller/Vertreiber	Sitz
Abdeckfolien für PCR-Platte, StarSeal		
Advanced Polyolefin Film Type D	Starlab	Ahrensburg (D)
DC-Aluminiumfolien, Kieselgel 60, 20 × 20 cm	Merck	Darmstadt (D)
DC-Glasplatten, Kieselgel 60, 20 × 20 cm	Merck	Darmstadt (D)
Glaskapillaren für ESI-Spitzen, Borosilicat, L = 1060 mm, D <sub>a</sub> = 1.00 mm, D <sub>i</sub> = 0.80 mm	Hilgenberg	Malsfeld (D)
HPTLC-Platten, Kieselgel 60, 20 × 10 cm, 10 × 10 cm	Merck	Darmstadt (D)
Imaging Plates, BAS-MS 2040 ( <sup>14</sup> C), BAS-TR 2040 ( <sup>3</sup> H)	Fujifilm	Nakanuma (J)
Kieselgel 60 (40-63 µm)	Merck	Darmstadt (D)
Microplatte, 96 well	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
PCR-Platte, Certified Rigid Thin wall, 96 well × 0.2 ml skirted plates	Starlab	Ahrensburg (D)
Schraubkappengläser, Pyrex	Bibby Sterilin	Stone (GB)
Silanisierte Glasfaserwatte	Macherey-Nagel	Düren (D)
Sterilfilter	Sartorius	Göttingen (D)
Szintillationsvials, Polyethylen, 6 ml	Packard	Meriden, CT (USA)
Zellkulturflaschen, -schalen	Corning	Corning, NY (USA)
	Falcon	Heidelberg (D)
	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)
Zellschaber	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml	Falcon	Heidelberg (D)
	Greiner Bio-One	Frickenhausen (D)

## 5.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien waren, sofern nicht anders angegeben, von höchstem erhältlichem Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde über eine Reinstwasseranlage (Super-Q, Millipore) mittels Vorfilter, Ionenaustauscher und Ultrafilter aufgereinigt.

### 5.1.4.1 Chemikalien und Reagenzien für Zellkulturstudien

Reagenz	Hersteller/Vertreiber	Sitz
<i>N</i> -Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Aminosäuren (L-Histidin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Tyrosin)	Sigma	Taufkirchen (D)
Calciumchlorid	Sigma	Taufkirchen (D)
DMEM-Medium ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	PAA	Pasching (A)
Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> , EGF)	Biochrom	Berlin (D)
Ethanolamin	Biochrom	Berlin (D)
Fötales Kälberserum (FKS)	Cytogen	Sinn (D)
Fumonisin B1 (FB1)	Sigma	Taufkirchen (D)
Hydrocortison	Biochrom	Berlin (D)
Insulin	Biochrom	Berlin (D)
Linolsäure	Sigma	Taufkirchen (D)
MCDB 153-Basalmedium	Biochrom	Berlin (D)
MCDB 153-Basalmedium, Serin-defizient (Spezialmedienherstellung)	Biochrom	Berlin (D)
MEM-Medium (Serin-defizient) ( <i>Minimal Essential Medium</i> )	PAA	Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching (A)
Pferdeserum (PS)	Cytogen	Sinn (D)
Phosphoethanolamin	Biochrom	Berlin (D)
Rinderhypophysenextrakt ( <i>bovine pituitary extract</i> , BPE)	Becton Dickinson	Heidelberg (D)
Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma	Taufkirchen (D)
Trypsin, 2.5 %	Invitrogen	Karlsruhe (D)

#### Radiochemikalien

L-[3- <sup>14</sup> C]-Serin (50-62 Ci/mol)	Amersham Biosciences	Freiburg (D)
<i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D- <i>erythro</i> -C <sub>18</sub> -sphinginin	im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (Kap. 5.2.1.1)	
<i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D- <i>erythro</i> -C <sub>18</sub> -sphingosin	im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (Kap. 5.2.1.2)	

Puffer

- Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS):  
Für einen zehnfach konzentrierten Puffer wurden 2 g KCl, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.45 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 80 g NaCl in 1 l Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7.4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde der konzentrierte Puffer mit Wasser (bidest.) 1:10 verdünnt.
- Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (Trypsin/EDTA) für die Zellernte:  
0.5 % Trypsin für die Ernte von Keratinozyten bzw. 0.25 % Trypsin für Fibroblasten, 0.02 % Ethylendiamintetraessigsäure in PBS, pH 7.4

Medien

a) Humane Keratinozyten:

Für die Keratinozytenkultur wurde MCDB 153-Medium verwendet. Es wird als *Basalmedium* mit 0.03 mM CaCl<sub>2</sub> und 0.6 mM Serin angeboten. Das gebrauchsfertige *Komplettmedium* mit 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> (*low Ca<sup>2+</sup>*-Medium) wurde durch Zusatz folgender Supplemente erhalten:

<b>Zusätze zum MCDB 153-Basalmedium</b>	
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	4.8 mM
Calciumchlorid	100 µM
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	100 pg/ml
Ethanolamin	100 µM
L-Histidin	240 µM
Hydrocortison	400 ng/ml
Insulin	5 µg/ml
L-Isoleucin	750 µM
L-Methionin	90 µM
Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
L-Phenylalanin	90 µM
Phosphoethanolamin	100 µM
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	24 µg/ml
L-Tryptophan	45 µM
L-Tyrosin	60 µM

Das *Differenzierungsmedium* mit 1.1 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 µM Linolsäure (*high Ca<sup>2+</sup>/LA-Medium*) wurde durch Zugabe von zusätzlichem Calciumchlorid und Linolsäure-Rinderserumalbumin (BSA)-Komplex zum *Komplettmedium* hergestellt.

Für die Markierungsexperimente mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde Serin-defizientes MCDB 153-Basalmedium verwendet, das zur Herstellung von *Serin-defizientem Komplett-* bzw. *Differenzierungsmedium* wie oben beschrieben supplementiert wurde.

b) Humane Fibroblasten:

Für die Fibroblastenkultur wurde DMEM-Medium mit 10 % FKS verwendet. Für die Markierungsexperimente mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde MEM-Medium, das nur 0.3 % FKS enthielt, eingesetzt.

c) Murine Kleinhirnneuronen:

Für die Kultivierung primärer Kleinhirnneuronen von Mäusen wurde DMEM-Medium mit 10 % PS verwendet. Zur Unterbindung der Zellteilung wurde dem Medium 1 % Cytosinarabinosid (Ara C) zugesetzt. Bei den Markierungsexperimenten mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde MEM-Medium mit 1 % Ara C und 0.3 % PS eingesetzt.

BSA-Komplexe hydrophober Substanzen

Zur Herstellung des Linolsäure-BSA-Komplexes für das *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium wurde 1 ml einer 10 mM Lösung von Linolsäure in Ethanol in einem Schraubkappenglas oder Zentrifugenröhrchen im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und anschließend mit 10 ml MCDB 153-Medium mit 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>, in dem 200 mg BSA gelöst waren, versetzt. Diese Mischung wurde dann zehnmal hintereinander abwechselnd für 10 Sekunden auf 60 °C erhitzt und anschließend für 10 Sekunden gevortext. Die so erhaltene Stammlösung des Linolsäure-BSA-Komplexes wurde bei -20 °C gelagert und bei der Zugabe zum *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium 1:100 verdünnt.

Bei den metabolischen Markierungsstudien mit *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphinganol ([<sup>14</sup>C]-Dihydroceramid) und *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphingosin ([<sup>14</sup>C]-Ceramid) wurden diese Markierungssubstanzen den Keratinozyten ebenfalls als BSA-Komplexe angeboten. Zur Herstellung der Komplexe wurde hier jedoch 1 ml einer 1 mM Lösung von [<sup>14</sup>C]-Dihydroceramid bzw. [<sup>14</sup>C]-Ceramid in Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) eingedampft und mit 1 ml PBS-Puffer, in dem 20 mg BSA gelöst waren, versetzt. Die Mischung wurde wie oben beschrieben weiter behandelt, jedoch ohne weitere Verdünnung ins Medium gegeben.

### 5.1.4.2 Chemikalien und Reagenzien für Lipidaufarbeitung und -analytik

Reagenz	Hersteller/Vertreiber	Sitz
Ammoniaklösung, 25 %	Merck	Darmstadt (D)
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma	Taufkirchen (D)
Chloroform, p.a.	Merck	Darmstadt (D)
DEAE-Sephadex A-25	Pharmacia	Uppsala (S)
Essigsäure, 100 %	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol, absolut	Baker	Deventer (NL)
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, 4 % (w/v) Lösung	Sigma	Taufkirchen (D)
LiChroprep RP-18 (40-63 µm)	Merck	Darmstadt (D)
Methanol, p.a.	Acros	Geel (B)
Natriumborat Decahydrat	Sigma	Taufkirchen (D)
Natrium- <i>meta</i> -arsenit	Merck	Darmstadt (D)
Rinderserumalbumin, Fettsäure-frei ( <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma	Taufkirchen (D)
Salze	Merck	Darmstadt (D)
Szintillationsflüssigkeit, Ultima Gold	PerkinElmer	Boston, MS (USA)

#### Lipidstandards

Cardiolipin (aus Rinderherz)	Avanti Polar Lipids	Alabaster, AL (USA)
Cholesterol	Sigma	Taufkirchen (D)
Dioleoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	Sigma	Taufkirchen (D)
Dioleoyl-L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin	Sigma	Taufkirchen (D)
Galaktosylceramid (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
GD1a (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
Glucosylceramid (aus humaner Gaucher-Milz)	Sigma	Taufkirchen (D)
GM1 (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
GM2 (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
GM3 (aus Hundeblood)	Sigma	Taufkirchen (D)
Laktosylceramid (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
Neutraler Glykosphingolipid-Qualmix (Glucosylceramid, Laktosylceramid, Globotriaosylceramid, Globotetraosylceramid)	Matreya	Pleasant Gap, PA (USA)
Ölsäure-cholesterylester	Sigma	Taufkirchen (D)
<i>N</i> -Palmitoyl-DL-Dihydrosphingosin (DL-Dihydroceramid)	Sigma	Taufkirchen (D)
Sphingomyelin (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)
Squalen	Sigma	Taufkirchen (D)
Stearinsäure	Sigma	Taufkirchen (D)
<i>N</i> -Stearoyl-Phytosphingosin (Ceramid(NP))	Cosmoferm (jetzt Degussa-Goldschmidt)	Delft (NL) Essen (D))
<i>N</i> -Stearoyl-Sphingosin (Ceramid(NS))	Sigma	Taufkirchen (D)
Sulfatid (aus Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen (D)

Methanolische RP-18 Suspension

LiChroprep RP-18-Material wurde in Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) aufgeschlemmt. Nach 30 Minuten wurde das überstehende Lösungsmittel abdekantiert. Die RP-18 Suspension wurde anschließend vier- bis fünfmal mit Methanol gewaschen. Nach erneutem Aufschlemmen in Methanol war die Suspension gebrauchsfertig. Das RP-18-Material wurde im Verhältnis 1:1 (w/v) in Methanol gelagert.

Methanolische DEAE-Sephadex A-25 Suspension in Acetatform

Kommerziell erhältliches Diethylaminoethyl-(DEAE-)Sephadex A-25 liegt in der Chloridform vor. Vor Verwendung zur Trennung von anionischen und neutralen Lipiden muss es zunächst in die Acetatform überführt werden. Dazu wurde das Säulenmaterial in einem Büchnertrichter auf Filterpapier nacheinander mit Methanol und Wasser (bidest.) gewaschen. Anschließend wurde so lange mit einer 1 M wässrigen Ammoniumacetatlösung gewaschen, bis im Durchlauf keine Chloridionen mehr nachweisbar waren. Für den Chloridionennachweis wurde der Durchlauf mit Silbernitratlösung versetzt. Löste sich der entstehende weiße Niederschlag bei Zugabe von Salpetersäure, waren keine Chloridionen mehr in der Lösung enthalten. Nach gründlichem Waschen mit Methanol und Wasser (bidest.) wurde die Acetatform des Säulenmaterials im Verhältnis 1:1 (w/v) in Methanol gelagert.

