

# Die neurotoxische Wirkung von Sphingosin-1-phosphat

Mögliche Zusammenhänge zwischen  
Glykosphingolipid-Metabolismus und  
neurodegenerativen Prozessen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nadine Hagen

aus

Eitorf

Bonn 2010



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich – Wilhelms – Universität Bonn in der Zeit von Juni 2006 bis Juni 2010 am Kekulé – Institut für Organische Chemie und Biochemie unter der Leitung von Frau Priv. Doz. Dr. Gerhild van Echten –Deckert.

1. Referent: Frau Priv. Doz. Dr. Gerhild van Echten –Deckert
  2. Referent: Prof. Dr. Jörg Höfeld
- Erscheinungsjahr: 2010



## Danksagung

### **Danke an:**

meine Freunde, die mich immer unterstützt haben und mir Mut machten, niemals aufzugeben.

meine Familie, die immer hinter mir gestanden hat und mir geholfen hat, wo sie nur konnte: Angelika, Richard, Kevin, meine Großeltern sowie Gertrud & Oma Margarete und Heinz & Oma Hildegard.

Heinrich. Danke für alles. Du warst immer da, wenn ich dich brauchte, meine Hilfe, wenn ich verzweifelt war. I love you.

Frau Priv. Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert für die Diskussionen, die Ratschläge, die gute Betreuung, das Mitnehmen auf die Konferenzen und das Ermöglichen dieser Arbeit trotz aller Widrigkeiten.

Herrn Prof. Dr. Jörg Höhfeld für das Übernehmen des Co-Referats.

Prof. Dr. Swandulla für die Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber und Herrn Prof. Dr. Jochen Walter für die Begutachtung meiner Arbeit.

meine Laborkollegen für die schöne Arbeitsatmosphäre.

den Leuten im Maushaus für die gute Zusammenarbeit und Danke an Tanja und Olaf für die Hilfe bei den Ohrmarken 😊



## **Publikationshinweis**

Nadine Hagen, Paul P. Van Veldhoven, Richard L. Proia, Hyejung Park, Alfred H. Merrill, Jr and Gerhild van Echten-Deckert (2009). “*Subcellular origin of sphingosine-1-phosphate is essential for its toxic effect in lyase deficient neurons.*” J. Biol. Chem. 280 (17): 11346-11353

Nadine Hagen, Michael Hans, Dieter Hartmann, Dieter Swandulla and Gerhild van Echten – Deckert (submitted). “*Sphingosine-1-phosphate links glycosphingolipid metabolism to neurodegeneration via a calpain mediated mechanism.*”

Nadine Hagen, Hyejung Park, Alfred H. Merrill, Jr., and Gerhild van Echten – Deckert (in Vorbereitung). “*Altered sphingolipid metabolism in SIP-lyase deficient mice.*”

### **Weitere Veröffentlichungen:**

Sven Naetzker, Nadine Hagen and Gerhild van Echten-Deckert (2006). “*Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and partial reactivation of cell cycle by cis-4-methylsphingosine direct postmitotic neurons towards apoptosis.*” Genes to Cells 11(3): 269-279.

## Poster

Nadine Hagen, Alfred H Merrill Jr, Gerhild van Echten-Deckert. “*SIP and its analogs are killing neurons.*” 7th International Meeting of the Sphingolipid Club, Leiden, Niederlande (November 2008)

Nadine Hagen & Gerhild van Echten-Deckert “*Calpain mediates the apoptotic effect of a synthetic sphingosine-1-phosphate analog in postmitotic neurons.*” GBM Signal Transduction and Disease Meeting, Aachen (Oktober 2009)

Nadine Hagen, Michael Hans, Richard L. Proia and Gerhild van Echten-Deckert. „*Calpain mediates neuronal apoptosis induced by a semi-synthetic SIP analog.*“ Gordon Research Conference, Ventura, Californien, USA (Februar 2010)



## Abkürzungsverzeichnis

### A

---

A $\beta$	Amyloid beta
ADP	Adenosindiphosphat
Akt	Proteinkinase, auch PKB genannt
Apaf-1	Apoptose protease activating factor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APP	Amyloid beta precursor protein
AraC	Cytosin- $\beta$ -D-Arabino-Furanosid-Hydrochlorid
ATP	Adenosintriphosphat

### B

---

$\beta$ Gal	$\beta$ -Galaktosidase
$\beta$ Glc	$\beta$ -Glucosidase
B104	Neuroblastomazellen B104
Bapta-AM	1,2-bis-(2-aminophenoxy-)ethan-tetra-acetat - acetoxymethylester
Bax	Bcl-2 associated x protein
Bcl	B cell lymphoma
Bcl-X <sub>L</sub>	B cell lymphoma X Large
BH	Bcl homology domain
Bid (tBid)	BH3 interacting domain death agonist, t = truncated
BSA	Bovine serum albumin
bp	Basenpaar

### C

---

C1PP	Ceramid-1-phosphat-phosphatase
CAD	Caspase activated DNase
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
Caspase	Cystein-aspartyl-protease
CDase	Ceramidasen
CDK	Cyclin dependent kinase
Cer	Ceramid
CERT	Ceramide transport protein
CHO	Chinese hamster ovary, Zelllinie
Ci	Curie
Cimes	cis-4-Methylsphingosin
CimesP	cis-4-Methylsphingosin-phosphat
CK	Ceramid-Kinase
CKI	CDK Inhibitor
CMF	Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -freier Tyrodepuffer
CS	Ceramid-synthase
Cyt c	Cytochrom c

### D

---

DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp, Aminosäuresequenz
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol

## **E**

---

E2F	Eukaryotic Transkription Faktor 2
EDG	Endothelial-differentiating gene
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolteraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol

## **F**

---

FKS	Fetales Kälberserum
-----	---------------------

## **G**

---

g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G <sub>i, 0, q, 12/13</sub>	G-Protein
GalCer	Galactosylceramid
GalNAcT	N-Acetyl-Galactosaminyltransferase
GalT	Galactosyltransferase
GlcCer	Glucosylceramide
GlcT	Ceramid-Glucosyltransferase
G-Phase	Gap-Phase, Gap = Lücke
G-Protein	Protein mit intrinsischer GTPase Aktivität
GSL	Glycosphingolipide
GTP	Guanosintriphosphat

## **H**

---

h	Stunde (engl. hour)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HexA, B	Hexosaminidase A bzw. B
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettich)

## **I**

---

IAP	Inhibitor of apoptosis
iCAD	Inhibitor of CAD
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat

## **J**

---

JNK	Jun amino-terminal kinase
-----	---------------------------

## **K**

---

K	Kontrolle
kDa	Kilodalton

## L

---

l	Liter
---	-------

## M

---

M	Molarität
m	Meter
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
M-Phase	Mitose – Phase
min	Minuten
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
mM	Millimolar
M-Phase	Mitose-Phase

## N

---

N <sub>2</sub>	Stickstoff
NADP (H)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, (reduzierte Form)
NANA	N-acetylneuraminsäure
nm	Nanometer
NGF	Nerve Growth Factor
nM	Nanomolar

## P

---

p21	Regulatorisches Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa
P25 / p35	Regulatorprotein der CDK5 mit einem Molekulargewicht von 25 bzw. 35 kDa
p38 MAPK	MAPK mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, auch SAPK
p53	Regulatorisches Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcolin
PC12	Pheochromocytoma 12
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B, auch Akt
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLP	Pyridoxalphosphat
PM	Plasmamembran
PMCA	Plasma Membran Ca <sup>2+</sup> - ATPase
PP	Proteinphosphatase
PS	Pferdeserum
PSL	Phosphosphingolipide
PTX	Pertussistoxin

## R

---

Rb	Retinoblastoma Protein
Rac/Rho	kleine G-Proteine
Raf	ras associated factor

Ras	rat sarcoma
RNA	Ribonucleinacid / Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz

## S

---

S1P	Sphingosin-1-phosphat
S1P <sub>1-5</sub>	Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1-5
S1P-Lyase	Sphingosin-1-phosphat-Lyase
S1PP	Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase
SAP	Sphingolipid activator protein
SAPK	Stress activated protein kinase
SAT	Sialyltransferase
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum ATPase
siRNA	Small interfering RNA
SMase	Sphingomyelinase
SMS	Sphingomyelin-Synthase
SOC	Store operated calcium channels
S-Phase	Synthese-Phase
Sph	Sphingosin
SK	Sphingosinkinase
SPL	Sphingosin-1-phosphat Lyase
SPP	Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase
SPT	Serin-Palmitoyltransferase

## T

---

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween-20
TFDP1	Transcription Factor (E2F) dimerisation partner 1
TEMED	N´N´N´-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Factor
TNF-R	Tumor Nekrose Factor-Rezeptor
TRAF 2	TNF receptor-associated factor 2
Tris	Trishydroxyaminomethan

## U

---

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
UV	Ultraviolette Licht

## V

---

V	Volt
---	------

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Gehirn.....	1
1.2	Demenz.....	3
1.2.1	Morbus Alzheimer.....	3
1.2.1.1	Amyloid $\beta$ .....	3
1.2.1.2	Das Tau-Protein.....	5
1.3	Apoptose.....	6
1.3.1	Caspasen .....	7
1.4	ER-Stress & Calcium .....	8
1.5	Zellzyklus .....	9
1.6	Sphingolipide.....	11
1.6.1	Stoffwechsel der Sphingolipide.....	12
1.6.2	Sphingolipide als Signalmoleküle .....	16
1.6.2.1	Ceramid .....	16
1.6.2.2	S1P .....	17
1.6.3	Sphingosin Analoga.....	17
1.7	Zielsetzung .....	20
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
2.1	S1P-Lyase-defizienten Mäuse .....	21
2.2	Lipidanalysen – Anstieg von S1P und Sphingosin in den SPL-defizienten Neuronen	23
2.2.1	Analyse der Sphingoidbasen .....	23
2.2.2	Analyse der Ceramidespezies in SPL-defizienten Neuronen.....	26
2.2.3	Effekte der SPL-Defizienz auf den intrazellulären Gehalt an Hexosylceramid und Sphingomyelin.....	28
2.2.4	Inhibierung der <i>de novo</i> Sphingolipid-Synthese in SPL-defizienten Neuronen .....	30
2.2.5	Aktivierung des Sphingolipid-Recyclingweges in SPL-defizienten Neuronen .....	32
2.2.6	Veränderungen des Lipidmetabolismus in Leber und Gehirn von SPL-defizienten Mäusen .....	34
2.3	Im Gegensatz zu Sphingosin induziert S1P Apoptose in SPL-defizienten Neuronen.	35
2.4	S1P und Cimes induzieren Apoptose in SPL-defizienten bzw. Wildtyp Neuronen.....	36
2.4.1	Korrelation der apoptotischen Wirkung von Cimes und S1P mit morphologischen Veränderungen der Neuronen.....	37

2.5	S1P induziert eine unvollständige Aktivierung des Zellzyklus in SPL-defizienten Neuronen .....	38
2.6	Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der Sphingoid-induzierten Apoptose .....	39
2.6.1	PTX verhindert nicht die S1P-induzierte Apoptose in den SPL-defizienten Neuronen .....	40
2.6.2	Die Inhibierung von S1P <sub>2</sub> hat keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose.....	41
2.6.3	S1P <sub>1-3</sub> sind nicht an der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose beteiligt .....	42
2.7	Unterschiede in der Phosphorylierung von exogenem Sphingosin und S1P .....	44
2.8	Die Phosphorylierung von Cimes durch die Sphingosin-Kinase2 ist essentiell für dessen neurotoxische Wirkung .....	46
2.8.1	Die Sphingosin-Kinase1 hat keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose.....	47
2.9	Mitochondrien sind nicht an der Sphingoidphosphat (Cimes, S1P) induzierten Apoptose beteiligt.....	50
2.10	Caspase-9 und Caspase-12 vermitteln die Mitochondrien-unabhängige Apoptose.....	51
2.11	Calpain vermittelt die Cimes induzierte Apoptose.....	53
2.12	Die Reaktivierung des Zellzyklus ist abhängig von Calpain und CDK5/p25.....	55
2.13	Einfluss von Cimes auf das Tau Protein.....	57
2.13.1	Sphingoidphosphate induzieren eine Tau Hyperphosphorylierung .....	59
2.13.2	Calpain vermittelt die Cimes induzierte Tau-Hyperphosphorylierung .....	59
2.14	Vergleich zwischen FTY720 und Cimes.....	61
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
3.1	Die S1P-Lyase ist für eine normale Entwicklung in Mäusen essentiell.....	63
3.2	Veränderungen im Lipidmetabolismus von SPL-defizienten Neuronen.....	64
3.3	Der Ursprung der Sphingoidphosphate ist entscheidend für deren Wirkungen.....	67
3.4	Identifikation des Sphingoidphosphat induzierten apoptotischen Signalweges.....	72
3.5	Cimes bewirkt eine Calpain vermittelnde Tau Hyperphosphorylierung und die Entstehung eines zusätzlichen Tau Fragments .....	76
3.6	Zusammenfassung des Signalweges.....	78
3.7	Pathophysiologische Bedeutung von S1P .....	79
3.8	Ausblick.....	80
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>

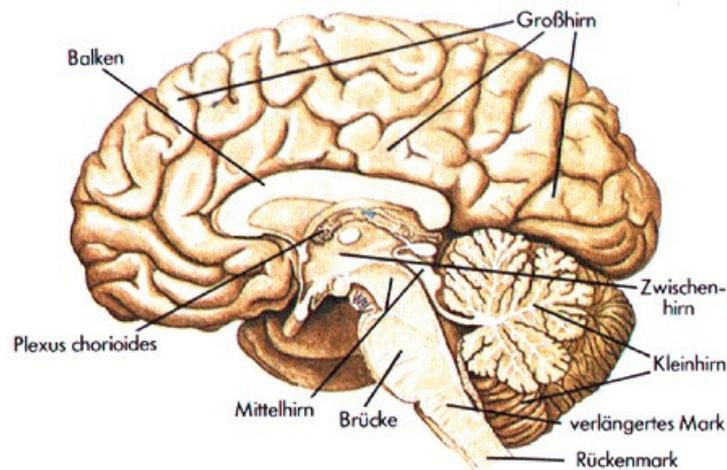
<b>5</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>84</b>
5.1	Geräte .....	84
5.2	Verbrauchsmaterialien.....	85
5.3	Chemikalien.....	86
5.4	Inhibitoren .....	87
5.5	Kits .....	88
5.6	Antikörper.....	88
5.7	Enzyme & Proteine.....	89
5.8	Lipide.....	89
5.9	DNA .....	89
5.10	Medien.....	89
5.11	Versuchstiere .....	90
5.12	Genotypisierung transgener Mäuse .....	90
5.12.1	Genotypisierungs-PCR (Polymerase chain reaction) .....	90
5.12.2	Visualisierung der DNA Fragmente.....	93
5.13	Primärkultur von Kleinhirnneuronen der Maus .....	94
5.13.1	Vorbereitung von Zellkulturschalen für die Primärkultur.....	94
5.13.2	Herstellung der Primärkultur.....	94
5.13.3	Vorbereitung primärer Nervenzellen für die Versuche .....	95
5.13.4	Herstellung des calciumfreien Mediums (100 nM Calcium) .....	96
5.13.4.1	Berechnung der benötigten Chelator Konzentration.....	96
5.14	Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) .....	97
5.15	Zellernte.....	97
5.16	Bestimmung des Zelltods .....	97
5.16.1	Viabilitäts Test.....	97
5.16.2	Caspase – Assay .....	98
5.16.3	Fluoreszenzanalyse (Vybrant Assay) .....	99
5.16.4	DNA-Fragmentanalyse.....	99
5.16.4.1	Isolierung genomischer DNA.....	99
5.16.4.2	DNA Quantifizierung.....	100
5.16.4.3	Agarosegelelektrophorese .....	100
5.17	RNA Interferenz .....	101
5.17.1	siRNA Foreward Transfektion .....	101
5.17.2	RNA Isolation.....	102

5.17.3 RNA Quantifizierung .....	102
5.17.4 Agarosegelelektrophorese .....	103
5.17.5 Reverse Transkription .....	103
5.17.6 Real Time PCR.....	104
5.18 Bestimmung der Proteinexpression.....	105
5.18.1 Proteinextraktion .....	105
5.18.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	105
5.18.3 Aufkonzentrierung der Proteine .....	106
5.18.4 SDS PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelectrophoresis) .....	106
5.18.5 Western Blotting.....	108
5.19 Lipide.....	109
5.19.1 Extraktion der Lipide.....	109
5.19.2 Dünnschichtchromatographie.....	110
5.19.3 Radioaktive Markierung mittels [ <sup>14</sup> C]-Serin und D[1- <sup>14</sup> C]-Galaktose.....	110
5.19.4 Nachweis von S1P mittels [ <sup>32</sup> P] Markierung.....	111
5.20 Statistische Auswertung der Versuche .....	112
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gehirn

Das Gehirn gliedert sich in Großhirn (Telencephalon), Kleinhirn (Cerebellum), Zwischenhirn (Diencephalon) und Stammhirn (truncus cerebri) (**Abb. 1**) und ist in zwei Hälften (Hemisphären) unterteilt, die durch den Balken (Corpus callosum) miteinander verbunden sind. Geschützt vor Verletzungen und Erschütterungen liegt das Gehirn im Hirnwasser, welches vom Schädelknochen und den Hirnhäuten umgeben ist.



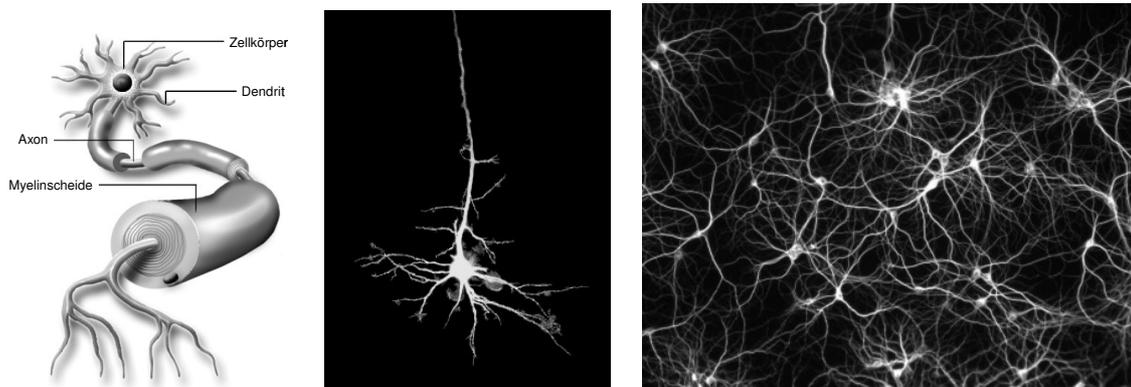
**Abb. 1: Das menschliche Gehirn.** Der Plexus chorioideus bildet die Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit. (Quelle: <http://www.welt.de>).

Sinneseindrücke sowie die Funktionen des Körpers werden durch das Gehirn verarbeitet und koordiniert. Hierzu bedarf es der ständigen Kommunikation zwischen den Nervenzellen (Neuronen, **Abb. 2**) über elektrische Impulse.

Das Cerebellum gliedert sich in zwei Hälften und den Kleinhirnwurm, der die beiden Hälften verbindet. Das Kleinhirn ist ein Koordinationszentrum, welches viele Regelkreise und Rückkopplungsmechanismen beinhaltet, die für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts erforderlich sind. Es steuert somit Gleichgewicht, Bewegung und Koordination. Nur unter Mithilfe des Kleinhirns sind zielgerichtete genaue Bewegungen möglich. Das Kleinhirn hat dabei auch ein Gedächtnis für gelernte Bewegungsabläufe und ist für die unbewusste Steuerung von Bewegungen, das motorische Lernen und die sensomotorische Integration von Bewegungen zuständig. Automatisierte Bewegungsabläufe werden im Kleinhirn gespeichert. Die Bewegungsabläufe beim Klavierspielen, Tanzen aber auch beim Sprechen sind also nicht

nur über die motorische Rinde des Großhirns sondern auch im Kleinhirn abgespeichert. Das Kleinhirn scheint aber auch eine wichtige Funktion bei der Aufmerksamkeit zu haben und kann leichtere Defekte lange kompensieren. Alle Funktionen des Kleinhirns wurden bisher nur zum Teil verstanden und es ist möglicherweise bedeutsamer als bisher angenommen, denn neuere Forschungen lassen darauf schließen, dass es auch am Spracherwerb und am sozialen Lernen beteiligt ist (Ackermann, 2008).

Das Gehirn setzt sich aus verschiedenen Zelltypen, hauptsächlich Neuronen und Gliazellen (griechisch: glia - Leim, Kitt) zusammen. Aus letzteren gehen unter anderem Astrocyten (lateinisch: astrum - Stern), Oligodendrocyten (griechisch: oligo - wenig und dendron – Baum) und Mikrogliazellen hervor. Neuronen bestehen aus einem Zellkörper (Soma), welcher eine Größe von 5 – 100 µm aufweist und den Zellfortsätzen (Neuriten), die sich auf einen Durchmesser von ca. 1 µm verjüngen. Die Neurite unterteilen sich in Dendriten, von denen ein Neuron Tausende haben kann und in ein bis zu einen Meter langes Axon. Am Ende des Axons befinden sich die Endplatten (Synapsen), mit denen die Neuronen mit anderen Nervenzellen oder Muskeln verbunden sind.



**Abb. 2: Neuronen.** (Quelle: <http://idw-online.de>)

Die Nervenzellen werden von den Gliazellen umhüllt, die etwa 50% des gesamten Hirnvolumens ausmachen. Astrocyten sind an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und erfüllen eine wichtige Funktion bei der Versorgung des Gehirns, während Oligodendrocyten die isolierenden Myelinscheiden um die Neurite bilden. Viele Studien deuten allerdings darauf hin, dass Astrocyten nicht nur strukturelle und unterstützende Funktionen aufweisen, sondern auch an der Signalweitergabe beteiligt sind, indem sie Neurotransmitter aufnehmen und freisetzen (Hamilton and Attwell, 2010). Mikrogliazellen entstammen dem Knochenmark und sind Teil der Immunabwehr des Nervensystems.

## 1.2 Demenz

Demenz schließt viele Erkrankungen verschiedenster Ursachen ein, die zu einer Abnahme des Gedächtnisses und der Denkfähigkeit führen. Oft sind mehrere geistige Bereiche betroffen, wie die Orientierung oder die Lern- und Urteilsfähigkeit, was die Betroffenen erheblich in ihrem Leben beeinträchtigt. Demenz tritt überwiegend in der älteren Bevölkerung ab dem 65. Lebensjahr auf, kann allerdings wie im Falle der erblichen Alzheimerschen Erkrankung auch jüngere Menschen betreffen.

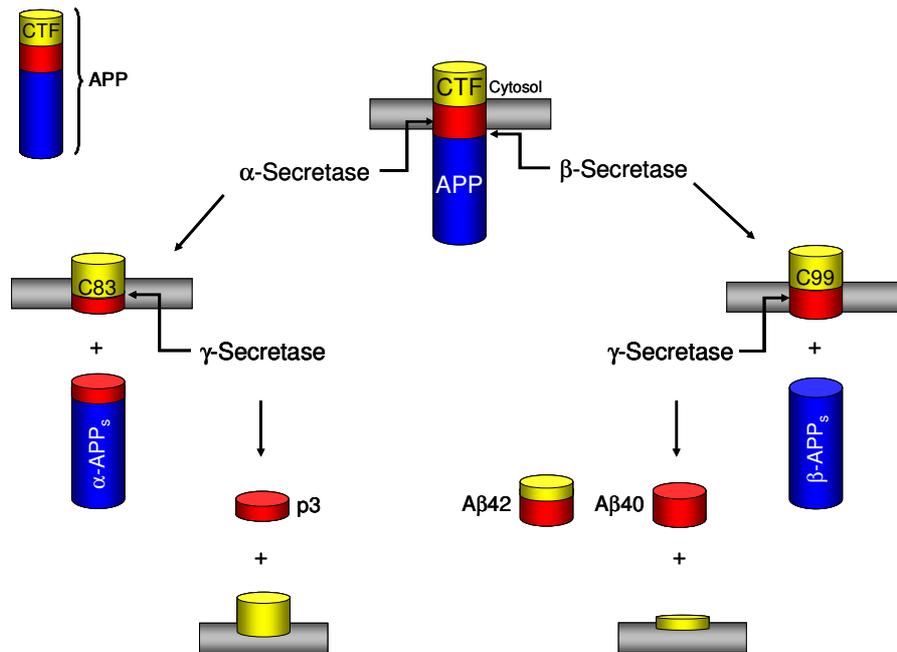
### 1.2.1 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer (AD, Alzheimer's disease) ist von den neurodegenerativen Krankheiten die häufigste Ursache der Demenz in der älteren Bevölkerung (Han, 2005). Die Krankheit wird klinisch durch den progressiven Verlust des Erinnerungsvermögens und anderer kognitiver Fähigkeiten charakterisiert. Pathologisch zeichnet sich AD durch eine Atrophie des Gehirns aus, die sich in dem Verlust von Nervenzellen und Synapsen, sowie in der Anwesenheit von extrazellulären neuritischen Plaques und intrazellulären neurofibrillären Bündeln (neurofibrillary tangles, NFTs) äußert, welche aus Amyloid- $\beta$  Peptiden (A $\beta$ ) bzw. hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (Morishima-Kawashima and Ihara, 2002). Diese Anreicherungen sind die Kennzeichen von AD und ermöglichen eine verlässliche Diagnose erst post mortem (Holtzman, 2002).