**5.1.4.3 Chemikalien und Reagenzien für die *Real-time* quantitative PCR**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Sitz</b>
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP Master Mix, je 5 mM)	Eurogentec	Seraing (B)
Magnesiumchloridlösung, 25 mM	Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)
Purescript RNA Isolation Kit	Genra Systems	Minneapolis, MN (USA)
Reverse Transkriptase (rMoMuLV, MultiScribe, 50 U/μl)	Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)
Reverse Transkriptase Puffer, 5×	Promega	Mannheim (D)
RNase Inhibitor (RNasin, 20 U/μl)	Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)
Synthetische Oligonukleotide (Primer, fluoreszenzmarkierte Sonden)	Invitrogen (Gibco) Eurogentec	Karlsruhe (D) Seraing (B)
Taq-DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold, 5 U/μl)	Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)
TaqMan Puffer A, 10×	Applied Biosystems (Applera)	Darmstadt (D)

Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von H. Gallala konstruiert und auf ihre Spezifität getestet (Gallala *et al.*, 2004). Alle Nukleotide sind von links nach rechts vom 5'- zum 3'-Ende aufgelistet. Alle Sonden enthielten den Reporter-Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), der kovalent an das 5'-Ende gebunden war und den Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA), der mit dem 3'-Ende verknüpft war. Zusätzlich waren die Sonden am 3'-Ende

mit einer Phosphatgruppe versehen, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu verhindern.

#### **Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase**

Sense Primer CAT ATG GTG CCC AAC CCT G  
Antisense Primer GGG TCA AGA GAG TCA CAG TAC GA  
Sonde CCT CCA ACC TCG GTC AGC TAT CGC TT

#### **Glucosylceramid-Synthase**

Sense Primer GGT CCG CAA CTT TGT CGA TAG  
Antisense Primer CCA CCA ACG CCA CTC TCT G  
Sonde GTG CCC GTG TGA TTA GCC TGG ATG G

#### **Keratin 10**

Sense Primer ATA ATG CCA ACA TCC TGC TTC A  
Antisense Primer AGG CCG TTG ATG TCA GCC T  
Sonde GTC ATC AGC TGC CAG CCT TGC ATT G

#### **Keratin 14**

Sense Primer GGC TTT GCT GGT GGT GAT G  
Antisense Primer CTG CCT CTG GTA CCA GTC ACG  
Sonde CCA TGC AGA ACC TCA ATG ACC GCC

#### **Porphobilinogen-Deaminase**

Sense Primer CTG CAC GAT CCC GAG ACT CT  
Antisense Primer CCT CCA GTC AGG TAC AGT TGC C  
Sonde CTG CAG TGT GCC AGT AGC CGT GCA TA

#### **Profilaggrin**

Sense Primer CCA TCA TGG ATC TGC GTG G  
Antisense Primer CAC GAG AGG AAG TCT CTG CGT  
Sonde GAG TGC CCA TGA CTG GCT CTG TCT TCA

#### **Saure Ceramidase**

Sense Primer TGA ACT CGA TGC TAA GCA GGG T  
Antisense Primer GGT GCG GTT CAG ACA CAT CTT  
Sonde TCT TCC TTG ATG ATC GCA GAA CGC C

#### **Saure Sphingomyelinase**

Sense Primer GGC ACT GTC TGA AGA GCT GG  
Antisense Primer AGA AGA CCT CAA ATT CAT CCA CAT  
Sonde ACC GAA TTG TAG CCA GGT ATG AGA ACA CC

#### **Serin-Palmitoyltransferase, Untereinheit LC2**

Sense Primer GGA GAT GCT GAA GCG GAA CA  
Antisense Primer GGT ATG AGC TGC TGA CAG GCA  
Sonde CAG GAA ATC CAA CCA CAA CGA CAC CG

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Synthese radioaktiver Substanzen

#### 5.2.1.1 Synthese von *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphinganin

Eine Lösung von 1 mCi/ml des Natriumsalzes der [1-<sup>14</sup>C]-Octansäure in Ethanol (500 µl, 8.8 µmol, 57 Ci/mol) wurde im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 500 µl Wasser aufgenommen und mit konz. Salzsäure auf pH 1-2 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit 2 ml Dichlormethan wurden die organischen Phasen vereinigt und im Stickstoffstrom bis auf ca. 1 ml eingeeengt. Nach Zugabe einer Lösung von Sphinganin (10.0 mg, 33.3 µmol) in 2 ml Dichlormethan, Triethylamin (10 µl, 72 µmol) und *N*-(3-Dimethylaminpropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (8 µl, 44 µmol) wurde die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktion verlief über einige Tage und wurde währenddessen mehrmals dünnschichtchromatographisch auf ihren Fortgang überprüft. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Reaktionsmischung im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 20:1) gereinigt.

Gesamtmenge eingebauter Radioaktivität: 19.45 µCi (3.89 %); spezifische Aktivität: 57 Ci/mol; Reinheit: 95.4 %.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.28 (Chloroform/Methanol 20:1).

ESI-QToF-MS (<sup>12</sup>C<sub>25</sub><sup>14</sup>CH<sub>53</sub>NO<sub>3</sub>):  $m/z = 881.78 [2M+H]^+$ ,  $452.39 [M+Na]^+$ ,  $430.39 [M+H]^+$ ,  $412.39 [(M+H)-H_2O]^+$ .

#### 5.2.1.2 Synthese von *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphingosin

Die Synthese erfolgte entsprechend der Herstellung von *N*-[1-<sup>14</sup>C]-Octanoyl-D-*erythro*-C<sub>18</sub>-sphinganin (Kap. 5.2.2.1).

Ansatz: 1 mCi/ml Natrium Salz der [1-<sup>14</sup>C]-Octansäure in Ethanol (500 µl, 8.8 µmol, 57 Ci/mol), Sphingosin (10 mg, 33.4 µmol), *N*-(3-Dimethylaminpropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (8 µl, 44 µmol), Triethylamin (10 µl, 72 µmol).

Gesamtmenge eingebauter Radioaktivität: 5.55 µCi (1.11 %); spezifische Aktivität: 57 Ci/mol; Reinheit: 98.4 %.

R<sub>F</sub>-Wert: 0.28 (Chloroform/Methanol 20:1).

ESI-QToF-MS (<sup>12</sup>C<sub>25</sub><sup>14</sup>CH<sub>51</sub>NO<sub>3</sub>):  $m/z = 877.81 [2M+H]^+$ ,  $450.39 [M+Na]^+$ ,  $428.42 [M+H]^+$ ,  $410.40 [(M+H)-H_2O]^+$ .

## 5.2.2 Zellkultur

### 5.2.2.1 Kultur humaner Keratinozyten

#### Kultivierung bis zur Konfluenz

Humane Keratinozyten (2.-4. Passage) wurden in *Komplettmedium (low Ca<sup>2+</sup>-Medium*, Kap. 5.1.4.1) bei 37 °C unter 8 % CO<sub>2</sub> und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre als Monolayer bis zur Konfluenz kultiviert. Das *Komplettmedium* wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die konfluenten basalen Keratinozyten wurden anschließend entweder der Differenzierung unterworfen oder für metabolische Markierungsstudien verwendet.

#### Differenzierung

Zur Induktion der Differenzierung der Keratinozyten wurden die konfluenten Zellen für weitere 7 Tage in *Differenzierungsmedium (high Ca<sup>2+</sup>/LA-Medium*, Kap. 5.1.4.1) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder geerntet oder für metabolische Markierungsstudien verwendet.

#### Metabolische Markierungsstudien

Der Einfluss der Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC auf den Stoffwechsel humaner Keratinozyten wurde durch metabolische Markierungsstudien mit unterschiedlichen radiomarkierten Substanzen untersucht. Cp-DHC und Db-DHC wurden dem Medium als 10 mM Lösung in Ethanol zugesetzt. Vor Zugabe des jeweiligen Markierungsreagenzes wurden die Zellen stets 24 h mit der zu untersuchenden Verbindung bei 37 °C vorinkubiert. Zur Markierung wurden die basalen bzw. differenzierten Keratinozyten anschließend im betreffenden Medium (*low* bzw. *high Ca<sup>2+</sup>/LA-Medium*), das mit der jeweiligen radioaktiven Substanz versetzt worden war, kultiviert (*Pulse*). Anschließend wurden die Zellen entweder geerntet oder im jeweiligen Medium ohne Zusatz von radioaktiver Substanz über den gewünschten Zeitraum weiter inkubiert (*Chase*) und dann geerntet.

Im Falle von Markierungen mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde Serin-defizientes *low* bzw. *high Ca<sup>2+</sup>/LA-Medium* verwendet. In diesem wurden die Keratinozyten zunächst in Gegenwart von Cp-DHC bzw. Db-DHC eine Stunde vorinkubiert. Nach Zugabe von L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin ins Medium wurden die Zellen für den gewünschten Zeitraum markiert und anschließend geerntet.

Die hydrophoben radioaktiven Substanzen [<sup>14</sup>C]-Dihydroceramid und [<sup>14</sup>C]-Ceramid wurden dem Medium als BSA-Komplex zugesetzt. Die Markierung erfolgte dabei auf zwei unterschiedliche Weisen:

a) 1 h *Pulse* bei 4 °C, 1 h *Chase* bei 37 °C

Die Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium der Differenzierung unterzogen. Es folgte eine Vorinkubation mit Cp-DHC in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium über 24 h bei 37 °C.

Zur metabolischen Markierung wurden die Keratinozyten in Gegenwart von Cp-DHC eine Stunde einem *Pulse* mit [<sup>14</sup>C]-Dihydroceramid bzw. [<sup>14</sup>C]-Ceramid in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium ausgesetzt. Die Inkubation erfolgte dabei bei 4 °C, um den Vesikeltransport und damit insbesondere die endozytotische Aufnahme der Markierungsreagenzien zu blocken. Nach Abnahme des Mediums wurden die Keratinozyten dreimal mit PBS gewaschen und eine weitere Stunde in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium unter Zusatz von Cp-DHC, jedoch ohne Markierungsreagenz, bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

b) 24 h *Pulse* bei 37 °C unter Zusatz von Fumonisin B1

Durch Zusatz von FB1, einem Inhibitor der Sphinganolin-*N*-Acyltransferase, sollte die Acylierung endogener Sphingoid-Basen durch aus den Markierungsreagenzien freigesetzte radiomarkierte Octansäure unterbunden werden. FB1 wurde dem Medium als 10 mM Lösung in sterilem PBS zugesetzt.

Die Keratinozyten wurden in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 7 Tage in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium der Differenzierung unterzogen. Anschließend wurden die Zellen 24 h in Gegenwart von Cp-DHC und 25 µM FB1 in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium bei 37 °C vorinkubiert. Die Markierung der Keratinozyten erfolgte dann in Gegenwart von Cp-DHC und 25 µM FB1 in *high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium über 24 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen geerntet.

Die Inkubationszeiten und eingesetzten Aktivitäten der verwendeten Radiochemikalien können der folgenden Tabelle entnommen werden:

<b>Radio substanz</b>	<b>Aktivität (Konzentration) im Medium</b>	<b>Medium</b>	<b>Inkubationszeit</b>
L-[3- <sup>14</sup> C]-Serin	1 µCi/ml (17.5 µM)	Serin-defizientes MCDB 153	24-72 h Pulse
<i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D-erythro-C <sub>18</sub> -sphinganolin (als BSA-Komplex)	285 nCi/ml (5 µM)	normales MCDB 153	1h Pulse (4 °C) + 1h Chase bzw. 24 h Pulse (+ 25 µM FB1)
<i>N</i> -[1- <sup>14</sup> C]-Octanoyl-D-erythro-C <sub>18</sub> -sphingosin (als BSA-Komplex)	257 nCi/ml (4.5 µM)	normales MCDB 153	1h Pulse (4 °C) + 1h Chase bzw. 24 h Pulse (+ 25 µM FB1)

### Zellernte

Zur Zellernte wurde zunächst das Medium abgenommen. Dreimal 10 µl des abgenommenen Mediums wurden für eine Radioaktivitätsbestimmung verwendet. Die Keratinozyten wurden 5 min bei 37 °C mit 0.5 % Trypsin/EDTA-Lösung (Kap. 5.1.4.1) inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Schraubkappenglas überführt. Noch anhaftende Zellen wurden mit zweimal 3 ml PBS vom Boden der Kulturflasche abgeschabt und ebenfalls in das Schraubkappenglas gegeben. Nach Zentrifugation (6000 rpm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Zellpellet bei -20 °C eingefroren. Dreimal 10 µl des Überstandes wurden für eine Radioaktivitätsbestimmung verwendet.