#### 1.2.1.1 Amyloid $\beta$

Das Amyloid Vorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein, APP), aus dem A $\beta$  entsteht, ist ein Typ 1 integrales Membranprotein, das eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (**Abb. 3** blau), eine Transmembranregion (**Abb. 3** rot) und einen kurzen cytosolischen Bereich besitzt (**Abb. 3** gelb).

Die genaue physiologische Funktion des Amyloid Proteins ist nicht bekannt. APP wird auf zwei alternativen Wegen, dem nicht amyloidogenen und dem amyloidogenen Weg, im Lumen zellulärer Organellen (Endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen) oder an der Zelloberfläche proteolytisch prozessiert.



**Abb. 3: Prozessierung von APP.** Das Transmembranprotein APP wird entweder durch die  $\alpha$ -Sekretase unter Sekretion von  $\alpha$ -APPs geschnitten oder aber durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase unter Sekretion von  $A\beta$ . Dieses bildet zunächst neurotoxische Oligomere, bevor es sich in den Amyloid Plaques abgelagert. APP – amyloid precursor protein; Blau – N-terminale Ectodomäne; Gelb – C-terminale cytosolische Domäne; CTF – C-terminal fragment. Modifiziert nach (Weiner and Frenkel, 2006)

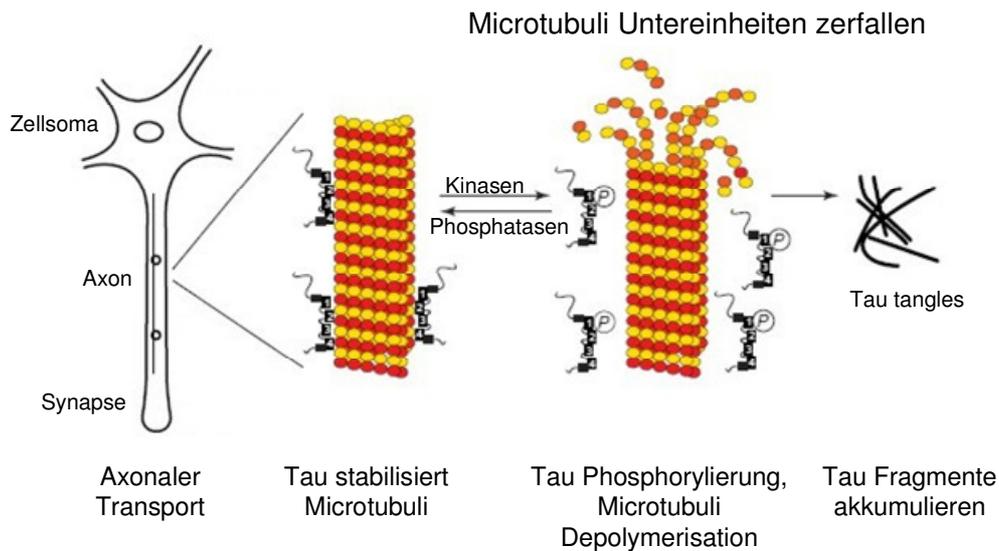
Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung spalten  $\alpha$ -Sekretasen das APP innerhalb der Amyloid- $\beta$ -Region (**Abb. 3**, linke Seite) (Anderson et al., 1991). Dabei entstehen ein großes, lösliches N-terminales APP-Fragment ( $\alpha$ -APPs) und ein in der Membran verankertes C-terminales Fragment, C83 (Schubert et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Die  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung erfolgt intrazellulär. Von C83 spaltet die  $\gamma$ -Sekretase ein weiteres Peptid, P3 ab, das sezerniert wird (Haass and Selkoe, 1993). Bei der amyloidogenen Prozessierung entsteht  $A\beta$  durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung des APP (**Abb. 3**, rechte Seite). Dabei spaltet die  $\beta$ -Sekretase APP zuerst innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der  $A\beta$ -Region. Dadurch entsteht analog zur  $\alpha$ -Sekretase-Spaltung lösliches  $\beta$ -APPs (s für soluble, löslich), sowie ein amyloidogenes C-terminales Fragment, das als C99 bezeichnet wird (Sinha et al., 1999). Durch  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung von C99 entstehen C-Termini von Amyloid-Peptiden unterschiedlicher Länge (LaFerla, 2002).  $A\beta$  wird sekretiert und bildet unter bestimmten Bedingungen unlösliche, fibrilläre Aggregate, den Hauptbestandteil der Amyloid Plaques. In den Gehirnen von gesunden älteren Menschen wurden interessanterweise ebenfalls Amyloid Plaque gefunden, die sich nur in ihrer weniger dichten Struktur von den in AD auftretenden Plaques unterscheiden (Armstrong, 2006). Verschiedene Faktoren wie oxidativer Stress, Inflammation und Mutationen in den Sekretasen

können die Produktion von A $\beta$  erhöhen (Selkoe, 1997; Albers and Beal, 2000; McGeer and McGeer, 2003).

### 1.2.1.2 Das Tau-Protein

Tau ist ein cytosolisches Protein, welches unter physiologischen Bedingungen mit den axonalen Mikrotubuli assoziiert ist (**Abb. 4**) (Binder et al., 2005). Die Expression von Tau ist während der neuronalen Entwicklung stark erhöht (Drubin and Kirschner, 1986). In dieser Zeit wird Tau in das Axon transportiert und diversifiziert dort durch alternatives Spleißen zu sechs Isoformen (Goedert et al., 1989). Tau besitzt eine acidische N-terminale Domäne, eine Basen- und Prolinreiche Mitteldomäne mit 4 internen Wiederholungen (*internal repeats, repeat domain*) sowie eine C-terminale Domäne. Im Gegensatz zu den meisten Proteinen ist Tau im nativen Zustand ein ungefaltetes, hydrophiles Protein mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen, über die die Bindung an die Mikrotubuli reguliert wird. Die Phosphorylierungsstellen lassen sich in zwei Klassen unterteilen: in den flankierenden Regionen beiderseits der *internal repeats* befinden sich einige Serin-Prolin und Threonin-Prolin Motive, die Ziele von Prolin-gerichteten Kinasen wie der GSK3 (glykogen synthase kinase3), der CDK5 (cyclin dependent kinase5) oder den MAPKinasen (mitogen activated protein kinase) sind (Mandelkow et al., 1995; Trojanowski and Lee, 1995). Diese Stellen haben nur einen geringen Einfluss auf die Tau – Mikrotubuli Interaktionen, werden aber als diagnostische Marker verwendet (Mandelkow et al., 2007). Andere Phosphorylierungsstellen wie die KXGS Motive und verschiedene Serine befinden sich innerhalb der *internal repeats* und werden von der PKA (Proteinkinase A) oder den MARKinasen (microtubule affinity regulating kinase) erkannt. Phosphorylierungen an diesen Stellen fördern die Dissoziation von Tau von den Mikrotubuli (Drewes et al., 1997).

Die Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau (**Abb. 4**) tritt im Gegensatz zu den A $\beta$ -Plaques in weiteren neurologischen Krankheiten, den so genannten Tauopathien zu denen auch Morbus Pick und die Frontotemporale Demenz gehören auf (Dickson, 2009).



**Abb. 4: Bildung der Tau-Fibrillen.** Tau stabilisiert im gesunden Zustand die Mikrotubuli. Nach seiner Hyperphosphorylierung dissoziiert Tau von den Mikrotubuli und bildet Fibrillen (tau tangles). Modifiziert nach (Mandelkow and Mandelkow, 1998).

### 1.3 Apoptose

Apoptose (griechisch: apo – weg und ptosis – Fall, wie das Fallen der Blätter im Herbst) stellt eine Form des programmierten Zelltodes dar und ist für Homöostase und Differenzierung von Geweben sowie für die Embryonalentwicklung essentiell. Im wachsenden Nervensystem wird die Anzahl der Neuronen mittels programmiertem Zelltod an die Zahl der Zielzellen angepasst (Ellis et al., 1991). Apoptose kann auch als Folge von Strahlung, chemischen Mutagenen oder Onkogenen auftreten und schützt somit den Organismus vor Zellen, deren Wachstum nicht mehr reguliert werden kann.

Die Zellen unterliegen einer ständigen Beeinflussung verschiedener Faktoren, die eine Balance zwischen Apoptose und Proliferation ermöglichen. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen diesen beiden Prozessen ist streng reguliert. Es handelt sich hierbei um sehr komplexe Vorgänge in denen Signalwege aufgrund einer koordinierten Steuerung mitotische oder apoptotische Prozesse auslösen können (Chau and Wang, 2003). Diese Regulation ermöglicht eine Eliminierung nicht mehr benötigter oder entarteter Zellen und ist für einen funktionierenden Organismus unerlässlich. Eine Störung dieser Regulation in Form einer erhöhten Apoptoserate kann zu einer Vielzahl an pathologischen Zuständen wie neurodegenerativen Erkrankungen führen (Nicholson, 2000), wohingegen eine verringerte Apoptoserate zu malignen Erkrankungen oder Autoimmunkrankheiten führen kann (Zornig et al., 2001).

Während der Apoptose finden charakteristische Veränderungen in den Zellen statt. Die Zellen schrumpfen, verlieren den Zellkontakt, Cytoplasma und Chromatin kondensieren. Durch Membranabschnürungen, dem so genannten *blebbing*, werden die apoptotischen Körperchen gebildet, die schließlich von den Immunzellen phagozytiert werden. Im Gegensatz zur Energieverbrauchenden, streng regulierten Apoptose verläuft die Nekrose (griechisch: *nékrosis* – Absterben) unkontrolliert und passiv ab. Bei einer sehr schweren Beschädigung der Zelle stirbt diese an Nekrose und der Zellinhalt verteilt sich in die Umgebung, was zu einer Schädigung der umliegenden Gewebe und zu einer Immunantwort in Form einer Entzündung führt, die das Gewebe noch weiter zerstört (Saraste and Pulkki, 2000).

Grundsätzlich wird zwischen zwei apoptotischen Signalwegen unterschieden, die jedoch beide zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führen (Salvesen and Dixit, 1999). Durch Signale anderer Zellen wie cytotoxischen T-Zellen wird der extrinsische, Rezeptor vermittelte Signalweg ausgelöst. Intrazelluläre Signale wie DNA-Schäden führen dagegen zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges, bei dem gewöhnlich die Mitochondrien eine wichtige Rolle übernehmen (Cho and Choi, 2002).

### 1.3.1 Caspasen

Wichtige Vermittler der Apoptose sind die Caspasen, eine hoch konservierte Proteasefamilie. Caspasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein und spalten ihre Zielproteine an einem C-terminalen Aspartylrest (Caspase = Cystein-aspartyl-specific-protease) (Thornberry and Lazebnik, 1998). Caspasen werden als Procaspasen mit nur geringer Enzymaktivität synthetisiert und liegen als inaktive Zymogene im Cytoplasma vor. Alle Caspasen enthalten drei Domänen: die variable N-terminale Prodomäne, sowie eine große (20 kDa) und eine kleine (10 kDa) Untereinheit. Ihre Aktivierung erfolgt durch die proteolytische Entfernung der N-terminalen Prodomäne und der Spaltung in eine kleine und eine große Untereinheit. Aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten bildet sich schließlich ein Tetramer mit zwei katalytischen Zentren (Thornberry and Lazebnik, 1998). Bestimmte Adapterproteine bringen die Initiator-Procaspasen (Caspase -2, -8, -9, -10 und -12), die sich durch eine verlängerte Prodomäne auszeichnen, in einem Komplex zusammen. Dort können sich die Procaspasen autokatalytisch spalten und aktivieren (Salvesen and Dixit, 1999). Die Initiator-Caspasen sind für die Weiterleitung des apoptotischen Signals an die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) verantwortlich, die wiederum weitere Proteine spalten und dafür Sorge tragen, dass das Apoptosesignal kaskadenartig verstärkt wird (Slee et al., 1999). Hauptsächlich sind die Effektor-Caspasen jedoch für die Exekutive des Zelltodes

verantwortlich, indem sie eine Vielzahl an Substraten, unter anderem Strukturproteine und Enzyme der DNA-Reparatur sowie Regulatorproteine des Zellzyklus spalten (Salvesen, 2002). Allerdings sind nicht alle Caspasen an der Ausführung der Apoptose beteiligt. Einige Caspasen (Caspase-1, -4, -5 und -13) prozessieren Cytokine und tragen damit ihren Teil zu Entzündungsprozessen bei (Thornberry and Lazebnik, 1998). Die Kontrolleure der Caspasen sind die gewebespezifischen Proteine der IAP-Familie (Inhibitor of apoptosis), die an spezifische Sequenzen der Caspasen binden und sie somit inhibieren (Deveraux and Reed, 1999; Deveraux et al., 1999).