### **5.2.2.2 Kultur humaner Fibroblasten**

#### Kultivierung bis zur Konfluenz

Humane Fibroblasten (SCA2-Fibroblasten bzw. Normalfibroblasten) wurden in DMEM-Medium mit 10 % FKS bei 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Die konfluenten Fibroblasten wurden anschließend entweder geerntet oder für metabolische Markierungsstudien verwendet.

#### Metabolische Markierungsstudien

Für die Markierungen mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde MEM-Medium mit 0.3 % FKS benutzt. In diesem wurden die Fibroblasten zunächst eine Stunde vorinkubiert. Nach Zugabe von L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin (1 µCi/ml Medium, 17.5 µM) wurden die Zellen 48 h markiert und anschließend geerntet.

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC auf den Stoffwechsel humaner Fibroblasten wurde diese dem Medium als 10 mM Lösung in Ethanol zugesetzt. Die Zellen wurden zunächst 24 h in DMEM-Medium mit 0.3 % FKS mit der zu untersuchenden Verbindung vorinkubiert und anschließend in Gegenwart des jeweiligen Analogons mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wie oben beschrieben metabolisch markiert.

#### Zellernte

Die Zellernte erfolgte wie in Kap. 5.2.1.1 für Keratinozyten beschrieben. Jedoch wurde für die Fibroblastenernte 0.25 % Trypsin/EDTA-Lösung verwendet (Kap. 5.1.4.1).

### **5.2.2.3 Kultur primärer Kleinhirnneuronen von Mäusen**

Das Vorgehen folgt van Echten und Sandhoff, 1989.

#### Kultivierung und Differenzierung

Primäre Neuronen aus Kleinhirnen von Mäusen wurden nach der Aussaat in DMEM-Medium mit 10 % PS bei 35.5 °C unter 5 % CO<sub>2</sub> und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Nach 24 h wurde dem Medium zur Unterbindung der Zellteilung 1 % Ara C zugesetzt (Messer, 1977). Nach weiteren fünf Tagen waren die Zellen ausdifferenziert und wurden für metabolische Markierungsstudien verwendet.

#### Metabolische Markierungsstudien

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden Dihydroceramid-Analoga Cp-DHC und Db-DHC auf den Stoffwechsel muriner Kleinhirnneuronen wurde diese dem Medium als 10 mM Lösung in Ethanol zugesetzt. Die Zellen wurden zunächst 24 h in DMEM-Medium mit 1 % Ara C und 0.3 % PS mit der zu untersuchenden Verbindung vorinkubiert. Zur Markierung mit L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin wurde anschließend MEM-Medium mit 1 % Ara C und 0.3 % PS verwendet. In diesem wurden die Neuronen in Gegenwart des jeweiligen Analogons eine Stunde vorinkubiert. Nach Zugabe von L-[3-<sup>14</sup>C]-Serin ins Medium wurden die Zellen für den gewünschten Zeitraum markiert und anschließend geerntet.

#### Zellernte

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit je 500 µl kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1.5 ml PBS pro 8 cm<sup>2</sup>-Zellschale aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Schraubkappenglas überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Zellpellet bei -20 °C eingefroren.

### **5.2.3 Homogenisierung und Lipidextraktion**

#### **5.2.3.1 Homogenisierung und Extraktion von Zellen**

##### Homogenisierung

Die eingefrorenen Zellpellets (Keratinocyten, Fibroblasten oder Neuronen) wurden aufgetaut, mit 1 ml Wasser (bidest.) versetzt und je dreimal 30 s mit 10 s Pause im Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250) sonifiziert. Aus dem Zellhomogenat wurden Aliquots für Protein- und Radioaktivitätsbestimmung entnommen.

### Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung im Zellhomogenat erfolgte nach der Bicinchoninsäure-Methode (Smith *et al.*, 1985). Dazu wurden in einer 96 well Mikroplatte aus Keratinozyten- bzw. Neuronenhomogenat 2.5 und 5 µl und aus Fibroblastenhomogenat 5 und 10 µl in Doppelbestimmung mit Wasser (bidest.) auf 20 µl aufgefüllt und mit 200 µl einer 50:1-Lösung (v/v) aus Bicinchoninsäure-Lösung und 4 % Kupfer(II)-sulfat-Lösung (w/v) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 60 °C wurden die Proben bei 595 nm in einem computergesteuerten Mikroplatten-Photometer vermessen. Anhand einer parallel erstellten Eichreihe aus BSA (0.25-5 µg BSA/20 µl) wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt.

### Radioaktivitätsbestimmung

Zur Bestimmung der in die jeweiligen Proben inkorporierte Radioaktivitätsmenge wurden dreimal 5 µl in Szintillationsvials pipettiert und mit Szintillationsflüssigkeit versetzt. Anschließend wurden die Proben in einem Flüssigszintillationszählgerät vermessen.

### Lipidextraktion

Das Zellhomogenat (Zellpellet in 1 ml Wasser, s. oben) wurde mit 2 ml Methanol versetzt und 15 min im Ultraschallbad sonifiziert. Nach Zusatz von weiteren 2 ml Methanol und 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser 10:5:1 (v/v/v) wurden die Lipide im Schüttelwasserbad über 24 h bei 37 °C extrahiert. Zur Abtrennung unlöslicher Zellfragmente wurden die Proben anschließend über mit silanisierter Glasfaserwatte gefüllte Pasteurpipetten filtriert. Im Schraubkappenglas zurückgebliebene Lipide wurden mit 1 ml Methanol herausgespült und ebenfalls filtriert. Der Lipidextrakt wurde anschließend im Stickstoffstrom eingedampft.

## **5.2.3.2 Homogenisierung und Extraktion von Gewebe**

### Homogenisierung

Die von Herrn Prof. Dr. Georg Auburger zur Verfügung gestellten humanen bzw. murinen Cortex- und Kleinhirnproben wurden bei -80 °C gelagert. Zur Bearbeitung wurden jeweils ca. 500 mg des humanen Gewebes bzw. 150-200 mg Maushirngewebe in Schraubkappengläsern eingewogen. Die Proben wurden unter Zugabe von 600 µl Wasser (bidest.), 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform im Homogenisator bei 1000 U/min schrittweise suspendiert.

### Lipidextraktion

Die Extraktion der Lipide erfolgte anschließend über 24 h im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Zur Abtrennung unlöslicher Gewebebestandteile wurden die Proben nachfolgend zunächst 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über mit silanisierter Glasfaserwatte gefüllte Pasteurpipetten filtriert. Der Rückstand wurde mit 700 µl Wasser (bidest.),

2 ml Methanol und 1 ml Chloroform versetzt, 30 sec gevortext und wiederum 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Filtration des Überstandes wurden die Filtrate vereinigt und im Stickstoffstrom eingedampft.

## **5.2.4 Lipidaufarbeitung**

### **5.2.4.1 Alkalische Hydrolyse**

Da Phospholipide im Dünnschichtchromatogramm im Bereich der Ganglioside erscheinen, wurden sie zur Erleichterung der Auswertung der Gangliosidbanden durch eine milde alkalische Hydrolyse abgebaut.

Dazu wurden die eingedampften Lipidextrakte in 1 ml Methanol aufgenommen und gevortext. Nach 5-minütiger Behandlung im Ultraschallbad wurde die Wand des Schraubkappenglases mit 1 ml Methanol abgespült. Nach Zugabe von 62.5 µl einer 4 M wässrigen Natriumhydroxyidlösung und weiteren 500 µl Methanol wurde erneut 5 min sonifiziert. Anschließend wurden die Proben 2 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Neutralisation mit 10 µl Eisessig wurden sie im Stickstoffstrom eingedampft und anschließend entsalzt.

### **5.2.4.2 Entsalzung der Lipidextrakte**

#### Entsalzung über RP-18 Säulen

Die Lipidextrakte wurden mittels *reversed phase*-Chromatographie gereinigt (Williams und McCluer, 1980). Dazu wurden Pasteurpipetten mit ein wenig silanisierter Glasfaserwatte und 1.5 ml methanolischer RP-18 Suspension (Kap. 5.1.4.2) befüllt. Zur Entfernung von unter 43 µm großen RP-18 Partikeln und zur Äquilibration wurden die Säulen anschließend nacheinander mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 1 ml Methanol
- 2 ml Wasser (bidest.)
- 1 ml Methanol
- 2 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v)
- 1 ml Methanol
- 2 ml Chloroform/Methanol/100 mM wässrige Kaliumchlorid-Lsg. 3:48:47 (v/v/v)

Die im Stickstoffstrom getrockneten und zu entsalzenden Proben wurden in 1 ml Methanol aufgenommen, 5 min ultraschallt und mit 1 ml 300 mM wässriger Ammoniumacetatlösung versetzt. Diese Lösung wurde dann sofort auf die RP-18 Säule gegeben. Im Schraubkappenglas zurückgebliebene Lipide wurden zweimal mit 2 ml einer Lösung von 200 mM Ammoniumacetat in Methanol und Wasser 1:1 (v/v) herausgespült und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Die Salze

wurden anschließend mit 6 ml Wasser (bidest.) eluiert. Nach Aufgabe von 400 µl Methanol zum Phasenabgleich wurde der Durchlauf verworfen. Die Lipide wurden dann mit weiteren 600 µl Methanol und 8 ml Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom eingedampft.

#### Entsalzung nach der Bligh-Dyer-Methode

Zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Bestandteile des RP-18-Materials wurden Lipidextrakte, die für massenspektrometrische Experimente bestimmt waren, in Anlehnung an die Bligh-Dyer-Methode entsalzt (Signorelli und Hannun, 2002). Dazu wurden die im Stickstoffstrom getrockneten und zu entsalzenden Proben mit 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform und 800 µl Wasser versetzt und 30 sec kräftig gevortext. Dabei wurde ein homogenes Gemisch erhalten. Dieses wurde für mindestens 15 min bei -20 °C gehalten, dann 30 sec gevortext und mit 1 ml Chloroform und 1 ml Wasser versetzt. Anschließend wurden die Proben erneut 30 sec gevortext und dann zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, 4 °C). Dabei bildeten sich zwei Phasen, von denen die untere, organische Phase alle Lipide bis auf einen Teil komplexer Glykolipide enthielt, während sich Salze, Proteine und teilweise komplexe Glykolipide in der oberen Phase befanden. Die untere Phase wurde abgetrennt und im Stickstoffstrom eingedampft.

#### **5.2.4.3 Trennung von anionischen und neutralen Lipiden über DEAE-Anionenaustauschchromatographie**

Die Trennung von anionischen und neutralen Lipiden erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A-25 in Acetatform (Momoi *et al.*, 1976). Die neutralen Lipide treten dabei nicht in Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial und werden sofort wieder eluiert. Die anionischen Lipide dagegen binden an die Diethylaminoethylgruppen und werden dadurch zunächst zurückgehalten. Sie werden erst nach vollständiger Eluierung der neutralen Lipide mit einem Acetat-haltigen Lösungsmittelgemisch von der Säule gespült.

Pasteurpipetten wurden mit ein wenig silanisierter Glasfaserwatte und 1 ml methanolischer DEAE-Sephadex Suspension in Acetatform (Kap. 5.1.4.2) befüllt. Die Säulen wurden mit 1 ml Methanol gewaschen und mit 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 (v/v/v) äquilibriert.

Die im Stickstoffstrom getrockneten Lipide wurden in 1 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 (v/v/v) aufgenommen, 5 min ultrabeschallt und auf die Säulen aufgetragen. Im Schraubkappenglas zurückgebliebene Lipide wurden zweimal mit 2 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches herausgespült und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen noch mit weiteren 3 ml gespült. Das bis zu diesem Punkt gesammelte Eluat enthielt die neutralen Lipide. Die anionischen Lipide wurden anschließend mit 8 ml Chloroform/Methanol/800 mM wässrige Ammoniumacetatlösung (v/v/v) eluiert. Die Eluate wurden im Stickstoffstrom eingedampft und die anionischen Lipide über RP-18 (Kap. 5.2.4.2) entsalzt.

## 5.2.5 Trennung, Identifizierung und Quantifizierung von Lipiden mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

### 5.2.5.1 Probenauftragung und Entwicklung der DC-Platten

Die im Stickstoffstrom getrockneten Lipide wurden in Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und 5 min ultrabeschallt. Bei radioaktiven Proben wurden dreimal 5  $\mu$ l für eine Radioaktivitätsbestimmung verwendet. Volumina, die gleichen Mengen an Protein, Radioaktivität oder Feuchtgewicht entsprachen, wurden entnommen und mit einem DC-Probenauftragegerät (Linomat IV, Camag) auf 20×20 cm große Dünnschichtchromatographie-(DC-) Kieselgelplatten oder 20×10 cm bzw. 10×10 cm große *high-performance thin-layer chromatography*- (HPTLC-) Platten aufgetragen. Die Auftragung von radioaktiven Proben erfolgte von Hand mit feinen Glaskapillaren. Anschließend wurden die DC-Platten mindestens 30 min im evakuierten Exsikkator über Kaliumhydroxid getrocknet.

Die 20×20 cm großen DC-Platten wurden in konventionellen, mit Filterpapier ausgekleideten Glaskammern entwickelt. Diese wurden zur Sättigung der Kammeratmosphäre mindestens 1 h vor Beginn der Chromatographie mit dem gewünschten Laufmittel befüllt. HPTLC-Platten wurden in einer Horizontalkammer entwickelt. Dazu wurde die Kammer mit dem gewünschten Laufmittel befüllt und die HPTLC-Platte mit der beschichteten Seite nach unten hinein gelegt. Nach 15-minütiger Äquilibration wurde die Chromatographie gestartet.

Die verwendeten Laufmittel können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Zu trennende Lipide	Laufmittel (v/v/v)	Anmerkungen
Ceramide	Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1	zweimal entwickeln
Glucosylceramide	Chloroform/Methanol/Wasser 70:30:5	
Dihydroceramid/Ceramid(NS)	Chloroform/Methanol 9:1	Borat-Platte
Ceramid(NS)/Ceramid(NP)	Chloroform/Methanol 9:1	Arsenit-Platte
Sphingolipide	Chloroform/Methanol/ 0.22 % CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O 60:35:8	
Ganglioside	Chloroform/Methanol/ 0.22 % CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O 55:45:10	
Glucosylceramid/Galaktosylceramid	Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4	Borat-Platte
Cholesterol/Cholesterolester/ Fettsäuren	Chloroform/Methanol/Eisessig 190:9:1	
Phospholipide	Chloroform/Methanol/Wasser 60:25:4	

Ist die Laufmittelfront am oberen DC-Rand angekommen, wird die Platte aus der Chromatographiekammer genommen und erneut mindestens 30 min im evakuierten Exsikkator über Kaliumhydroxid getrocknet.

#### Herstellung modifizierter DC-Platten (Arsenitimpregnierung, Boratimpregnierung)

Zur Herstellung von mit Arsenit bzw. mit Borat imprägnierten DC-Platten wurden handelsübliche DC-Aluminiumfolien bzw.-Glasplatten (Kieselgel Si-60) 15 min bei RT in eine Lösung von 1 % Natrium-*meta*-arsenit (NaAsO<sub>2</sub>) in Methanol/Wasser (bidest.) 85:15 (v/v) bzw. in eine Lösung von 1 % Natriumborat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> × 10 H<sub>2</sub>O) in Methanol gelegt (Karlsson und Pascher, 1971). Anschließend wurden die Platten mehrere Stunden bei RT an der Luft getrocknet.

### 5.2.5.2 Visualisierung und Quantifizierung der Lipidbanden

#### Visualisierung und Quantifizierung radioaktiver Lipidbanden

Auf die getrocknete DC-Platte wurde für die gewünschte Zeit eine passende Imaging Plate gelegt. Anschließend wurde die Imaging Plate mit einem Bio Imaging Analyzer eingelesen. Die auf diese Weise visualisierten Lipidbanden wurden mit einer speziellen Software (TINA 2.0) anhand ihres Schwärzungsgrades quantifiziert.

#### Visualisierung und Quantifizierung nicht-radioaktiver Lipidbanden

- Phosphorsäure-Kupfersulfat-Reagenz:

Zur Visualisierung nicht-radioaktiver Lipidbanden wurde die getrocknete DC-Platte in eine Lösung aus 9.4 ml konz. Phosphorsäure (85 %, w/v) und 15.6 g Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat in 100 ml Wasser (bidest.) getaucht und anschließend auf einem DC-Plattenheizer 10 min auf 180 °C erhitzt (Yao und Rastetter, 1985). Alle Lipide erschienen als braun-schwarze Banden. Die Identifikation der Lipidbanden erfolgte über authentische Standardsubstanzen, die parallel auf dieselbe DC-Platte aufgetragen worden waren. Die angefärbten DC-Platte wurden mittels eines Scanners eingelesen.

Die Quantifizierung der Lipidbanden erfolgte über Analyse ihres Schwärzungsgrades im Densitometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Mit Hilfe von Eichsubstanzen, die in bekannten Mengen von 1 bis 15 µg Lipid auf dieselbe DC-Platte aufgetragen worden waren, wurde eine polynomische Eichkurve erstellt, anhand derer die unbekanntes Lipidbanden quantifiziert wurden.

Die jeweils verwendeten Eichsubstanzen können der folgenden Tabelle entnommen werden:

Zu quantifizierende Lipide	Eichsubstanz
Cholesterol	Cholesterol
Cholesterolester	Ölsäure-cholesterolester
Ceramide	Ceramid(NP) (Weerheim und Ponec, 2001)
Freie Fettsäuren	Stearinsäure
Glykosphingolipide	Laktosylceramid (aus Rinderhirn)
Sphingomyelin	Sphingomyelin (aus Rinderhirn)
Phosphoglyceride	Dimyristoyl-phosphatidylcholin

### 5.2.6 RNA Quantifizierung mittels *Real-time PCR*

Zum Arbeiten mit RNA wurden die Reaktionsgefäße vor Gebrauch autoklaviert. Es wurde ausschließlich RNase-freies Wasser verwendet. Zu dessen Herstellung wurde bidestilliertes Wasser mit 0.5 % Diethylpyrocarboant (DEPC) (v/v) versetzt und über Nacht gerührt. Überschüssiges DEPC wurde anschließend durch Autoklavieren entfernt, wobei es in Ethanol und Kohlendioxid zerfiel. Versuchsansätzen wurde der RNase Inhibitor RNasin, ein Protein aus humaner Plazenta, das nichtkovalente äquimolare Komplexe mit RNasen bildet, zugesetzt.

#### 5.2.6.1 Zellkultur

Humane Keratinozyten wurden in 21 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen wie in Kap. 5.2.1.1 beschrieben in *Komplettmedium* (*low Ca<sup>2+</sup>*-Medium) bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit 50 µM Cp-DHC in *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium vorinkubiert. Zur Induktion der Differenzierung wurde das *low Ca<sup>2+</sup>*-Medium dann gegen das *Differenzierungsmedium* (*high Ca<sup>2+</sup>/LA*-Medium) ausgetauscht (*Ca<sup>2+</sup>/LA-Shift*). In diesem Medium wurden die Zellen dann in Gegenwart von 50 µM Cp-DHC weiter inkubiert.

Um Aussagen darüber treffen zu können, welchen Einfluss Cp-DHC auf den Übergang von Proliferation zu Differenzierung bei humanen Keratinozyten hat, fand die Zellernte zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt: 24 Stunden vor Beginn des *Ca<sup>2+</sup>/LA-Shifts*, unmittelbar vor

Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts und 6 bzw. 24 Stunden nach Beginn des  $Ca^{2+}/LA$ -Shifts. Diese Zeitpunkte entsprachen einer Inkubation mit Cp-DHC über 0, 24, 30 und 48 Stunden.

### 5.2.6.2 Zellernte und Extraktion von RNA aus kultivierten Keratinozyten

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml kaltem PBS gewaschen. Zur Extraktion der Gesamt-RNA wurde das *Purescript RNA Isolation Kit* (Gentra Systems) verwendet. Dazu wurden zunächst 300  $\mu$ l *Cell Lysis Solution* in die Zellschale gegeben und die Zellen anschließend abgeschabt. Durch dreimaliges Aufziehen der Zellsuspension in eine Pipette wurden die Zellen lysiert, dann in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 100  $\mu$ l *Protein-DNA Precipitation Solution* versetzt. Nach 10-maligem vorsichtigem Schwenken wurden die Proben 5 min auf Eis gesetzt. Nach Zentrifugation (14000  $\times$  g, 3 min, 4 °C) befanden sich DNA und Proteine im Pellet, während die RNA im Überstand enthalten war. Dieser wurde abgenommen und in 1.5 ml Reaktionsgefäße auf 300  $\mu$ l 100 % Isopropanol gegeben. Die Proben wurden nun erneut vorsichtig geschwenkt (50 mal) und anschließend zentrifugiert (14000  $\times$  g, 3 min, 4 °C). Dabei fiel die Gesamt-RNA als durchsichtiges Pellet aus. Der Überstand wurde vorsichtig auf ein sauberes saugfähiges Tuch getropft. Die im Gefäß zurückgebliebene isolierte RNA wurde an der Luft getrocknet und anschließend durch Zugabe von 50  $\mu$ l *RNA Hydration Solution* in Lösung gebracht. Die Proben wurden 30 min auf Eis gehalten und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden sie aufgetaut, 10 sec heftig gevortext und anschließend kontinuierlich auf Eis gehalten.

### 5.2.6.3 Bestimmung der Reinheit und Menge der isolierten Gesamt-RNA

2  $\mu$ l der RNA-Proben wurden mit 98  $\mu$ l Wasser versetzt und im Spektrophotometer vermessen. Die Messung der Absorption erfolgte bei den Wellenlängen 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Eine Lösung, die 40  $\mu$ g/ml RNA enthält, besitzt bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm den Absorptionswert 1. Als Maß für die Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurde der Quotient  $\text{Absorption}_{260 \text{ nm}}/\text{Absorption}_{280 \text{ nm}}$  gewählt. Reine RNA-Lösungen besitzen einen Wert größer als 1.8.

Alle RNA-Proben wurden anschließend mit Wasser so verdünnt, dass die Konzentration der Gesamt-RNA schließlich 25 ng/ $\mu$ l betrug.

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde außerdem mittels eines 1.2 % Agarosegels (TAE-Puffer, 0.5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid) überprüft. Pro Geltasche wurden dazu 5  $\mu$ l der isolierten RNA-Proben (125 ng Gesamt-RNA) aufgetragen.

#### 5.2.6.4 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Durch die RT-PCR wird die mRNA eines bestimmten Zielgens in cDNA umgeschrieben. Dazu ist nur der Antisense Primer für die jeweilige Zielgen-mRNA erforderlich. Der Antisense Primer lagert sich an das 3'-Ende der mRNA an. Die Extension erfolgt in 5'→3'-Richtung durch die rMoMuLV Reverse Transkriptase (*recombinant Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase).

In einem RT-PCR-Ansatz wurden 3 µl der jeweiligen RNA-Probe (75 ng Gesamt-RNA) eingesetzt. Zur Erstellung einer Relativen Standardkurve wurde eine der RNA-Proben ausgewählt und 1 µl, 2 µl, 4 µl und 5 µl (25 ng, 50 ng, 100 ng und 125 ng Gesamt-RNA) entnommen. Alle Ansätze wurden mit Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden zwei Negativkontrollen vermessen: Der „No Reaction Control“ wurde sowohl bei der RT-PCR als auch bei der anschließenden *real-time* quantitativen PCR Wasser statt der jeweiligen Enzyme zugesetzt. Bei der „No Template Control“ wurde die RNA-Probe durch Wasser ersetzt.

Die Komponenten des Ansatzes wurden gemäß folgender Tabelle als (n+1)-fache „Mastermixe“ angesetzt. n entspricht dabei der Anzahl der zu untersuchenden Proben inklusive der Standardverdünnungen und Negativkontrollen. Der zusätzliche Ansatz diente zum Ausgleich von Ungenauigkeiten des Pipettierens. Die Magnesiumchlorid-Konzentration und die Konzentration des Antisense Primers sind von der zu untersuchenden Zielgen-mRNA abhängig. Diesbezüglich wurden die Bedingungen gewählt, die von H. Gallala in der Arbeitsgruppe optimiert worden waren (Gallala *et al.*, 2004).