## 1.4 ER-Stress & Calcium

Das endoplasmatische Reticulum (ER) erstreckt sich als ein riesiges Netzwerk bei allen eukaryotischen Zellen von der Kernhülle bis zur Plasmamembran und erfüllt wichtige Funktionen bei vielen zellulären Vorgängen (Baumann and Walz, 2001). Es ist der Ort der Proteinsynthese und -faltung, der Calcium Speicherung und ein Regulator der intrazellulären Calciumkonzentration. Auch werden viele Lipide am ER synthetisiert, wie Steroide, Phospholipide und Sphingolipide. Die ordnungsgemäße Faltung der Proteine im Lumen des ER benötigt eine genau definierte Umgebung, weswegen das ER hoch sensibel auf Veränderungen seiner Umgebung reagiert. Calcium Ionophoren, die das Calcium aus dem ER Lumen ausschleusen, Inhibitoren von Glycosylierungen, oxidativer Stress und Ansammlungen fehlgefalteter Proteine im ER können die ER Funktionen stören, was schließlich zu ER-Stress führt (Rao et al., 2004). Das ER antwortet auf den Stress, indem es unterschiedliche Signalwege, wie den *unfolded protein stress response* (UPR), den *ER-overload response* (EOR) und die *ER-associated degradation* (ERAD) aktiviert. Die Aktivierung aller drei Signalwege führt zu einer Reduzierung von neu synthetisierten Proteinen im ER Lumen und einem erhöhten Abbau der falsch gefalteten Proteine. Wenn der Stress jedoch zu schwer ist oder zu lange anhält werden die apoptotischen Signalwege, wie die ER-Stress spezifische Caspasen Kaskade aktiviert (Breckenridge et al., 2003; Mattson and Chan, 2003).

Viele luminale Vorgänge im ER sind durch Calcium reguliert. Tatsächlich weist das Lumen des ERs eine um 1000-mal höhere Calcium Konzentration als das Cytosol auf (Bojarski et al., 2008). Calcium ist für eine Vielzahl an neuronalen Funktionen wie Genexpression, Proliferation, Erregbarkeit, Freisetzung von Neurotransmittern und Apoptose unerlässlich (Berridge et al., 2000). Das ER ist sowohl die Quelle des Calciums als auch ein effizientes

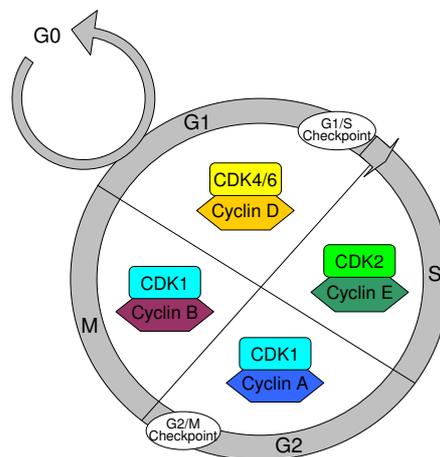
Puffersystem für die Calcium Homeostase (Neher and Sakaba, 2008; Verkhratsky et al., 2009). Viele Enzyme werden zudem durch die cytosolische Calciumkonzentration gesteuert. Eines dieser Enzyme ist die Calcium abhängige Cysteinprotease Calpain. Obwohl bis zu 15 Vertreter der Calpainfamilie bisher identifiziert wurden, sind nur zwei Isoformen, Calpain 1 und Calpain 2, ubiquitär in den Geweben verbreitet (Neumar et al., 2003). Calpain ist als inaktives Proenzym im Cytoplasma lokalisiert und wird in Gegenwart von hohen Calciumkonzentrationen aktiviert. Der Unterschied in den beiden Calpainformen liegt in der zu ihrer Aktivierung benötigten Calciumkonzentration,  $\sim 1\text{-}80\ \mu\text{M}$  für Calpain 1 und  $\sim 200\ \mu\text{M}$  für Calpain 2. Beide sind heterodimere Proteine, die eine große katalytische Untereinheit und eine kleine regulatorische Untereinheit aufweisen (Aoki et al., 1986; Imajoh et al., 1988). Wenn Calpain aktiv ist, kann es mit einer Vielzahl an Substraten interagieren, einschließlich cytoskelettalen Proteinen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Mitochondrien, Aktin-bindenden Proteinen, Tubulin, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen und regulatorischen Proteinen (Camins et al., 2006).

Eine Dysregulation der Calcium Homeostase mit daraus resultierender Fehlsteuerung der Calcium-abhängigen Enzyme kann demnach zu schwerwiegenden Fehlern in der Zelle führen, die schließlich in dem Zelltod von Neuronen, dem Beginn der Neurodegeneration enden (Khachaturian, 1989; Mattson et al., 2000).

## 1.5 Zellzyklus

Der Zellzyklus teilt sich in vier aufeinander folgende Phasen, die als G1-, S-, G2- und M-Phase bezeichnet werden (**Abb. 5**). In der S-Phase (Synthese-Phase) findet die Replikation des Genoms statt, die 10 bis 12 Stunden dauert, während in der M-Phase (Mitose-Phase) nach der Chromosomenteilung die eigentliche Mitose erfolgt, die weniger als eine Stunde benötigt. Die beiden G-Phasen (Gap - Lücke) dienen als Kontrollelemente, währenddessen die Integrität der Zelle überprüft wird. An den Kontrollpunkten (*Checkpoints*) innerhalb der G-Phasen kann der Zyklus gestoppt werden, sollte die Zelle Beschädigungen aufweisen (Elledge, 1996). Am Ende der G1-Phase werden die Bedingungen wie der Zustand der Zelle, ATP-Versorgung und Wachstumsfaktoren geprüft. Ist alles in Ordnung, erfolgt der Übergang in die S-Phase. In der G2-Phase wird der Zyklus erneut angehalten und die DNA Replikation überprüft. Sollte die Replikation Fehler aufweisen, werden diese behoben bevor die Zelle sich schließlich in der M-Phase teilt. Terminal differenzierte Zellen, die eine bestimmte Aufgabe innerhalb des Organismus wahrnehmen, verbleiben in der G1-Phase, die dann als G0-Phase

bezeichnet wird. Zu diesen Zellen zählen beispielsweise Neuronen, Muskelzellen oder Erythrocyten. Einige Zelltypen verbleiben nach ihrer Differenzierung für Wochen oder Monate in der G<sub>0</sub>-Phase, können aber dann wieder in die G<sub>1</sub>-Phase zurückkehren und sich teilen, wie beispielsweise Hepatocyten oder Lymphocyten. Durch mitogene Signale, die nur in der G<sub>0</sub> und G<sub>1</sub>-Phase wirken (Tessema et al., 2004), können die differenzierten Zellen diese verlassen und wieder in den Zyklus eintreten (Malumbres and Barbacid, 2001).



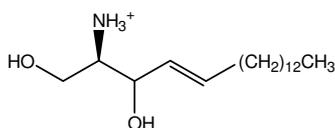
**Abb. 5: schematische Darstellung des Zellzyklus mit den für jede Phase typischen CDKs und Cyclinen.** Durch mitogene Signale kann eine Zelle die ruhende G<sub>0</sub>-Phase verlassen und wieder in die G<sub>1</sub>-Phase eintreten. Modifiziert nach (Tessema et al., 2004).

Das wichtigste Kontrollelement des Zellzyklus stellen die Cyclin abhängigen Kinasen (CDK) dar, die durch ihre regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, in den einzelnen Phasen aktiviert werden. Jede Phase besitzt eine spezifische Zusammensetzung an Cyclinen und dazugehörenden CDKs (Morgan, 1997).

In der G<sub>0</sub> und G<sub>1</sub>-Phase ist die Aktivität aller CDKs wegen spezifischer Inhibitoren (CDK-Inhibitor = CKI) und geringem Cyclingehalt niedrig (Sherr, 2000). Wachstumssignale, die nun die Zelle erreichen, bewirken eine Steigerung der Cyclin D1 Konzentration, welches an CDK 4 und 6 bindet (Vermeulen et al., 2003). Nach zusätzlicher Phosphorylierung durch die CAK (CDK activating kinase) ist das CDK 4/6-Cyclin D1 Holoenzym vollständig aktiv und aktiviert den für die DNA Replikation essentiellen Transkriptionsfaktor E2F. E2F wird in der G<sub>0</sub>-Phase durch seinen Inhibitor, das Retinoblastoma Protein (Rb) gebunden und an einer Interaktion mit der DNA gehindert. Rb wird durch das CDK 4/6-Cyclin D1 Holoenzym phosphoryliert und dissoziiert von E2F ab, so dass dieser nun die Transkription und letztendlich Expression weiterer Proteine für ein Fortlaufen des Zyklus induzieren kann (Sherr and Roberts, 1999).

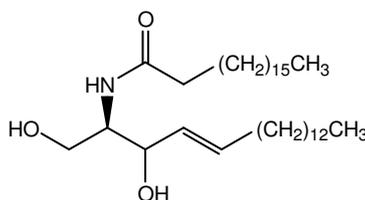
## 1.6 Sphingolipide

J. L. W. Thudichum entdeckte im Jahr 1884 die Sphingolipide (SL) als er die chemische Zusammensetzung des Gehirns untersuchte. Heute sind die SL als wichtige Komponenten der Nervenzellen und Bestandteile aller Zellmembranen identifiziert. Die von Thudichum gefundenen Lipide enthielten eine saure, eine basische und eine Zuckerkomponente. Aufgrund der rätselhaften Eigenschaften der Base nannte er diese „Sphingosin“, nach der Sphinx aus der griechischen Mythologie. Sphingosin, ein ungesättigter Aminoalkohol, (**Abb. 6**) bildet das Rückgrat der Sphingolipide (SL).



**Abb. 6: Sphingosin.** Die Aminogruppe kann sauer oder basisch reagieren

Ceramid bildet den hydrophoben Membrananker der SL (**Abb. 7**). Es wird durch die N-Acylierung von Sphingosin gebildet.



**Abb. 7: Ceramid.**

Je nachdem welche Kopfgruppe an die terminale Hydroxylgruppe des Ceramids gebunden ist, lassen sich die SL in Glycosphingolipide (GSL) und Phosphosphingolipide (PSL) einteilen. Erstere lassen sich in die neutralen GSL, die nur ungeladene Zuckermoleküle besitzen (Cerebroside) und die sauren GSL, welche die Sulfatide und Ganglioside umfassen unterteilen. Sulfatide enthalten mindestens eine Sulfatgruppe, während Ganglioside eine oder mehrere N-Acetylneuraminsäuren (NANA) aufweisen. Dagegen besitzen PSL den Glycerophospholipiden ähnliche Kopfgruppen, wie Phosphat, Phosphorylethanolamin oder Phosphorylcholin (letzteres im Falle des weit verbreiteten Sphingomyelin).

Sphingolipide kommen in allen eukaryotischen Geweben vor. Die komplexen Ganglioside bilden charakteristische Oberflächenstrukturen auf der äußeren Plasmamembran. Das

neuronale Profil der Ganglioside variiert in den einzelnen Hirnregionen und verändert sich während der Differenzierung und Entwicklung der Zellen (Kracun et al., 1992; Hirschberg et al., 1996) sowie unter onkogenen oder viralen Einflüssen (Marconi et al., 2005).

Sphingolipide wurden lange ausschließlich als Membranbausteine angesehen, doch dieses Bild hat sich stark gewandelt. Mittlerweile ist die Beteiligung der SL an vielen zellulären Prozessen bekannt, einschließlich Proliferation, Differenzierung, Inflammation und Apoptose. Der komplexe Stoffwechsel der Sphingolipide ist streng reguliert, da einige metabolische Zwischenprodukte wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P), Ceramid-1-Phosphat (C1P), Sphingosin und Glucosylceramid (GlcCer) biologisch aktiv sind.

### **1.6.1 Stoffwechsel der Sphingolipide**

Die Synthese der SL beginnt mit der Kondensation von Palmitoyl-CoA und L-Serin zu 3-Ketosphinganin an der cytosolischen Seite des ER katalysiert durch das PLP (Pyridoxalphosphat) abhängige Enzym Serin-Palmitoyltransferase (SPT) (**Abb. 8**). Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der *de novo* Synthese dar (Mandon et al., 1992).

Das entstandene 3-Ketosphinganin wird anschließend in einer NADPH-abhängigen Reaktion zu D-erythro-Sphinganin reduziert. Danach acylieren (Dihydro) Ceramid-Synthasen Sphingosin zu Dihydroceramid, welches durch die Insertion einer 4,5-trans-Doppelbindung mittels der Dihydroceramid-Desaturase zu Ceramid wird (Rother et al., 1992; Michel et al., 1997).

Ceramid bildet das Zentrum des SL Stoffwechsels. Ausgehend von Ceramid werden die komplexen SL sowie Sphingomyelin und Ceramid-1-Phosphat (C1P) synthetisiert (van Echten-Deckert and Herget, 2006).

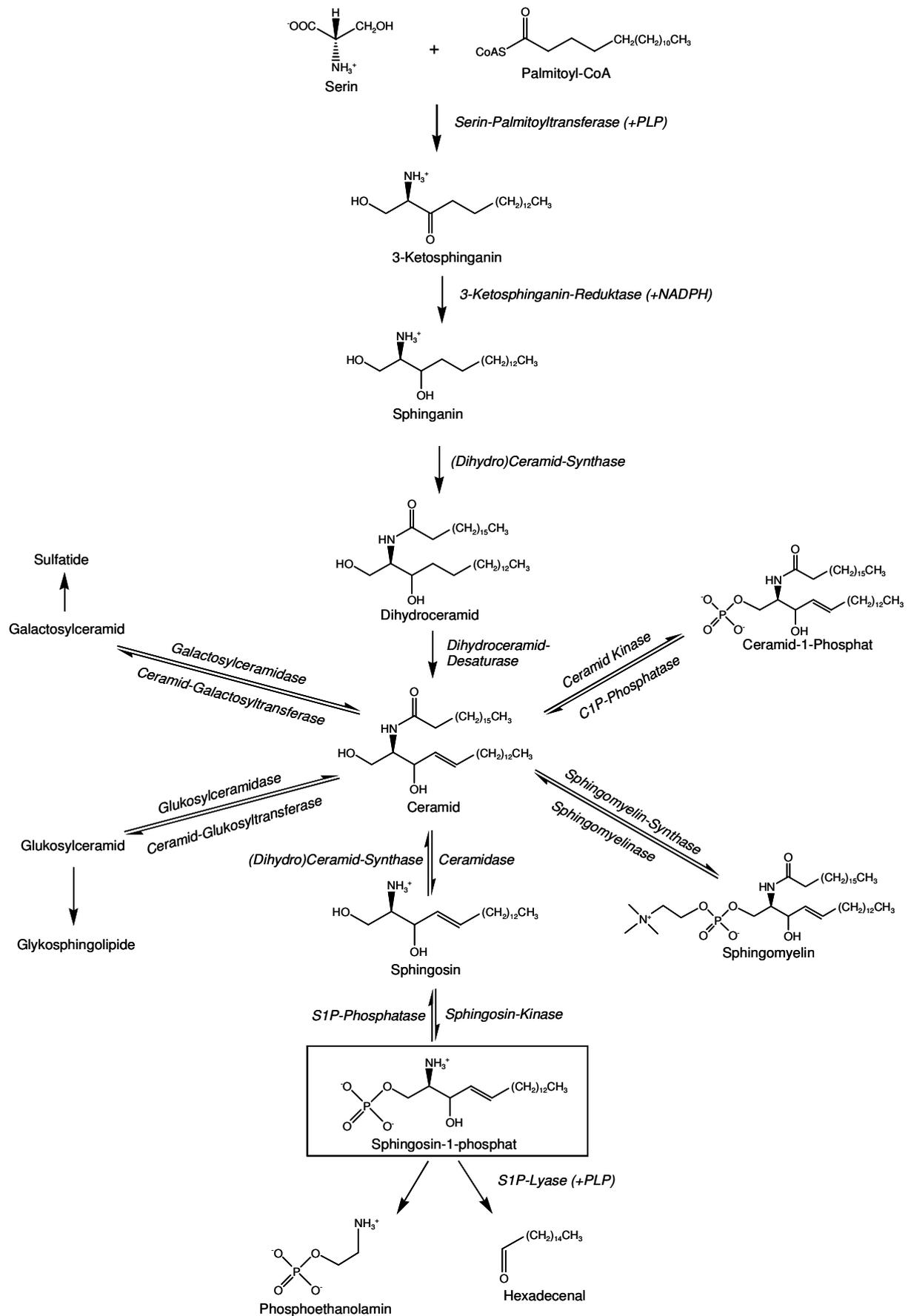
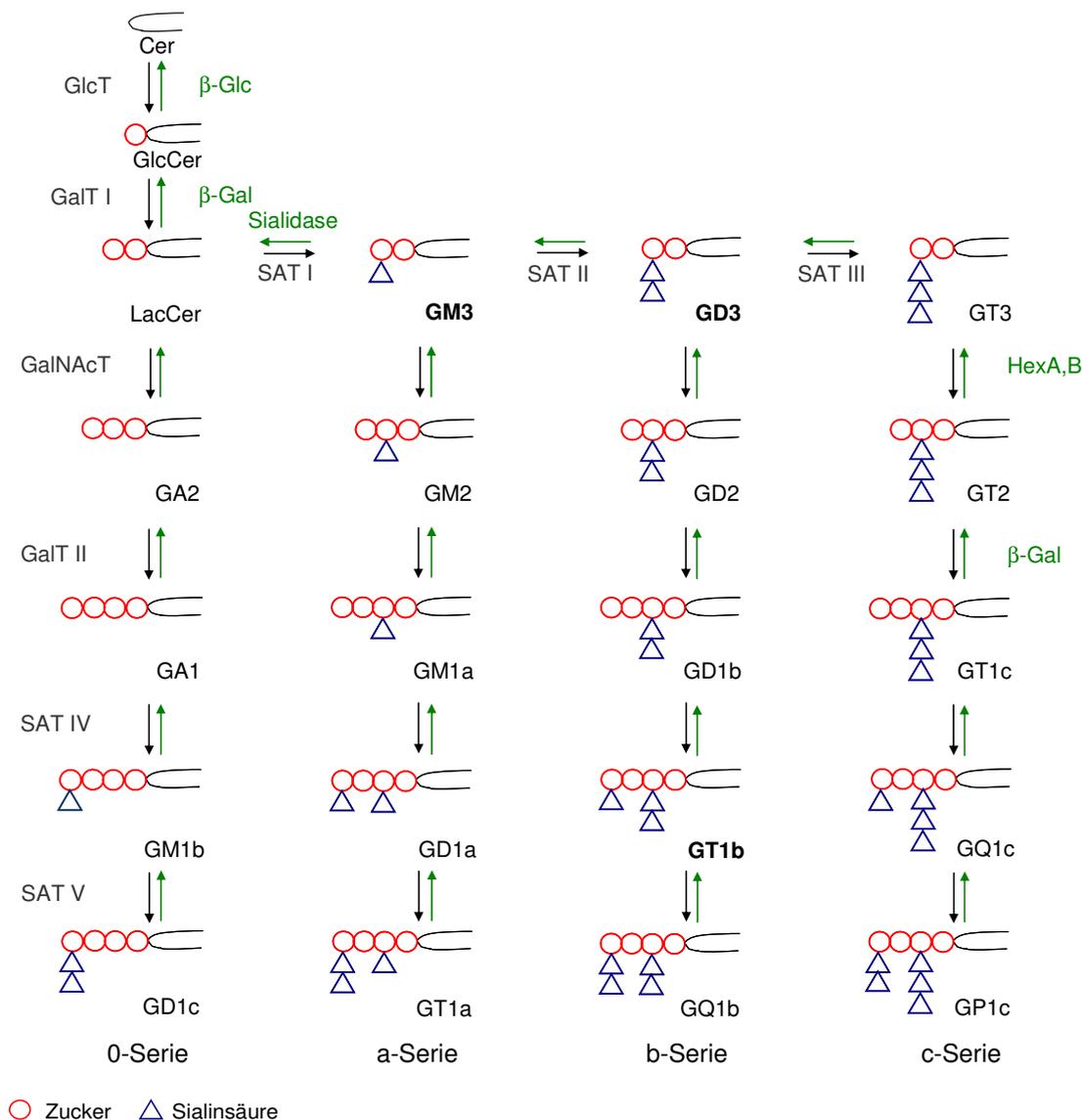


Abb. 8: Metabolismus der Sphingolipide. Modifiziert nach (Ogretmen and Hannun, 2004)

Komplexe SL wie die Glycosphingolipide entstehen aus Glucosylceramid (GlcCer), welches durch den direkten Transfer eines Zuckers von UDP-Glucose auf Ceramid gebildet wird. GlcCer dient als Vorläufer von Lactosylceramid (LacCer), aus dem durch Anhängen von 1 bis 3 Sialinsäuren und Monosacchariden die Ganglioside entstehen (van Echten-Deckert and Herget, 2006) (**Abb. 9**). Die Synthese der Ganglioside erfolgt an der luminalen Seite des Golgi, die der Außenseite der Plasmamembran entspricht. LacCer und seine vier Sialinsäurehaltigen Derivate sind die Vorläufer für die vier Gangliosid-Serien, 0, a, b und c. Die Unterschiede zwischen den Serien beruhen auf der Anzahl an Sialinsäuren, die an die innere Galaktose gebunden sind. Im menschlichen Gehirn sind hauptsächlich die Ganglioside der a- und b-Serie zu finden, wohingegen bei Fischen und Reptilien die 0- und c-Serie vorherrschen (Greis and Rosner, 1990).

Ebenfalls auf der Außenseite der Plasmamembran befindet sich Sphingomyelin (SM), welches durch den Transfer von Phosphocholin, der wasserlöslichen Kopfgruppe von Phosphatidylcholin, auf Ceramid synthetisiert wird (**Abb. 8**) (Ramstedt and Slotte, 2002). Direkt aus Ceramid entsteht mittels Phosphorylierung das bioaktive Ceramid-1-Phosphat (C1P), welches in einigen Immunzellen (Makrophagen, Mastzellen) an Phagocytose und Degranulation beteiligt ist (Hinkovska-Galcheva et al., 1998; Mitsutake et al., 2004).

Der Abbau der SL erfolgt hauptsächlich in lysosomalen Kompartimenten durch verschiedene Hydrolasen, die die Kopfgruppen der komplexen SL abbauen, welche so wieder zu Ceramid werden (**Abb. 8** und **Abb. 9**) (Hannun et al., 2001). Mehr als zehn verschiedene solcher Hydrolasen und deren Aktivatorproteine, die SAPs (Sphingolipid activator protein), sind bisher bekannt und der Verlust von nur einem der beiden resultiert in einer starken Akkumulation des entsprechenden Lipids in dem lysosomalen Kompartiment, was schließlich zu Sphingolipid-Speicherkrankheiten führt (Jeyakumar et al., 2005).



**Abb. 9: Metabolismus der Ganglioside.** Ausgehend von Ceramid werden die Ganglioside durch das Anhängen von Zuckern (1. Glucose, 2. Galaktose, 3. N-Acetylgalactosamin, 4. Galaktose) und Sialinsäure gebildet. Cer – Ceramid, GlcCer – Glucosylceramid, LacCer – Lactosylceramid, GlcT – Ceramid-Glucosyltransferase, GalT I bzw. II – Galactosyltransferase I bzw. II, GalNAcT – N-Acetyl-Galactosaminyltransferase, SAT – Sialyltransferase. Terminologie der Ganglioside nach Svennerholm (Svennerholm, 1994).

SM wird durch Abspaltung des Phosphocholins durch Sphingomyelinasen zu Ceramid (van Echten-Deckert and Herget, 2006). Ceramid wird dann mittels verschiedener Ceramidasen zu Sphingosin hydrolysiert (Hassler and Bell, 1993). Die Ceramidasen kommen in verschiedenen Isoformen vor, die in ihrem pH Optimum und ihrer Lokalisation in der Zelle variieren. Es wurden bisher drei verschiedene Ceramidasen beschrieben: eine membrangebundene, eine cytoplasmatische und eine lysosomale, wobei letztere aufgrund ihres sauren pH-Optimums von 4 auch saure Ceramidase (Acid Ceramidase = A-Ceramidase) genannt wird.

Sphingosin kann entweder wieder zu Ceramid acyliert oder von einer Sphingosin-Kinase (SK) zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert werden (Hannun et al., 2001). Bisher

wurden zwei Isoformen der SK genauer beschrieben: SK1 und SK2, die sich sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer subzellulären Lokalisation, sowie in ihrer Gewebe- und Entwicklungs-spezifischen Expression unterscheiden (Liu et al., 2000). Die SK1 ist ein cytosolisches Enzym und wird nach Aktivierung mittels Phosphorylierung zur Plasmamembran rekrutiert, während die SK2 am ER aktiv ist (Liu et al., 2003; Maceyka et al., 2005). Die SK1, deren Aktivität mit Zellwachstum und Überleben assoziiert ist, wird in Tumoren häufig überexprimiert (Olivera et al., 1999; Xia et al., 2002), indessen wird die SK2 im Gegensatz zu ihrem besser erforschtem Isoenzym mit Wachstums-Suppression und Apoptose in Verbindung gebracht (Igarashi et al., 2003; Liu et al., 2003).

Der Abbau von S1P erfolgt entweder mittels reversibler Dephosphorylierung zu Sphingosin oder mittels irreversibler Spaltung in Hexadecenal und Phosphoethanolamin durch die S1P-Lyase (SPL), ein ER-gebundenes Enzym (Van Veldhoven et al., 2000). Diese Reaktion verläuft schnell, so dass die Menge an S1P in der Zelle gering gehalten wird. Hexadecenal kann weiter zu Fettsäuren oxidiert werden, während Phosphoethanolamin für die Synthese von Phosphatidylethanolamin verwendet werden kann und so in den Glycerolipid-Stoffwechsel wechselt (Merrill, 1996).