Je 15 µl des Mastermixes wurden anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug nun 20 µl. Anschließend wurden die Ansätze gevortext und kurz zentrifugiert.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
RTase-Puffer [5×]	4	1×
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	5.1	6.4 mM
dNTP Master Mix [je 500 µM]	4	100 µM
Antisense Primer [5 µM]	1	250 nM
RNasin [20 U/µl]	0.4	0.4 U/µl
rMoMuLV-RTase [50 U/µl]	0.5	1.25 U/µl
Gesamt-RNA [x ng/µl]	5	x ng/5 µl (s. Text)
Gesamtvolumen	20	

Die Reverse Transkription wurde im PCR-Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

- a. 48 °C, 30 min
- b. 95 °C, 10 min (Inaktivierung der Reversen Transkriptase)

Anschließend wurden die Proben auf Eis gesetzt.

### 5.2.6.5 *Real-time quantitative PCR*

Mit den durch die RT-PCR erhaltenen Proben wurde anschließend eine *real-time* quantitative PCR durchgeführt.

Die *real-time* PCR erfolgte als Dreifachbestimmung. Dazu wurden zu dem RT-PCR-Ansatz (20 µl) 75 µl eines entsprechenden „Mastermixes“ hinzugegeben, so dass drei PCR-Reaktionen á 30 µl durchgeführt werden konnten. Der Ansatz überschreitet das dazu nötige Volumen von 90 µl um 5 µl, um Ungenauigkeiten des Pipettierens ausgleichen zu können.

Die Magnesiumchlorid-Konzentration und die Konzentrationen der Primer sind von der zu untersuchenden Zielgen-mRNA abhängig. Diesbezüglich wurden die Bedingungen gewählt, die von H. Gallala in der Arbeitsgruppe optimiert worden waren (Gallala *et al.*, 2004). Die Konzentration der Primer-Stammlösungen betrug 5 µM. Die in 95 µl *real-time* PCR-Ansatz enthaltenen Primermengen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Zielgen-mRNA	Primer-Volumen		Primer-Endkonzentration	
	Sense [µl/95 µl]	Antisense [µl/95 µl]	Sense [nM]	Antisense [nM]
GlcCer-β-Glucosidase	16.2	16.2	853	853
Glucosylceramid-Synthase	16.2	16.2	853	853
Keratin 10	16.2	16.2	853	853
Keratin 14	16.2	5.7	853	300
Porphobilinogen-Deaminase	16.2	5.7	853	300
Profilaggrin	16.2	16.2	853	853
Saure Ceramidase	16.2	5.7	853	300
Saure Sphingomyelinase	5.7	16.2	300	853
Serin-Palmitoyltransferase (Untereinheit LC2)	5.7	16.2	300	853

Die Zusammensetzung des Ansatzes für die *real-time* quantitative PCR kann der folgenden Tabelle entnommen werden:

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
TaqMan Puffer A [10×]	9.5	1×
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	19.5	5.1 mM
dNTP Master Mix [je 500 µM]	1	Je 5.3 µM
Sense Primer [5 µM]	x	x nM (s. obige Tab.)
Antisense Primer [5 µM]	x	x nM (s. obige Tab.)
Sonde [5 nM]	0.6	32 pM
AmpliTaq Gold [5 U/µl]	0.25	0.013 U/µl
Wasser	Restvolumen	
RT-PCR-Ansatz	20	
Gesamtvolumen	95	

Es wurden  $(n + 1)$ -fache Mastermixe angesetzt, wobei  $n$  der Anzahl der RT-PCR-Ansätze entsprach. Zu den 20  $\mu\text{l}$  des RT-PCR-Ansatzes wurden 75  $\mu\text{l}$  des Mastermixes gegeben. Die Ansätze wurden gevortext und dann á 30  $\mu\text{l}$  auf eine 96 well PCR-Platte verteilt. Nach Aufkleben einer Abdeckfolie wurde die PCR-Platte in den Heizblock des *Real-time* PCR System eingesetzt und der Lauf gestartet. Alle Läufe wurden mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

- 1) 50 °C, 2 min
- 2) 95 °C, 10 min
- 3) 95 °C, 15 s
- 4) 60 °C, 1 min
- 5) 39-malige Wiederholung der Schritte 3) und 4)

Anschließend wurden die bei der *real-time* quantitativen PCR gewonnenen Daten ausgewertet.

#### 5.2.6.6 Auswertung der *Real-time* quantitativen PCR

Die bei der *real-time* quantitativen PCR gewonnenen Daten wurden mittels einer Relativen Standardkurve ausgewertet. Die Methode ist im „User Bulletin number 2“ (ABI PRISM 7700 Sequence Detector System, Oktober 2001, Applied Biosystems) beschrieben und sei im Folgenden kurz erläutert.

Bei der Relativen Quantifizierung wird die mRNA-Menge eines Zielgens im Vergleich zu der in einer Basisprobe (= Kalibrator) gemessen. Bei der hier beschriebenen Messung wurden die Keratinozyten, die 24 Stunden vor Beginn des *Ca<sup>2+</sup>/LA-Shifts* geerntet worden waren (0 Stunden Inkubation mit Cp-DHC), als Kalibrator gewählt. So wurden für die mRNA-Mengen aller anderen Proben „n-fache“ Werte des Kalibrator-Wertes erhalten.

Vor Beginn der RT-PCR waren alle Proben durch Verdünnung mit Wasser auf die gleiche Gesamt-RNA-Konzentration (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) gebracht worden (Kap. 5.2.6.3). Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine beliebige RNA-Probe, in der die zu untersuchenden Zielgen-mRNA in ausreichender Menge vorliegen sollte, als Standard ausgewählt. Mit diesem Standard wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (25, 50, 100, 125 ng Gesamt-RNA in 5  $\mu\text{l}$ ) und diese zusammen mit den Negativkontrollen und den anderen RNA-Proben, von denen jeweils 75 ng Gesamt-RNA in 5  $\mu\text{l}$  vermessen wurden, in einem Experiment quantifiziert. Bei Anwendung der Standardkurven-Methode sind auch Ergebnisse aus unterschiedlichen Experimenten miteinander vergleichbar, vorausgesetzt, dass die Reaktionen mit gleicher Effizienz ablaufen.

Bei der *real-time* PCR erhält man für jede einzelne Reaktion einen sogenannten *Threshold Cycle* (Schwellenwert-Zyklus,  $C_t$ -Wert). Dies ist der Zeitpunkt der *real-time* PCR, an dem die Fluoreszenzemission das 10-fache der Standardabweichung der Fluoreszenz der ersten PCR-Zyklen (Hintergrundsignal) zum ersten Mal überschreitet und damit den Beginn der Amplifikationskurve darstellt. Der  $C_t$ -Wert ist umgekehrt proportional zur Anzahl der Startkopien in der Probe.

Zur Erstellung der Standardkurve werden die  $C_t$ -Werte für die verschiedenen Verdünnungstufen des RNA-Standards gegen den Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge (log ng) aufgetragen. Durch eine lineare Regression lässt sich eine Geradengleichung erstellen, die die Ermittlung der log ng-Werte der untersuchten RNA-Proben anhand ihrer  $C_t$ -Werte erlaubt. Zu beachten ist dabei, dass

die Einheit der auf diese Weise berechneten RNA-Mengen in den untersuchten Proben ebenfalls [ng Gesamt-RNA] ist. Wenn sich für Probe A also ein Wert von z.B. 0.23 ng Gesamt-RNA ergibt, bedeutet das, dass in Probe A so viel der untersuchten Zielgen-mRNA enthalten ist wie in 0.23 ng Gesamt-RNA des Standards.

Die Standardkurven-Methode basiert außerdem auf der Amplifikation einer endogenen Kontroll-mRNA (Haushaltsgen), die in jedem Experiment parallel zur Zielgen-mRNA vermessen wird. Ideale Haushaltsgene werden ubiquitär und konstant exprimiert. Die Menge der Zielgen-mRNA wird auf die Menge des Haushaltsgens normiert, wodurch gewährleistet wird, dass gleiche Mengen an Probenmaterial verglichen werden. Dazu werden die aus der Standardkurve ermittelten RNA-Mengen durch die Mengen der endogenen Kontrolle dividiert. Durch diese Normierung erhält man für die Proben keine Angaben in [ng mRNA], sondern dimensionslose Werte. Als endogene Kontrolle wurde bei allen Messungen die mRNA von Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) parallel zur Zielgen-mRNA quantifiziert. Die Eignung von PBGD als Haushaltsgen humaner Keratinozyten sowohl in *low Ca<sup>2+</sup>*- als auch in *high Ca<sup>2+</sup>*/LA-Medium war von H. Gallala nachgewiesen worden (Gallala *et al.*, 2004).

## **5.2.7 Massenspektrometrie**

### **5.2.7.1 Glaskapillaren/Spitzen**

Kommerziell erhältliche Glaskapillaren wurden in 10 cm lange Stücke geschnitten und nacheinander gründlich mit Wasser, Wasser/Isopropanol 1:1 (v/v), Methanol, Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) und Methanol gespült. Anschließend wurde eine Kapillare im Spitzenzieher befestigt und das 2-Stufen-Verfahren ausgewählt. Die erste Stufe wurde auf 57 eingestellt, die zweite Stufe auf 61. Dann wurde das Programm unter Verwendung aller vier Gewichte gestartet. Aus den 10 cm langen Kapillarstücken wurden jeweils zwei ESI-Spitzen gezogen. Diese wurden anschließend in der Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage mit vollautomatischer Prozesssteuerung mit Gold bedampft. Der Abstand zwischen der Goldfolie und der Glaskapillare wurde dabei auf 4 cm eingestellt. Zunächst wurde der Druck in der Anlage bis auf  $10^{-5}$  mbar reduziert. Anschließend wurde so viel Argon eingeleitet, dass der Druck wieder auf  $5 \times 10^{-2}$  mbar anstieg. Dann wurden die Glasspitzen für 90 sec bei 70 mA bedampft.

### **5.2.7.2 Electrospray Ionization – Time of Flight – Massenspektrometrie (ESI-ToF-MS)**

Die Messungen wurden im positiven oder negativen Ionenmodus durchgeführt. Die zu vermessende Probe wurde im Stickstoffstrom eingedampft, in Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurde die Probenlösung zur Unterdrückung von Natriumaddukten mit einer 1 M Ammoniumacetatlösung versetzt (Endkonzentration: 50 mM Ammoniumacetat), gevortext und zentrifugiert.

---

Ca. 5  $\mu\text{l}$  der Probenlösung wurden in eine Glaskapillare (Kap. 5.2.7.1) gefüllt und bei einer Quelltemperatur von 80 °C und einer Kapillarspannung von 900-1000 V vermessen. Die Konusspannung lag bei 50 V.

Als Eichlösung diente eine Lösung von 2 mg/ml Natriumiodid und 0.05 mg/ml Cäsiumiodid in 1-Propanol/Wasser 1:1 (v/v).