## **1.6.2 Sphingolipide als Signalmoleküle**

Ceramid, Sphingosin und S1P können vergleichsweise schnell ineinander umgewandelt werden, was nicht nur wegen ihrer Funktion als Signalmoleküle wichtig ist, sondern auch wegen ihres unterschiedlichen Einflusses auf Überleben und Zellwachstum. Das langlebige Ceramid sowie Sphingosin sind wichtige Regulatoren der zellulären Stressantwort, die in den meisten Zelltypen Wachstumsstop und Apoptose auslösen (Hannun and Obeid, 2008), wohingegen das kurzlebige S1P in den meisten Zelltypen Apoptose hemmt und Proliferation fördert (Spiegel and Milstien, 2003).

### **1.6.2.1 Ceramid**

Ceramid ist nicht nur an der zellulären Stressantwort, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose beteiligt, sondern auch an Neurodegeneration, Inflammation, Tumorbildung und Infektionen (Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Luberto et al., 2002; Ruvolo, 2003). In neuronalen Zellen wurden ebenfalls viele Funktionen von Ceramid gefunden, die teilweise vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig sind (Herget et al., 2000; Luberto et al., 2002; Buccoliero and Futerman, 2003).

### 1.6.2.2 S1P

S1P wirkt in den meisten Zelltypen als Ceramid Antagonist und arbeitet der Ceramid induzierten Apoptose entgegen (Cuvillier et al., 1996). Wie Ceramid reguliert auch S1P eine Vielzahl physiologischer Prozesse, unter anderem Proliferation, Differenzierung, Mobilität, den Aufbau des Cytoskeletts und die Calcium Homeostase (Pyne and Pyne, 2000; Spiegel and Milstien, 2003)

S1P kann intrazellulär als *second messenger* und extrazellulär als Ligand für eine Familie von fünf G-Protein gekoppelten Rezeptoren, S1P<sub>1-5</sub>, wirken (Spiegel and Milstien, 2000; Taha et al., 2006). Die S1P Rezeptoren sind an verschiedene G-Proteine gekoppelt: S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>4</sub> sind mit G<sub>i</sub> verbunden, während S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> und G<sub>12/13</sub> aktivieren und S1P<sub>5</sub> mit G<sub>i</sub> und G<sub>12/13</sub> gekoppelt ist. Vor allem S1P<sub>1-3</sub> sind weit verbreitet und kommen oft gemeinsam auf einem Zelltyp vor (Fukushima et al., 2001). S1P<sub>4</sub> findet sich hauptsächlich im Lymphgewebe, während S1P<sub>5</sub> in der Entwicklung des zentralen Nervensystems sowie der Haut eine wichtige Rolle spielt (MacLennan et al., 1997; Kluk and Hla, 2002). Obwohl viele Effekte von S1P auf dessen Interaktion mit seinen Rezeptoren beruhen, gibt es zunehmend experimentelle Hinweise auf intrazelluläre Wirkungen. Die intrazellulären Zielmoleküle von S1P sind allerdings noch nicht vollständig identifiziert (Spiegel and Milstien, 2003; Milstien et al., 2007).

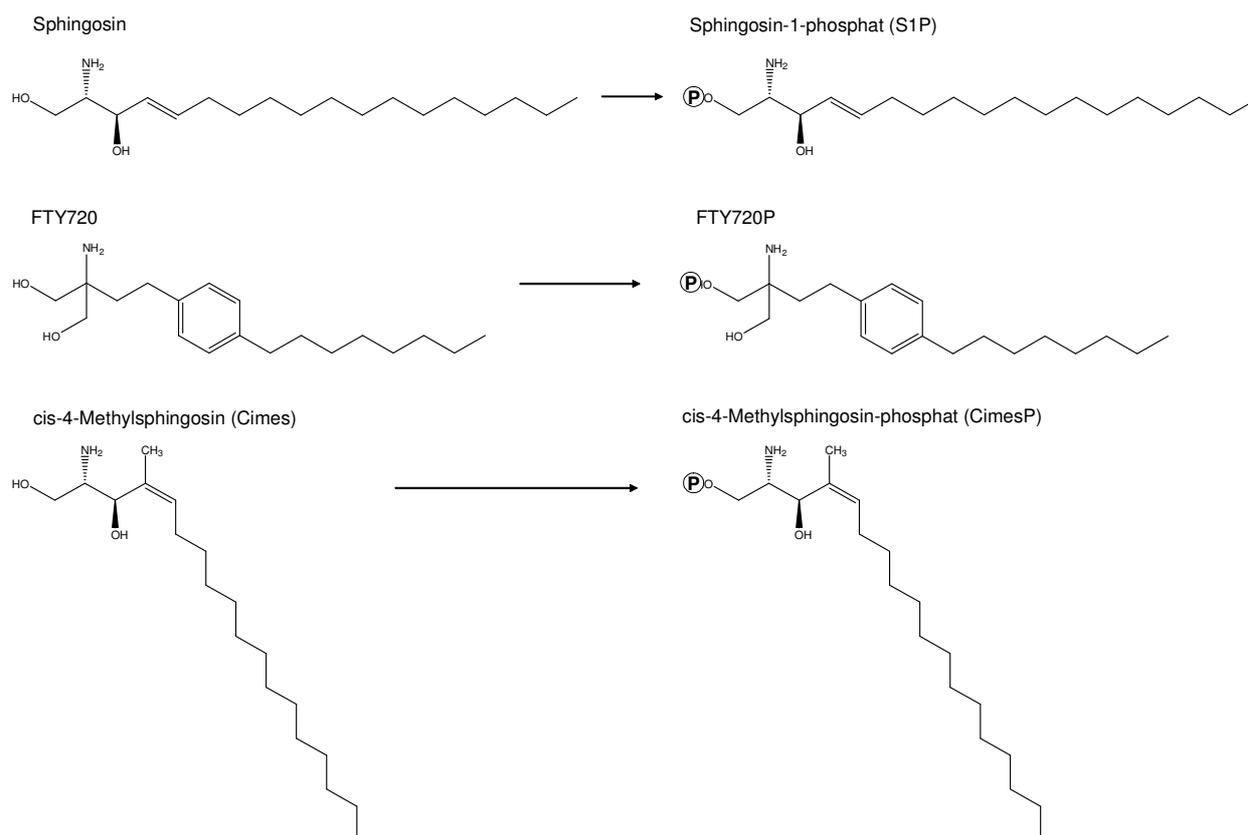
In Nervenzellen stellt sich die Situation komplexer dar und die Wirkung von S1P wird von vielen Faktoren beeinflusst. Die Vielfalt der Neuronen sowie deren Entwicklungsgrad sind von enormer Bedeutung für die von S1P hervorgerufenen Effekte. Beispielsweise induziert S1P in neuronalen Vorläuferzellen Proliferation (Harada et al., 2004), führt aber in terminal differenzierten Hippocampusneuronen zu Apoptose (Moore et al., 1999). Neuronen scheinen zudem die Verstoffwechslung von exogenem Sphingosin zu Ceramid und komplexen GSL einer Phosphorylierung zu S1P vorzuziehen, denn der größte Anteil von ins Kulturmedium gegebenem Sphingosin wird zu Ceramid acyliert und nicht zu S1P phosphoryliert (van Echten et al., 1990; Riboni et al., 1999).

### 1.6.3 Sphingosin Analoga

Analoga von Sphingosin werden zur Erforschung der physiologischen Wirkung von Sphingosin und S1P verwendet. Das bekannteste Analogon ist sicherlich FTY720 (**Abb. 10**, Mitte), auch Fingolimod genannt, ein Metabolit des Pilzes *Isaria scinclarii* (Fujita et al., 1994). FTY720 ist ein Immunsupressor, der gegenwärtig in einer klinischen Testphase

bei Organtransplantationen und Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose eingesetzt wird (Comi et al., 2010; Rammohan and Shoemaker, 2010). FTY720 wird in vivo von der SK2 zu FTY720P phosphoryliert, einem Analogon von S1P (Billich et al., 2003; Kharel et al., 2005). FTY720P bindet an die S1P-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 und induziert durch die Internalisierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors eine Lymphopenie, da die Lymphozyten in den Lymphorganen bleiben (Pinschewer et al., 2000; Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002).

Ein weiteres Analogon von Sphingosin ist cis-4-Methylsphingosin (Cimes) welches von den Zellen aufgenommen und ebenso wie FTY720 intrazellulär phosphoryliert wird (Abb. 10, unten) (van Echten-Deckert et al., 1997). Das phosphorylierte CimesP akkumuliert in den Zellen, da es weder zum entsprechenden Ceramid acyliert noch von der S1P-Lyase gespalten werden kann (van Echten-Deckert et al., 1997). Die aktive Komponente ist hierbei das phosphorylierte CimesP.



**Abb. 10: Sphingosin, FTY720 und Cimes (cis-4-Methylsphingosin).** Cimes besitzt im Gegensatz zu Sphingosin eine *cis* anstelle einer *trans* Doppelbindung sowie eine Methylgruppe an C4.

Die Wirkung von CimesP ist wie die Wirkung von S1P abhängig vom Zelltyp. In Swiss 3T3 Fibroblasten induzierte Cimes ebenso wie S1P Proliferation (Zhang et al., 1991; van Echten-

Deckert et al., 1998), allerdings führte Cimes in Neuroblastomazellen und in terminal differenzierten Neuronen zu Apoptose (Natzker et al., 2002; Naetzker et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass weder S1P noch Sphingosin in ausdifferenzierten Neuronen apoptotisch wirkten, wurde vermutet, dass sich CimesP in den Zellen ansammelt. Diese Annahme beruhte auf vorherigen Experimenten, die zeigten, dass der physiologische Effekt – Apoptose bei Cimes, Überleben bei S1P – von der Akkumulation abhing (Naetzker et al., 2006). Beide Sphingoid-Phosphate beeinflussten dieselben Signalwege, doch waren die Auswirkungen bei Cimes stärker und dauerten länger an als die Effekte des schnell von der SPL abgebauten S1Ps (Naetzker et al., 2006). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde siRNA (small interfering RNA) zum knock down der SPL verwendet. Doch auch eine Verringerung der SPL mRNA um 70% führte nicht zu einer Akkumulation von S1P in den Neuronen (Brachtendorf, 2005).

## **1.7 Zielsetzung**

Obwohl S1P üblicherweise Proliferation fördert, kann es in Neuronen toxisch wirken.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die dem Sphingoidphosphat induzierten neuronalen Zelltod zugrunde liegen.

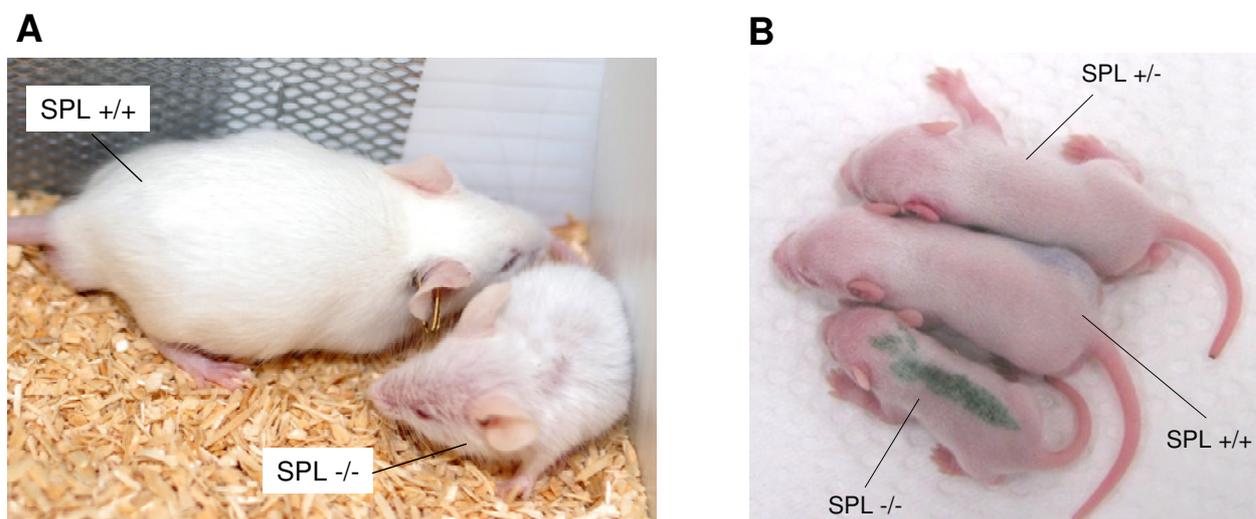
Zur Bearbeitung dieser Fragestellung standen einerseits S1P-Lyase defiziente Mäuse und andererseits das synthetische Sphingosin-Analogon Cimes (cis-4-Methylsphingosin) zur Verfügung. Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, wird Cimes intrazellulär zu CimesP (cis-4-Methylsphingosin-Phosphat) phosphoryliert und induziert Apoptose in terminal differenzierten Neuronen. Zunächst sollten die S1P-Lyase-defizienten Mäuse charakterisiert und die Veränderungen im neuronalen (Sphingo-)Lipidmetabolismus untersucht werden. Danach sollte festgestellt werden, inwieweit die Effekte von Cimes in Wildtyp Zellen denen von S1P in S1P-Lyase-defizienten Neuronen entsprechen. Schlussendlich sollte die Sphingoidphosphat induzierte Signalkaskade identifiziert werden, die dem neuronalen Zelltod zugrunde liegt.

## 2 Ergebnisse

Als Modellsysteme zur Identifikation der Sphingoidphosphat induzierten Signalwege dienten primäre Neuronen aus Wildtyp Mäusen, die mit dem synthetischen Sphingosin Analogon Cimes behandelt wurden sowie Neuronen aus S1P-Lyase-defizienten Mäusen, denen S1P zugegeben wurde.

### 2.1 S1P-Lyase-defizienten Mäuse

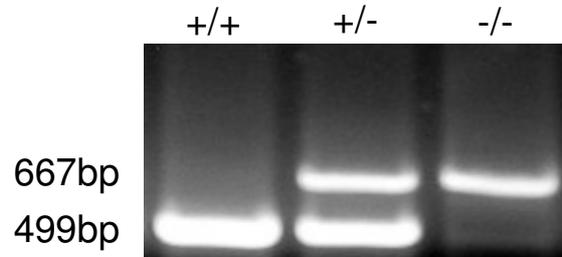
S1P-Lyase (SPL) defiziente Mäuse (*sgpl* *-/-*) zeigten einen unerwartet komplexen Phänotyp, der sich rein äußerlich in einem verzögerten Wachstum, einem struppigen, dünnen Fell und einer geringfügig gestauchten Kopfform äußerte (**Abb. 11**). Des Weiteren wiesen die SPL-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen und heterozygoten Tieren eine geringe Lebenserwartung auf, die im Mittel 6 Wochen betrug. Eine Steigerung der Lebenserwartung auf 8 bis 9 Wochen wurde durch Belassen der SPL-defizienten Mäuse bei deren Elterntieren erreicht, doch traten in dieser Zeit weder eine Schwangerschaft noch andere Anzeichen einer Geschlechtsreife in den SPL-defizienten Tieren auf.



**Abb. 11: S1P-Lyase (SPL) defiziente Mäuse. A:** 8 Wochen alte Geschwister, wildtyp (SPL+/+) und SPL-defizient (SPL-/-). **B:** 6 Tage alte Geschwister, wildtyp (SPL+/+), heterozygot (SPL+/-) und SPL-defizient (SPL-/-).

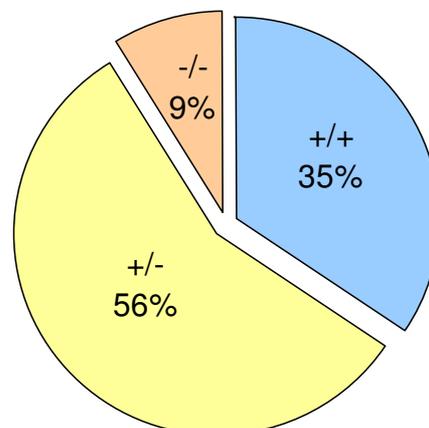
Die Zucht erfolgte wegen der nicht eintretenden Geschlechtsreife der SPL-defizienten Mäuse durch die Verpaarung heterozygoter Tiere. Um den Genotyp des Nachwuchses bestimmen zu können, wurden die Jungtiere 5 Tage nach der Geburt mit Edding markiert (**Abb. 11B**) und

Biopsien von den Schwanzspitzen verwendet. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR, bei der die Wildtypen ein 499 Basenpaar (bp) großes Fragment der S1P-Lyase amplifizierten und die SPL-defizienten Tiere ein 667 bp großes Produkt, welches die  $\beta$ -Galactosidase als Kontrolle für die erfolgreiche Deletion des *sgpl1* Gens anzeigte. Bei den heterozygoten Tieren erschienen beide Banden (**Abb. 12**).



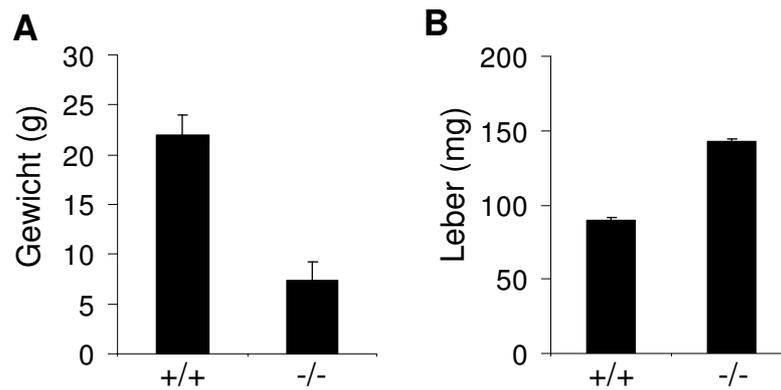
**Abb. 12: Resultat der Genotypisierungs PCR.** Bei der PCR mit zwei verschiedenen Oligonukleotiden wird im Falle des Wildtyps (+/+) ein 499bp großes Produkt, welches die S1P-Lyase anzeigt gebildet. Bei heterozygoten (+/-) und SPL-defizienten (-/-) Tieren wird die 667bp große  $\beta$ -Galaktosidase Bande amplifiziert.

Die Vererbung der SPL-Defizienz unterlag nicht den Regeln nach Mendel, nach denen die Nachkommen im Verhältnis 1:2:1 (wildtyp / heterozygot / homozygot defizient) geboren werden. Von allen genotypisierten Mäusen wiesen nur 9% eine SPL-Defizienz auf, während über die Hälfte der Jungtiere, 56%, heterozygot und über ein Drittel, 35%, Wildtypen waren (**Abb. 13**).



**Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Genotypen in Würfen von *sgpl* heterozygoten Tieren.** Die Verteilung der Genotypen erfolgt nicht nach den Mendelschen Regeln. Von den genotypisierten Tieren waren 35% Wildtypen (+/+, blau), 56% heterozygot (+/-, gelb) und 9% SPL-defizient (-/-, rot).

Weitere Untersuchungen an den SPL-defizienten Mäusen ergaben ein deutlich verringertes Gewicht der 8 Wochen alten Tiere (**Abb. 14A**). Bemerkenswert waren zudem das vollständige Fehlen von Fettgewebe sowie die stark vergrößerte Leber, die bereits in einem Alter von 6 Tagen auftrat (**Abb. 14B**).



**Abb. 14: SPL-defiziente Mäuse weisen ein geringes Gewicht und eine vergrößerte Leber auf.** **A:** Vergleich des Körpergewichts 8 Wochen alter wildtyp (+/+) und SPL-defizienter (-/-) Mäuse. **B:** Vergleich des Lebergewichtes sechs Tage alter wildtyp (+/+) und SPL-defizienter (-/-) Jungtiere. (n = 5)

Neben den physiologischen Unterschieden traten auch Veränderungen im Verhalten auf. Die Motorik der SPL-defizienten Mäuse war im Vergleich zu den Wildtypen und heterozygoten Tieren unbeholfen. Während Wildtyp und heterozygote sechs Tage alte Mäuse auf Fingerbewegung vor ihrem Kopf mit Schnüffeln und Kopfdrehen reagierten, zeigten die SPL-defizienten Tiere keine Reaktion und wirkten beinahe apathisch.

## 2.2 Lipidanalysen – Anstieg von S1P und Sphingosin in den SPL-defizienten Neuronen

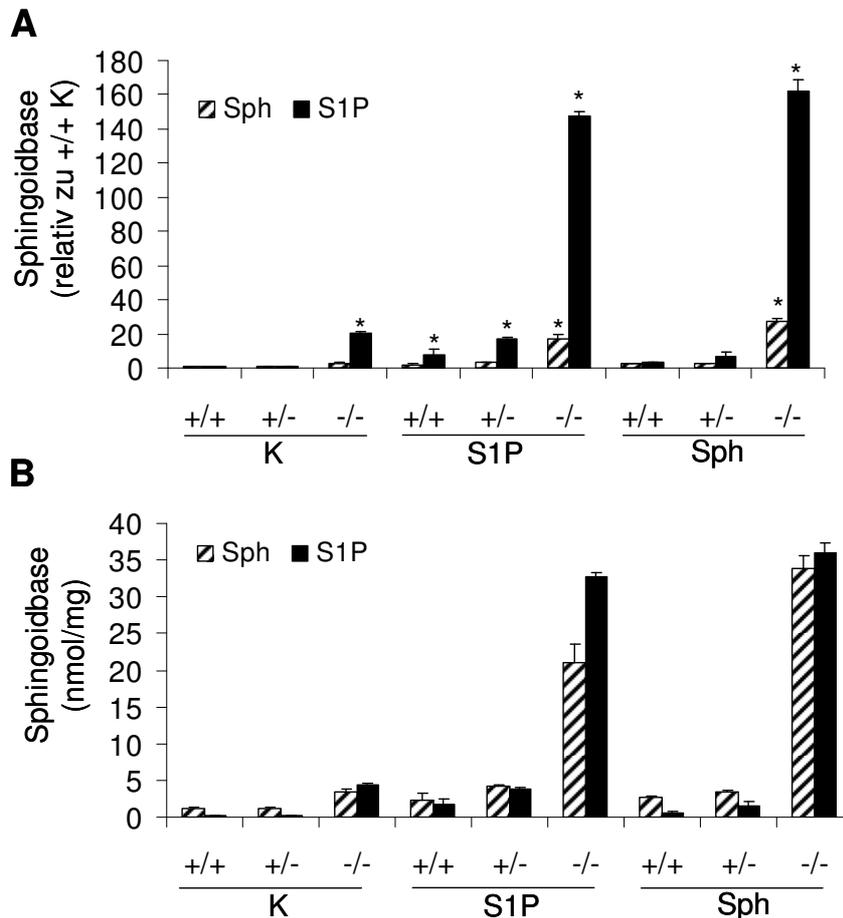
Um zu klären, wie sich das Ausschalten der SPL auf den Gehalt an intrazellulären Sphingolipiden auswirkt, wurde die Menge an bioaktiven Sphingolipiden, einschließlich S1P, Sphingosin und Ceramid, sowie an Hexosylceramid und Sphingomyelin mittels Massenspektrometrie (ESI/MS/MS) in Kooperation mit Prof. A. H. Merrill, Jr. (USA) analysiert.

### 2.2.1 Analyse der Sphingoidbasen

Zunächst wurde die Menge an intrazellulärem S1P und Sphingosin in den SPL-defizienten Mäusen mittels Massenspektrometrie analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von exogenem S1P bzw. Sphingosin auf den Gehalt an endogenen S1P und Sphingosin ermittelt. Hierzu wurden Neuronen aus sechs Tage alten wildtyp, heterozygoten und SPL-defizienten Mäusen präpariert und fünf Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit Lösungsmittel (Methanol) als Kontrolle, 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin inkubiert und

nach Ablauf dieser Zeit gemäß den Vorgaben für die massenspektrometrische Analyse geerntet.

Wie zu erwarten war, stieg der Gehalt an S1P in SPL-defizienten Neuronen verglichen mit den Wildtypen stark, ca. 20fach, an (**Abb. 15A**). Diese Erhöhung nahm weiter zu (~ 150fach), wenn S1P bzw. Sphingosin zu den Zellen gegeben wurde.

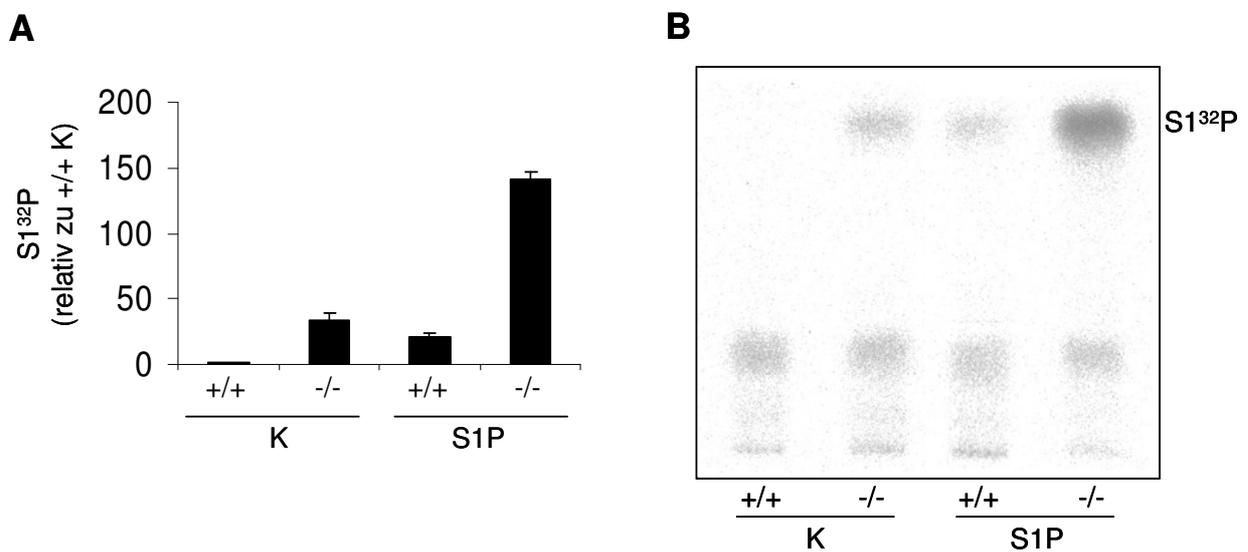


**Abb. 15: Anstieg von Sphingosin und S1P in Neuronen von SPL-defizienten Mäusen.** Neuronen aus Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Sphingolipide extrahiert und mittels electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI/MS/MS) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle (A) oder sind als absolute Werte in nmol/mg Zellprotein (B) angegeben. \* signifikant verschieden von +/+ K ( $p < 0,05$ ).