MS/MS-Spektren wurden mit Argon als Kollisionsgas bei einem Argon-Partialdruck von 0.7 bar gemessen. Die Kollisionsenergie lag zwischen 30 und 40 eV.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Abkürzungen

Zur Benennung der epidermalen Ceramide wurde folgende Nomenklatur verwendet (Wertz *et al.*, 1985; Motta *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1994; Stewart und Downing, 1999; Ponc *et al.*, 2003):

#### Freie Ceramide

<b>Cer(EOS)</b>	(Cer1)	Sphingosin als Sphingoid-Base (S), $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure (O), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure ist mit Linolsäure verestert (E)
<b>Cer(NS)</b>	(Cer2)	Sphingosin als Sphingoid-Base (S), nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)
<b>Cer(EOP)</b>	(Cer9)	Phytosphingosin als Sphingoid-Base (P), $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure (O), $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure ist mit Linolsäure verestert (E)
<b>Cer(NP)</b>	(Cer3)	Phytosphingosin als Sphingoid-Base (P), nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)
<b>Cer(EOH)</b>	(Cer4)	6-Hydroxy-Sphingosin als Sphingoid-Base (H), $\omega$ -hydroxylierte Fettsäure (O), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure ist mit Linolsäure verestert (E)
<b>Cer(AS)</b>	(Cer5)	Sphingosin als Sphingoid-Base (S), $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure (A)
<b>Cer(NH)</b>	(Cer8)	6-Hydroxy-Sphingosin als Sphingoid-Base (H), nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)
<b>Cer(AP)</b>	(Cer6)	Phytosphingosin als Sphingoid-Base (P), $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure (A)
<b>Cer(AH)</b>	(Cer7)	6-Hydroxy-Sphingosin als Sphingoid-Base (H), $\alpha$ -hydroxylierte Fettsäure (A)

#### Protein-gebundene Ceramide

<b>Cer(OS)</b>	Sphingosin als Sphingoid-Base (S), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure (O)
<b>Cer(OP)</b>	Phytosphingosin als Sphingoid-Base (P), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure (O)
<b>Cer(OH)</b>	6-Hydroxy-Sphingosin als Sphingoid-Base (H), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure (O)
<b>Cer(OD)<sup>[4]</sup></b>	Dihydrosphingosin als Sphingoid-Base (D), $\omega$ -Hydroxy-Fettsäure (O)

abs.	absolut (wasserfrei)
amu	atomare Masseneinheit ( <i>atomic mass unit</i> )
Ara C	Cytosinarabinosid
BCA	Bicinchoninsäure
bidest.	bidestilliert
BPE	Rinderhypophysenextrakt ( <i>bovine pituitary extract</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CE	<i>cornified envelope</i>
Cer	Ceramid
Ci	Curie (Einheit der Radioaktivität, 1 Ci = $3.7 \cdot 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde)
CoA	Coenzym A

<sup>[4]</sup> Chopart, M., Castiel, I., Arbey, E., Schmidt, R., (Life Sciences, L. O. A. R. L., Aulnay-sous-Bois, France) (2001). A new type of covalently bound ceramide in human epithelial. *Poster No. 45 in Abstracts of: "Stratum Corneum III"*. Basel, CH.

---

cpm	gemessene Zahl der radioaktiven Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DEAE	Diethylaminoethyl-
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHC	Dihydroceramid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FS	Fettsäure
FB1	Fumonisin B1
FFS	freie Fettsäure
FKS	Fötales Kälberserum
GalCer	Galaktosylceramid
GlcCer	Glucosylceramid
GlcCerase	Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase
GSL	Glykosphingolipide
HAc	Eisessig
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie ( <i>high-performance thin-layer chromatography</i> )
<i>ko</i>	<i>knock out</i>
konz.	konzentriert
LA	Linolsäure ( <i>linoleic acid</i> )
LacCer	Laktosylceramid
LBE	<i>lipid bound envelope</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat) (reduzierte Form)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PS	Pferdeserum
rMoMuLV	<i>recombinant Moloney Murine Leukemia Virus</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkription
SAP	Sphingolipid Aktivator Protein
SCA2	Spinocerebelläre Ataxie Typ 2
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
SM	Sphingomyelin
S1P	Sphingosin-1-phosphat

---

SPT	Serin-Palmitoyltransferase
Sulfatid	3-Sulfo-Galaktosylceramid
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ToF	<i>Time of Flight</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## 6.2 Literatur

- Abele, M., Burk, K., Andres, F., Topka, H., Laccone, F., Bosch, S., Brice, A., Cancel, G., Dichgans, J., Klockgether, T. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. Nerve conduction and evoked potential studies in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain* **120**: 2141-8.
- Alessandrini, F., Pfister, S., Kremmer, E., Gerber, J. K., Ring, J., Behrendt, H. (2004). Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* **123**: 1030-6.
- Bai, J., Pagano, R. E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* **36**: 8840-8.
- Beckmann, C., Rattke, J., Oldham, N. J., Sperling, P., Heinz, E., Boland, W. (2002). Characterization of a delta 8-Sphingolipid Desaturase from Higher Plants: A Stereochemical and Mechanistic Study on the Origin of *E,Z* Isomers. *Angew Chem Int Ed* **41**: 2298-300.
- Beckmann, C., Rattke, J., Sperling, P., Heinz, E., Boland, W. (2003). Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide delta 4-desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Org Biomol Chem* **1**: 2448-54.
- Bedia, C., Triola, G., Casas, J., Llebaria, A., Fabrias, G. (2005). Analogs of the dihydroceramide desaturase inhibitor GT11 modified at the amide function: synthesis and biological activities. *Org Biomol Chem* **3**: 3707-12.
- Behne, M., Uchida, Y., Seki, T., de Montellano, P. O., Elias, P. M., Holleran, W. M. (2000). Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* **114**: 185-92.
- Bielawska, A., Crane, H. M., Liotta, D., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (1993). Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-dihydroceramide. *J Biol Chem* **268**: 26226-32.
- Binczek, E., Jenke, B., Holz, B., Gunter, R. H., Thevis, M., Stoffel, W. (2007). Obesity resistance of the stearyl-CoA desaturase-deficient (*scd1*<sup>-/-</sup>) mouse results from disruption of the epidermal lipid barrier and adaptive thermoregulation. *Biol Chem* **388**: 405-18.
- 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**: 13280-5.
- Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* **42**: 1-36.
- Braun, P. E., Snell, E. E. (1968). Biosynthesis of sphingolipid bases. II. Keto intermediates in synthesis of sphingosine and dihydrosphingosine by cell-free extracts of *Hansenula ciferri*. *J Biol Chem* **243**: 3775-83.
- Breiden, B., Gallala, H., Doering, T., Sandhoff, K. (2007). Optimization of submerged keratinocyte cultures for the synthesis of barrier ceramides. *Eur J Cell Biol*: in press.
- Brenner-Weiß, G. (1992). Synthese potentieller Inhibitoren der Glykosphingolipidbiosynthese. *Dissertation Universität Bonn*.
- Brodesser, S. (2002). Synthese potentieller Suizidinhibitoren der Dihydroceramid-Desaturase. *Diplomarbeit Universität Bonn*.
- Brodesser, S., Mikeska, T., Nieger, M., Kolter, T. (2003). 1,1-Dimethylethyl *N*-propanoylcarbamate. *Acta Cryst* **E59**: o1359-o1361.

Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V. (1998). Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol* **110**: 1-7.

Buist, P. H., Behrouzian, B. (1996). Use of Deuterium Kinetic Isotope Effects To Probe the Cryptoregiochemistry of 9 Desaturation. *J Am Chem Soc* **118**: 6295-6.

Buist, P. H., Behrouzian, B., Alexopoulos, K. A., Dawson, B., Black, B. (1996). Fluorinated fatty acids: new mechanistic probes for desaturases. *Chem Commun*: 2671-2.

Burk, K., Fetter, M., Abele, M., Laccone, F., Brice, A., Dichgans, J., Klockgether, T. (1999). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: oculomotor abnormalities in families with SCA1, SCA2, and SCA3. *J Neurol* **246**: 789-97.

Chalfant, C. E., Spiegel, S. (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* **118**: 4605-12.

Cho, Y., Lew, B. L., Seong, K., Kim, N. I. (2004). An inverse relationship between ceramide synthesis and clinical severity in patients with psoriasis. *J Korean Med Sci* **19**: 859-63.

Clifford, J. J., Drago, J., Natoli, A. L., Wong, J. Y., Kinsella, A., Waddington, J. L., Vaddadi, K. S. (2002). Essential fatty acids given from conception prevent topographies of motor deficit in a transgenic model of Huntington's disease. *Neuroscience* **109**: 81-8.

Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Popko, B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* **86**: 209-19.

Coetzee, T., Suzuki, K., Popko, B. (1998). New perspectives on the function of myelin galactolipids. *Trends Neurosci* **21**: 126-30.

Coste, H., Martel, M. B., Got, R. (1986). Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochim Biophys Acta* **858**: 6-12.

Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* **276**: 23954-61.

De Jonghe, S., Van Overmeire, I., Van Calenbergh, S., Hendrix, C., Busson, R., De Keukeleire, D., Herdewijn, P. (2000). Synthesis of Fluorinated Sphinganine and Dihydroceramide Analogues. *Eur J Org Chem*: 3177-83.

Djousse, L., Knowlton, B., Cupples, L. A., Marder, K., Shoulson, I., Myers, R. H. (2002). Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* **59**: 1325-30.

Doering, T., Holleran, W. M., Potratz, A., Vielhaber, G., Elias, P. M., Suzuki, K., Sandhoff, K. (1999a). Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem* **274**: 11038-45.

Doering, T., Proia, R. L., Sandhoff, K. (1999b). Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebroside deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* **447**: 167-70.

Döring, T. (1999). Die Barriere der Haut - Der epidermale Stoffwechsel von Ceramid und Glucosylceramid. *Dissertation Universität Bonn*.

Dorman, R. V., Dreyfus, H., Freysz, L., Horrocks, L. A. (1976). Ether lipid content of phosphoglycerides from the retina and brain of chicken and calf. *Biochim Biophys Acta* **486**: 55-9.

Downing, D. T. (1992). Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* **33**: 301-13.

---

- Elias, P. M., Cullander, C., Mauro, T., Rassner, U., Komuves, L., Brown, B. E., Menon, G. K. (1998). The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J Invest Dermatol Symp Proc* **3**: 87-100.
- Endo, K., Akiyama, T., Kobayashi, S., Okada, M. (1996). Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol Gen Genet* **253**: 157-65.
- Endo, K., Matsuda, Y., Kobayashi, S. (1997). Mdes, a mouse homolog of the *Drosophila* degenerative spermatocyte gene is expressed during mouse spermatogenesis. *Dev Growth Differ* **39**: 399-403.
- Enomoto, A., Omae, F., Miyazaki, M., Kozutsumi, Y., Yubisui, T., Suzuki, A. (2006). Dihydroceramide: sphinganine C-4-hydroxylation requires Des2 hydroxylase and the membrane form of cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochem J* **397**: 289-95.
- Fandel, M. M. (2006). Wege zur Synthese eines nichtmetabolisierbaren Inhibitors der Dihydroceramid-Desaturase. *Diplomarbeit Technische Universität Kaiserslautern*.
- Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R. H., Wohlrab, J. (2005). Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch. Dermatol. Res.* **296**: 514-21.
- Förster, M. (1949). Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie. *Z Naturforsch* **4a**: 321-7.
- Fox, T. E., Han, X., Kelly, S., Merrill, A. H., 2nd, Martin, R. E., Anderson, R. E., Gardner, T. W., Kester, M. (2006). Diabetes alters sphingolipid metabolism in the retina: a potential mechanism of cell death in diabetic retinopathy. *Diabetes* **55**: 3573-80.
- Freinkel, R. K., Traczyk, T. N. (1985). Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol* **85**: 295-8.
- Fürst, W., Sandhoff, K. (1992). Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta* **1126**: 1-16.
- Furukawa, J., N. Kawabata, N., Nishimura, J. (1968). Synthesis of Cyclopropanes by the Reaction of Olefins with Dialkylzinc and Methylene Iodide. *Tetrahedron* **24**: 53-8.
- Gallala, H., Macheleidt, O., Doering, T., Schreiner, V., Sandhoff, K. (2004). Nitric oxide regulates synthesis of gene products involved in keratinocyte differentiation and ceramide metabolism. *Eur J Cell Biol* **83**: 667-79.
- Garg, A. (2004). Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med* **350**: 1220-34.
- Geeraert, L., Mannaerts, G. P., van Veldhoven, P. P. (1997). Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J* **327 (Pt 1)**: 125-32.
- Gillard, B. K., Clement, R. G., Marcus, D. M. (1998). Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**: 885-90.
- Gomez-Munoz, A., Frago, L. M., Alvarez, L., Varela-Nieto, I. (1997). Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem J* **325 (Pt 2)**: 435-40.
- Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**: 20589-96.
- Grilley, M. M., Stock, S. D., Dickson, R. C., Lester, R. L., Takemoto, J. Y. (1998). Syringomycin action gene SYR2 is essential for sphingolipid 4-hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 11062-8.
-

Gu, M., Kerwin, J. L., Watts, J. D., Aebersold, R. (1997). Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* **244**: 347-56.

Haak, D., Gable, K., Beeler, T., Dunn, T. (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* **272**: 29704-10.

Hakomori, S. (1981). Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* **50**: 733-64.

Hall, P. A., Watt, F. M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**: 619-33.

Hamanaka, S., Hara, M., Nishio, H., Otsuka, F., Suzuki, A., Uchida, Y. (2002). Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J. Invest. Dermatol.* **119**: 416-23.

Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**: 25847-50.

Hidari, K. I., Kawashima, I., Tai, T., Inagaki, F., Nagai, Y., Sanai, Y. (1994). In vitro synthesis of disialoganglioside (GD1 alpha) from asialo-GM1 using sialyltransferases in rat liver Golgi vesicles. *Eur J Biochem* **221**: 603-9.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7276-80.

Holleran, W. M., Takagi, Y., Menon, G. K., Legler, G., Feingold, K. R., Elias, P. M. (1993). Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest* **91**: 1656-64.

Holleran, W. M., Takagi, Y., Uchida, Y. (2006). Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **580**: 5456-5466.

Holleran, W. M., Williams, M. L., Gao, W. N., Elias, P. M. (1990). Serine-palmitoyl transferase activity in cultured human keratinocytes. *J Lipid Res* **31**: 1655-61.

Holopainen, J. M., Subramanian, M., Kinnunen, P. K. (1998). Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* **37**: 17562-70.

Horrocks, L. A., Sharma, M. (1982). In: *Phospholipids*: Vol. 4, pp. 51-93 (Hawthorne, J. N. and Ansell, G. B., eds.) New Comprehensive Biochemistry, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Houben, E., Holleran, W. M., Yaginuma, T., Mao, C., Obeid, L. M., Rogiers, V., Takagi, Y., Elias, P. M., Uchida, Y. (2006). Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis. *J Lipid Res* **47**: 1063-70.

Hueber, A. O., Bernard, A. M., Herincs, Z., Couzinet, A., He, H. T. (2002). An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep* **3**: 190-6.

Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J., Sandhoff, K. (2000). Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1485**: 63-99.

Huynh, D. P., Del Bigio, M. R., Ho, D. H., Pulst, S. M. (1999). Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2. *Ann Neurol* **45**: 232-41.

Huynh, D. P., Figueroa, K., Hoang, N., Pulst, S. M. (2000). Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet* **26**: 44-50.

---

- Huynh, D. P., Yang, H. T., Vakharia, H., Nguyen, D., Pulst, S. M. (2003). Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. *Hum Mol Genet* **12**: 1485-96.
- Imbert, G., Saudou, F., Yvert, G., Devys, D., Trottier, Y., Garnier, J. M., Weber, C., Mandel, J. L., Cancel, G., Abbas, N., Durr, A., Didierjean, O., Stevanin, G., Agid, Y., Brice, A. (1996). Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet* **14**: 285-91.
- Jiang, Q., Wong, J., Fyrst, H., Saba, J. D., Ames, B. N. (2004). gamma-Tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17825-30.
- Kalaany, N. Y., Mangelsdorf, D. J. (2006). LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol* **68**: 159-91.
- Karlsson, K. A. (1989). Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* **58**: 309-50.
- Karlsson, K. A., Pascher, I. (1971). Thin-layer chromatography of ceramides. *J Lipid Res* **12**: 466-72.
- Kiehl, T. R., Nechiporuk, A., Figueroa, K. P., Keating, M. T., Huynh, D. P., Pulst, S. M. (2006). Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 17-24.
- Kirfel, J., Magin, T. M., Reichelt, J. (2003). Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci* **60**: 56-71.
- Klein, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K., Harzer, K., Sandhoff, K. (1994). Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1440-8.
- Kok, J. W., Nikolova-Karakashian, M., Klappe, K., Alexander, C., Merrill, A. H., Jr. (1997). Dihydroceramide biology. Structure-specific metabolism and intracellular localization. *J Biol Chem* **272**: 21128-36.
- Kolter, T. (2002). Bioorganische Chemie von Glykolipiden. *Habilitationsschrift Universität Bonn*.
- Kolter, T., Sandhoff, K. (1999). Sphingolipids - Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angew Chem Int Ed* **38**: 1532-68.
- Kolter, T., Sandhoff, K. (2005). Principles of Lysosomal Membrane Digestion-Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingolipid Activator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 81-103.
- Kolter, T., Sandhoff, K. (2006). Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 2057-79.
- Kraveka, J. M., Li, L., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Ogretmen, B., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Bielawska, A. (2007). Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **282**: 16718-28.
- Krischel, V., Bruch-Gerharz, D., Suschek, C., Kroncke, K. D., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V. (1998). Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol* **111**: 286-91.
- Landmann, L. (1986). Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J Invest Dermatol* **87**: 202-9.

- Langmann, T., Buechler, C., Ries, S., Schaeffler, A., Aslanidis, C., Schuierer, M., Weiler, M., Sandhoff, K., de Jong, P. J., Schmitz, G. (1999). Transcription factors Sp1 and AP-2 mediate induction of acid sphingomyelinase during monocytic differentiation. *J Lipid Res* **40**: 870-80.
- Lastres-Becker, I., Nowock, J., Brodesser, S., Sandhoff, K., Schuermann, A., Luetjohann, D., Hintermann, E., Auburger, G. (2007). Lipid alterations in Ataxin-2 knock-out mice. *Hum Mol Genet*: in Vorbereitung.
- Ledeen, R. W., Wu, G. (1992). Ganglioside function in the neuron. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **4**: 174-187.
- Leone, M., Bottacchi, E., D'Alessandro, G., Kustermann, S. (1995). Hereditary ataxias and paraplegias in Valle d'Aosta, Italy: a study of prevalence and disability. *Acta Neurol Scand* **91**: 183-7.
- Levade, T., Jaffrezou, J. P. (1999). Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta* **1438**: 1-17.
- Linke, T. (2000). Purification, enzymatic characterization and interfacial activity of human acid ceramidase - The role of sphingolipid activator proteins in ceramide degradation. *Dissertation Universität Bonn*.
- Liu, K., Commens, C., Chong, R., Jaworski, R. (1988). Collodian babies with Gaucher's disease. *Arch Dis Child* **63**: 854-6.
- Macheleidt, O. (2002). Die Wasserbarriere der Haut - Der epidermale Ceramidstoffwechsel und seine Störungen bei der Atopischen Dermatitis. *Dissertation Universität Bonn*.
- Macheleidt, O., Kaiser, H. W., Sandhoff, K. (2002). Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **119**: 166-73.
- Madison, K. C., Sando, G. N., Howard, E. J., True, C. A., Gilbert, D., Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W. (1998). Lamellar granule biogenesis: a role for ceramide glucosyltransferase, lysosomal enzyme transport, and the Golgi. *J Invest Dermatol Symp Proc* **3**: 80-6.
- Maeda, I., Takano, T., Matsuzuka, F., Maruyama, T., Higashiyama, T., Liu, G., Kuma, K., Amino, N. (1999). Rapid screening of specific changes in mRNA in thyroid carcinomas by sequence specific-differential display: decreased expression of acid ceramidase mRNA in malignant and benign thyroid tumors. *Int J Cancer* **81**: 700-4.
- Makishima, M. (2005). Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci* **97**: 177-83.
- Marekov, L. N., Steinert, P. M. (1998). Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* **273**: 17763-70.
- Markwell, M. A., Svennerholm, L., Paulson, J. C. (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 5406-10.
- Maycock, A. L., Abeles, R. H., Salach, J. I., Singer, T. P. (1976). The structure of the covalent adduct formed by the interaction of 3-dimethylamino-1-propyne and the flavine of mitochondrial amine oxidase. *Biochemistry* **15**: 114-25.
- Menon, G. K., Grayson, S., Elias, P. M. (1986). Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J Invest Dermatol* **86**: 591-7.
- Merrill, A. H., Jr., Liotta, D. C., Riley, R. T. (1996). Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends Cell Biol* **6**: 218-23.
- Merrill, A. H., Jr., Sullards, M. C., Allegood, J. C., Kelly, S., Wang, E. (2005). Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods* **36**: 207-24.
-

Messer, A. (1977). The maintenance and identification of mouse cerebellar granule cells in monolayer culture. *Brain Res* **130**: 1-12.

Michel, C., van Echten-Deckert, G. (1997). Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **416**: 153-5.

Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., Merrill, A. H., Jr. (1997). Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem* **272**: 22432-7.

Mizutani, Y., Kihara, A., Igarashi, Y. (2004). Identification of the human sphingolipid C4-hydroxylase, hDES2, and its up-regulation during keratinocyte differentiation. *FEBS Lett* **563**: 93-7.

Mizutani, Y., Kihara, A., Igarashi, Y. (2005). Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *Biochem J* **390**: 263-71.

Momoi, T., Ando, S., Magai, Y. (1976). High resolution preparative column chromatographic system for gangliosides using DEAE-Sephadex and a new porous silica, Iatrobeads. *Biochim Biophys Acta* **441**: 488-97.

Montagna, W., Kligman, A. M., Carlisle, K. S. (1992). Atlas of Normal Human Skin. Springer Verlag, 1. Auflage.

Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* **1182**: 147-51.

Mu, Y., Gibbs, R. A., Eubanks, L. M., Poulter, C. D. (1996). Cuprate-Mediated Synthesis and Biological Evaluation of Cyclopropyl- and tert-Butylfarnesyl Diphosphate Analogs. *J Org Chem* **61**: 8010-8015.

Nemes, Z., Marekov, L. N., Fesus, L., Steinert, P. M. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8402-7.

Nemes, Z., Steinert, P. M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* **31**: 5-19.

Newcomb, M., Le Tadic-Biadatti, M.-H., Chestney, D. L., Roberts, E. S., Hollenberg, P. F. (1995). A Nonsynchronous Concerted Mechanism for Cytochrome P-450 Catalyzed Hydroxylation. *J Am Chem Soc* **117**: 12085-91.

Niemann, C., Watt, F. M. (2002). Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol* **12**: 185-92.

O'Brien, J. S., Sampson, E. L. (1965). Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* **6**: 537-44.

Ogretmen, B., Pettus, B. J., Rossi, M. J., Wood, R., Usta, J., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L. M., Hannun, Y. A. (2002). Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *J Biol Chem* **277**: 12960-9.

O'Keefe, E., Battin, T., Payne, R., Jr. (1982). Epidermal growth factor receptor in human epidermal cells: direct demonstration in cultured cells. *J Invest Dermatol* **78**: 482-7.

Omae, F., Miyazaki, M., Enomoto, A., Suzuki, M., Suzuki, Y., Suzuki, A. (2004). DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *Biochem J* **379**: 687-95.

Orozco, G., Estrada, R., Perry, T. L., Arana, J., Fernandez, R., Gonzalez-Quevedo, A., Galarraga, J., Hansen, S. (1989). Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings. *J Neurol Sci* **93**: 37-50.

---

- Orr, H. T. (2001). Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev* **15**: 925-32.
- Perry, D. K. (2000). The role of de novo ceramide synthesis in chemotherapy-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **905**: 91-6.
- Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S., Futerman, A. H. (2006). When Do Lasses (Longevity Assurance Genes) Become CerS (Ceramide Synthases)?: INSIGHTS INTO THE REGULATION OF CERAMIDE SYNTHESIS. *J Biol Chem* **281**: 25001-5.
- Pohlentz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., Sandhoff, K. (1988). Both GA2, GM2, and GD2 synthases and GM1b, GD1a, and GT1b synthases are single enzymes in Golgi vesicles from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7044-8.
- Ponec, M., Weerheim, A., Lankhorst, P., Wertz, P. (2003). New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 581-8.
- Pulst, S. M., Nechiporuk, A., Nechiporuk, T., Gispert, S., Chen, X. N., Lopes-Cendes, I., Pearlman, S., Starkman, S., Orozco-Díaz, G., Lunkes, A., DeJong, P., Rouleau, G. A., Auburger, G., Korenberg, J. R., Figueroa, C., Sahba, S. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* **14**: 269-76.
- Quintana, J., Barrot, M., Fabriàs, G., Camps, F. (1998). A Model Study on the Mechanism of Inhibition of Fatty Acyl Desaturases by Cyclopropene Fatty Acids. *Tetrahedron* **54**: 10187-98.
- Rheinwald, J. G., Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**: 331-43.
- Riess, O., Laccone, F. A., Gispert, S., Schols, L., Zuhlke, C., Vieira-Saecker, A. M., Herlt, S., Wessel, K., Epplen, J. T., Weber, B. H., Kreuz, F., Chahrokh-Zadeh, S., Meindl, A., Lunkes, A., Aguiar, J., Macek, M., Jr., Krebsova, A., Macek, M., Sr., Burk, K., Tinschert, S., Schreyer, I., Pulst, S. M., Auburger, G. (1997). SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics* **1**: 59-64.
- Robson, K. J., Stewart, M. E., Michelsen, S., Lazo, N. D., Downing, D. T. (1994). 6-Hydroxy-4-sphinganine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* **35**: 2060-8.
- Roop, D. R., Huitfeldt, H., Kilkenny, A., Yuspa, S. H. (1987). Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins. *Differentiation* **35**: 143-50.
- Rossi, A., Catani, M. V., Candi, E., Bernassola, F., Puddu, P., Melino, G. (2000). Nitric oxide inhibits cornified envelope formation in human keratinocytes by inactivating transglutaminases and activating protein 1. *J Invest Dermatol* **115**: 731-9.
- Rother, J., van Echten, G., Schwarzmann, G., Sandhoff, K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 14-20.
- Rouser, G., Feldman, G., Galli, C. (1965). Fatty Acid Compositions of Human Brain Lecithin and Sphingomyelin in Normal Individuals, Senile Cerebral Cortical Atrophy, Alzheimer's Disease, Metachromatic Leucodystrophy, Tay-Sachs and Niemann-Pick Diseases. *J Am Oil Chem Soc* **42**: 411-2.
- Rub, U., Schultz, C., Del Tredici, K., Gierga, K., Reifenberger, G., de Vos, R. A., Seifried, C., Braak, H., Auburger, G. (2003). Anatomically based guidelines for systematic investigation of the central somatosensory system and their application to a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) patient. *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**: 418-33.
-

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-4.
- Sandhoff, K., Kolter, T. (1996). Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol* **6**: 98-103.
- Sanpei, K., Takano, H., Igarashi, S., Sato, T., Oyake, M., Sasaki, H., Wakisaka, A., Tashiro, K., Ishida, Y., Ikeuchi, T., Koide, R., Saito, M., Sato, A., Tanaka, T., Hanyu, S., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Shimizu, N., Nomura, Y., Segawa, M., Iwabuchi, K., Eguchi, I., Tanaka, H., Takahashi, H., Tsuji, S. (1996). Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. *Nat Genet* **14**: 277-84.
- Sastry, P. S. (1985). Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* **24**: 69-176.
- Savile, C. K., Fabrias, G., Buist, P. H. (2001). Dihydroceramide delta(4) desaturase initiates substrate oxidation at C-4. *J Am Chem Soc* **123**: 4382-5.
- Sawatzki, P. (2003). Ceramid-Analoga als Werkzeuge in der Bioorganischen Chemie von Glykolipiden. *Dissertation Universität Bonn*.
- Scarlatti, F., Bauvy, C., Ventruti, A., Sala, G., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., Ghidoni, R., Codogno, P. (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* **279**: 18384-91.
- Schmuth, M., Man, M. Q., Weber, F., Gao, W., Feingold, K. R., Fritsch, P., Elias, P. M., Holleran, W. M. (2000). Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* **115**: 459-66.
- Schols, L., Gispert, S., Vorgerd, M., Menezes Vieira-Saecker, A. M., Blanke, P., Auburger, G., Amoiridis, G., Meves, S., Epplen, J. T., Przuntek, H., Pulst, S. M., Riess, O. (1997). Spinocerebellar ataxia type 2. Genotype and phenotype in German kindreds. *Arch Neurol* **54**: 1073-80.
- Schöls, L., Rieß, O. (2002). Neurogenetik - Molekulargenetische Diagnostik neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen. Kohlhammer Verlag, 2. Auflage.
- Schreiner, V., Gooris, G. S., Pfeiffer, S., Lanzendorfer, G., Wenck, H., Diembeck, W., Proksch, E., Bouwstra, J. (2000). Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* **114**: 654-60.
- Schuetz, C. G., Doering, T., Kolter, T., Sandhoff, K. (1999). The glycosphingolipidoses-from disease to basic principles of metabolism. *Biol Chem* **380**: 759-66.
- Schulte, S., Stoffel, W. (1993). Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10265-9.
- Schulz, A., Mousallem, T., Venkataramani, M., Persaud-Sawin, D. A., Zucker, A., Luberto, C., Bielawska, A., Bielawski, J., Holthuis, J. C., Jazwinski, S. M., Kozhaya, L., Dbaibo, G. S., Boustany, R. M. (2006). The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase. *J Biol Chem* **281**: 2784-94.
- Schwarzmann, G. (2001). Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Semin Cell Dev Biol* **12**: 163-71.
- Schwarzmann, G., Hofmann, P., Pütz, U., Albrecht, B. (1995). Demonstration of direct glycosylation of nondegradable glucosylceramide analogs in cultured cells. *J Biol Chem* **270**: 21271-6.
- Schwarzmann, G., Sandhoff, K. (1990). Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry* **29**: 10865-71.

- Seyfried, T. N., Bernard, D. J., Yu, R. K. (1984). Cellular distribution of gangliosides in the developing mouse cerebellum: analysis using the staggerer mutant. *J Neurochem* **43**: 1152-62.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B. G. (1994). Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**: 12787-94.
- Signorelli, P., Hannun, Y. A. (2002). Analysis and quantitation of ceramide. *Methods Enzymol.* **345**: 275-94.
- Silverman, R. B. (1983). Mechanism of inactivation of monoamine oxidase by trans-2-phenylcyclopropylamine and the structure of the enzyme-inactivator adduct. *J Biol Chem* **258**: 14766-9.
- Siskind, L. J., Colombini, M. (2000). The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 38640-4.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Spiegel, S., Milstien, S. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem* **277**: 25851-4.
- Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J., Frank, S. (1999). The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* **113**: 1090-8.
- Stewart, M. E., Downing, D. T. (1999). A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* **40**: 1434-9.
- Stoffel, W., LeKim, D., Sticht, G. (1968). Biosynthesis of dihydrosphingosine in vitro. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **349**: 664-70.
- Summers, S. A., Nelson, D. H. (2005). A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* **54**: 591-602.
- Sundaram, K. S., Lev, M. (1992). Purification and activation of brain sulfotransferase. *J Biol Chem* **267**: 24041-4.
- Svennerholm, L. (1963). Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* **10**: 613-23.
- Svennerholm, L. (1994). Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res* **101**: XI-XIV.
- Szulc, Z. M., Bielawski, J., Gracz, H., Gustilo, M., Mayroo, N., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Bielawska, A. (2006). Tailoring structure-function and targeting properties of ceramides by site-specific cationization. *Bioorg Med Chem* **14**: 7083-104.
- Takagi, S., Tojo, H., Tomita, S., Sano, S., Itami, S., Hara, M., Inoue, S., Horie, K., Kondoh, G., Hosokawa, K., Gonzalez, F. J., Takeda, J. (2003). Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt-deficient mice affects skin barrier function. *J Clin Invest* **112**: 1372-82.
- Takagi, Y., Kriehuber, E., Imokawa, G., Elias, P. M., Holleran, W. M. (1999). Beta-glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. *J Lipid Res* **40**: 861-9.
- Tepper, A. D., Diks, S. H., van Blitterswijk, W. J., Borst, J. (2000). Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *J Biol Chem* **275**: 34810-7.
-

- Ternes, P., Franke, S., Zahringer, U., Sperling, P., Heinz, E. (2002). Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* **277**: 25512-8.
- Thilo, L., Stroud, E., Haylett, T. (1995). Maturation of early endosomes and vesicular traffic to lysosomes in relation to membrane recycling. *J Cell Sci* **108**: 1791-803.
- Trenkner, E., Sidman, R. L. (1977). Histogenesis of mouse cerebellum in microwell cultures. Cell reaggregation and migration, fiber and synapse formation. *J Cell Biol* **75**: 915-40.
- Triola, G., Fabrias, G., Casas, J., Llebaria, A. (2003). Synthesis of cyclopropene analogues of ceramide and their effect on dihydroceramide desaturase. *J Org Chem* **68**: 9924-32.
- Triola, G., Fabrias, G., Dragusin, M., Niederhausen, L., Broere, R., Llebaria, A., van Echten-Deckert, G. (2004). Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-[(1R,2S)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(2-tridecyl-1-cyclopropenyl)ethyl]o ctanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons. *Mol Pharmacol* **66**: 1671-8.
- Triola, G., Fabrias, G., Llebaria, A. (2001). Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide, a Potent Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase. *Angew Chem Int Ed Engl* **40**: 1960-1962.
- Tserng, K. Y., Griffin, R. L. (2004). Ceramide metabolite, not intact ceramide molecule, may be responsible for cellular toxicity. *Biochem J* **380**: 715-22.
- Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, P. M., Holleran, W. M., Hamanaka, S. (2000). Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* **41**: 2071-82.
- van Blitterswijk, W. J., van der Luit, A. H., Veldman, R. J., Verheij, M., Borst, J. (2003). Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* **369**: 199-211.
- van de Loo, F. J., Broun, P., Turner, S., Somerville, C. (1995). An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6743-7.
- van Echten, G., Sandhoff, K. (1989). Modulation of ganglioside biosynthesis in primary cultured neurons. *J Neurochem* **52**: 207-14.
- van Echten, G., Sandhoff, K. (1993). Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem* **268**: 5341-4.
- van Echten-Deckert, G., Giannis, A., Schwarz, A., Futerman, A. H., Sandhoff, K. (1998). 1-Methylthiodihydroceramide, a novel analog of dihydroceramide, stimulates sphinganine degradation resulting in decreased de novo sphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem* **273**: 1184-91.
- van Meer, G., Stelzer, E. H., Wijnaendts-van-Resandt, R. W., Simons, K. (1987). Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells. *J Cell Biol* **105**: 1623-35.
- Vanier, M. T., Holm, M., Ohman, R., Svennerholm, L. (1971). Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain. *J Neurochem* **18**: 581-92.
- Venkataraman, K., Futerman, A. H. (2000). Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol* **10**: 408-12.
- Venkataraman, K., Futerman, A. H. (2001). Comparison of the metabolism of L-erythro- and L-threo-sphinganine and ceramides in cultured cells and in subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* **1530**: 219-26.
- Venkataraman, K., Riebeling, C., Bodennec, J., Riezman, H., Allegood, J. C., Sullards, M. C., Merrill, A. H., Jr., Futerman, A. H. (2002). Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog

- of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells. *J Biol Chem* **277**: 35642-9.
- Vietzke, J. P., Brandt, O., Abeck, D., Rapp, C., Strassner, M., Schreiner, V., Hintze, U. (2001). Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* **36**: 299-304.
- Voet, D., Voet, J. G. (1994). Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage.
- Wadia, N., Pang, J., Desai, J., Mankodi, A., Desai, M., Chamberlain, S. (1998). A clinicogenetic analysis of six Indian spinocerebellar ataxia (SCA2) pedigrees. The significance of slow saccades in diagnosis. *Brain* **121**: 2341-55.
- Wallar, B. J., Lipscomb, J. D. (1996). Dioxygen Activation by Enzymes Containing Binuclear Non-Heme Iron Clusters. *Chem Rev* **96**: 2625-2658.
- Walton, K. M., Sandberg, K., Rogers, T. B., Schnaar, R. L. (1988). Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* **263**: 2055-63.
- Wang, H., Maurer, B. J., Reynolds, C. P., Cabot, M. C. (2001). N-(4-hydroxyphenyl)retinamide elevates ceramide in neuroblastoma cell lines by coordinate activation of serine palmitoyltransferase and ceramide synthase. *Cancer Res* **61**: 5102-5.
- Watanabe, R., Wu, K., Paul, P., Marks, D. L., Kobayashi, T., Pittelkow, M. R., Pagano, R. E. (1998). Up-regulation of glucosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **273**: 9651-5.
- Weerheim, A., Ponc, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* **293**: 191-9.
- Wertz, P. W., Downing, D. T. (1987). Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* **917**: 108-11.
- Wertz, P. W., Madison, K. C., Downing, D. T. (1989). Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol* **92**: 109-11.
- Wertz, P. W., Miethke, M. C., Long, S. A., Strauss, J. S., Downing, D. T. (1985). The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* **84**: 410-2.
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Madison, K. C., Downing, D. T. (1987). Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol* **89**: 419-25.
- Williams, M. A., McCluer, R. H. (1980). The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem* **35**: 266-9.
- Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., Sato, Y. (1991). Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* **283**: 219-23.
- Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., Proia, R. L. (2003). Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3445-9.
- Yao, J. K., Rastetter, G. M. (1985). Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem* **150**: 111-6.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J. C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M. C., Cabot, M., Merrill, A. H., Jr. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 1864-84.