In Gegenwart von S1P stieg der S1P Gehalt auch in den wildtyp und heterozygoten Neuronen an (~ 7fach bzw. ~20fach). Die Erhöhung der intrazellulären S1P Konzentration wurde von einem leichten Anstieg des Sphingosins begleitet, die in SPL-defizienten Neuronen 10fach und in heterozygoten Neuronen 5fach höher war als in den Wildtypen. Zudem war die Menge an Sphingosin in den SPL-defizienten Neuronen erhöht, so dass nahezu die gleichen Mengen an freiem bzw. phosphoryliertem Sphingosin in den Zellen vorhanden waren (~ 4,5 nmol/mg) (**Abb. 15B**). Obwohl auch Sphingosin in SPL-defizienten Neuronen nach der Zugabe von

Sphingosin bzw. S1P stark anstieg (20 nmol/mg bzw. 33 nmol/mg), blieb es doch unter dem S1P Gehalt, der mehr als 33 nmol/mg bzw. 35 nmol/mg erreichte (**Abb. 15B**). Zu bedenken ist dabei stets, dass Sphingosin in höheren Konzentrationen als S1P vorliegt und bereits kleine Änderungen in der S1P Menge eine starke Verschiebung des Gleichgewichts verursachen (Hannun and Obeid, 2008).

Die mittels Massenspektrometrie detektierte S1P Akkumulation in SPL-defizienten Neuronen konnte mit Hilfe von radioaktiver Phosphatmarkierung bestätigt werden (**Abb. 16**). Das radioaktive anorganische Phosphat wird in ATP (Adenosintriphosphat) eingebaut und ermöglicht somit die Markierung von phosphorylierten Molekülen.  $S^{132}P$  lässt sich daher nach erfolgter Extraktion und Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) autoradiographisch gut nachweisen (**Abb. 16B**). Bemerkenswert ist, dass in den unbehandelten Wildtyp Kontrollen kein S1P detektiert werden konnte, was den geringen Anteil von S1P an den Sphingolipiden in der Zelle verdeutlicht. Dagegen stieg in den SPL-defizienten unbehandelten Neuronen bereits nach 1 h die Menge an S1P um ~ 40% an (**Abb.16A**). In den Wildtypen wurde S1P erst nachweisbar, als dieses für 1 h in das Kulturmedium gegeben wurde, wohingegen dieselbe Behandlung in den SPL-defizienten Zellen eine starke Akkumulation zur Folge hatte.

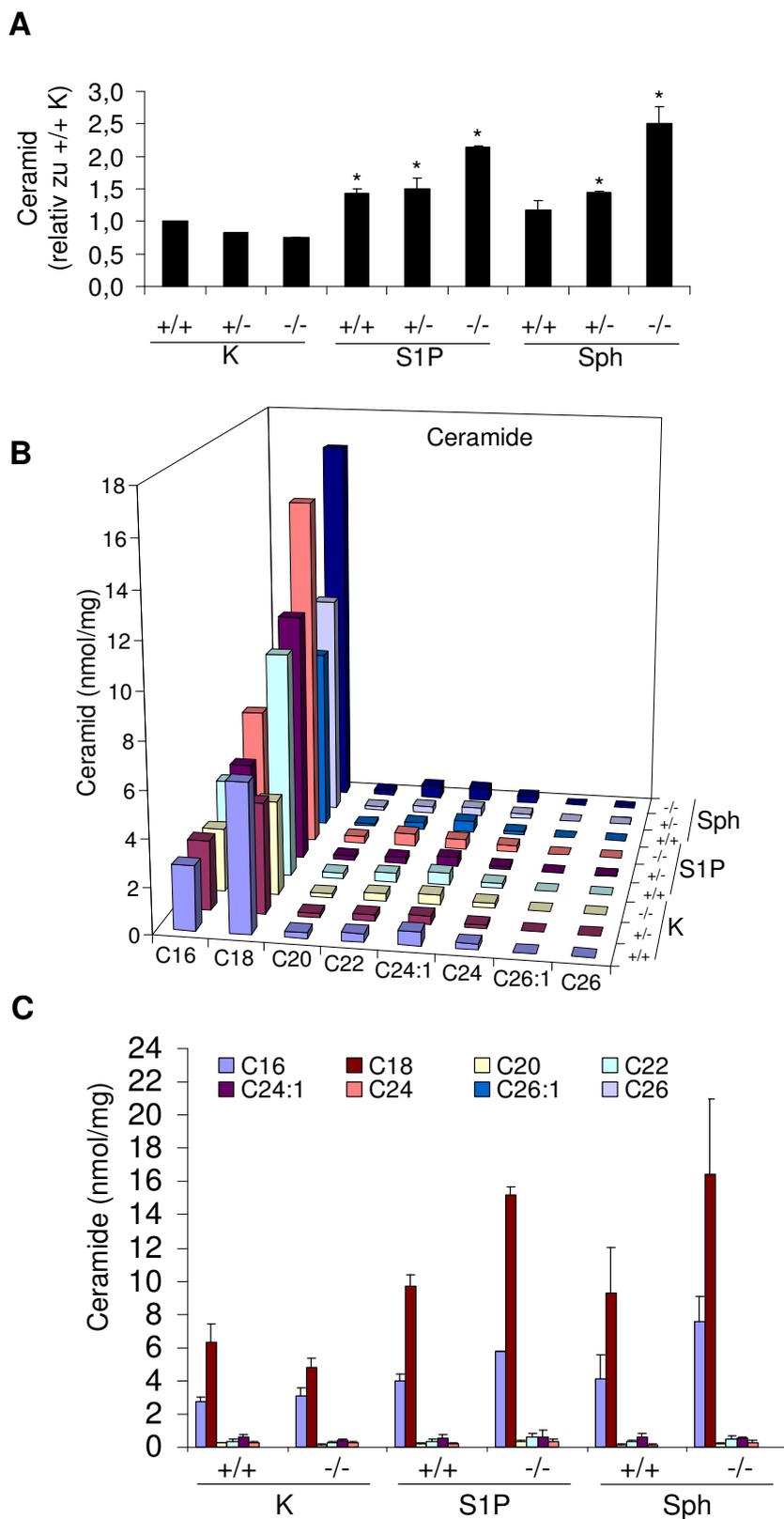


**Abb. 16: S1P Akkumulation in SPL-defizienten Neuronen.** Kleinhirnneuronen aus Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit phosphatfreiem MEM gewaschen und im selben Medium mit  $^{32}P$  (30  $\mu$ Ci/ml) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M S1P zugegeben. Nach 1 h wurden die Zellen geerntet und S1P extrahiert, mittels DC getrennt und quantifiziert (**A**). Die Daten beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle (+/+ K). **B**: Dünnschichtchromatographie. Laufmittel 80:20:10:20 1-Butanol / Methanol / Eisessig /  $H_2O$ .

### 2.2.2 Analyse der Ceramidespezies in SPL-defizienten Neuronen

Auch der Gehalt an Ceramid wurde in SPL-defizienten Neuronen mit und ohne Zugabe von exogenem Sphingosin bzw. S1P mittels Massenspektroskopie analysiert. Wie in **Abbildung 17** dargestellt ist, bilden die Kleinhirnneuronen einige molekulare Ceramidspezies, die sich durch die Fettsäure unterscheiden, welche mittels Amidbindung an Sphingosin gekoppelt ist. Den größten Anteil haben Ceramidspezies, die Stearinsäure (C18:0) enthalten, gefolgt von jenen mit Palmitinsäure (C16:0). Im Gegensatz zu dem signifikanten Anstieg von S1P in SPL-defizienten Zellen, konnte keine Erhöhung der Ceramidkonzentration festgestellt werden (**Abb. 17B,C**). Die Menge an C18 Ceramiden lag bei den SPL-defizienten Neuronen sogar deutlich unter der des Wildtyps. Erst nach Zugabe von S1P in das Kulturmedium stiegen die Ceramide in allen drei Genotypen an (**Abb. 17B, C**). Ebenso führte die Anwesenheit von Sphingosin im Medium zu einem Anstieg des Ceramids in heterozygoten und SPL-defizienten Neuronen, nicht aber in den Wildtyp Zellen. Dieser Anstieg betraf hauptsächlich die C16- und C18-Ceramide und war in den SPL-defizienten Zellen am höchsten (**Abb. 17A**). Die Menge an C18 Ceramid betrug in unbehandelten SPL-defizienten Neuronen ca. 4 nmol/mg und vervierfachte sich nach der Zugabe von S1P, während sie in Anwesenheit von Sphingosin um das vier bis fünffache schwankte (**Abb. 17B, C**).

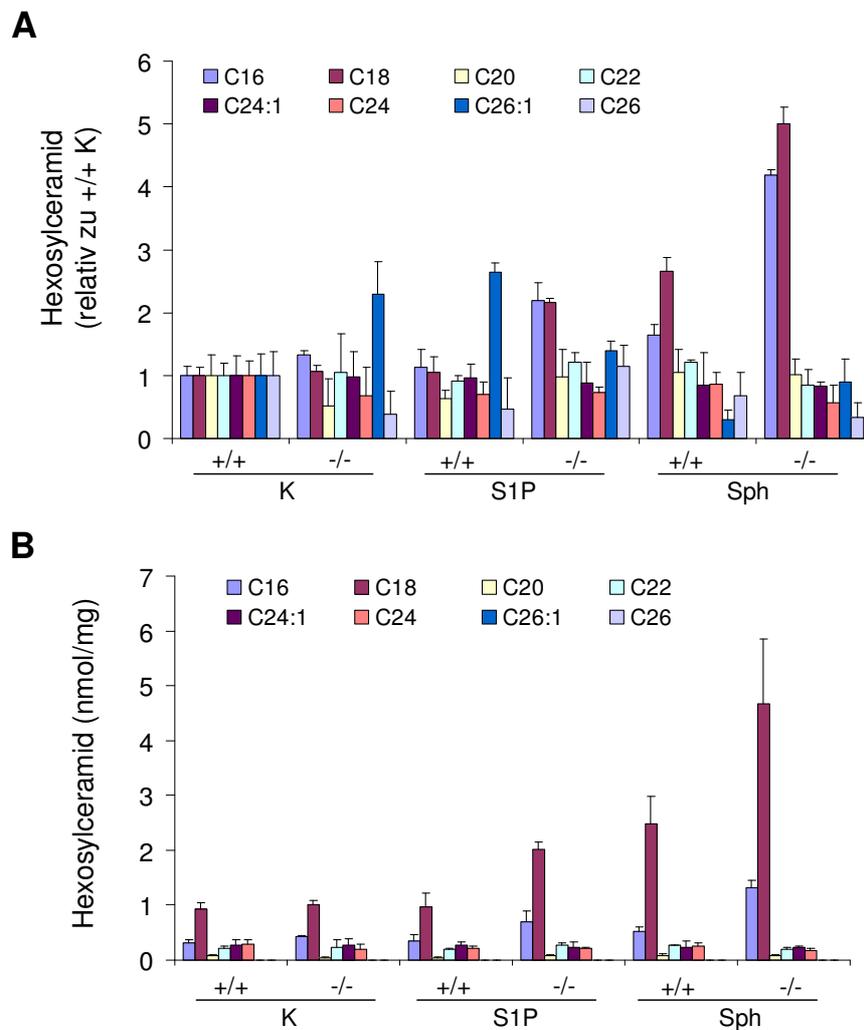
Exogenes S1P und Sphingosin führen demnach in SPL-defizienten Neuronen zu ähnlichen Änderungen in der zellulären Menge von bioaktiven Sphingolipiden.



**Abb. 17: Ceramidgehalt in Wildtyp, heterozygoten und SPL-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Ceramide extrahiert und massenspektrometrisch (ESI/MS/MS) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle (A) oder sind als absolute Werte in nmol/mg Zellprotein angegeben (B, C). \* signifikant verschieden von +/+ K ( $p < 0,05$ ).

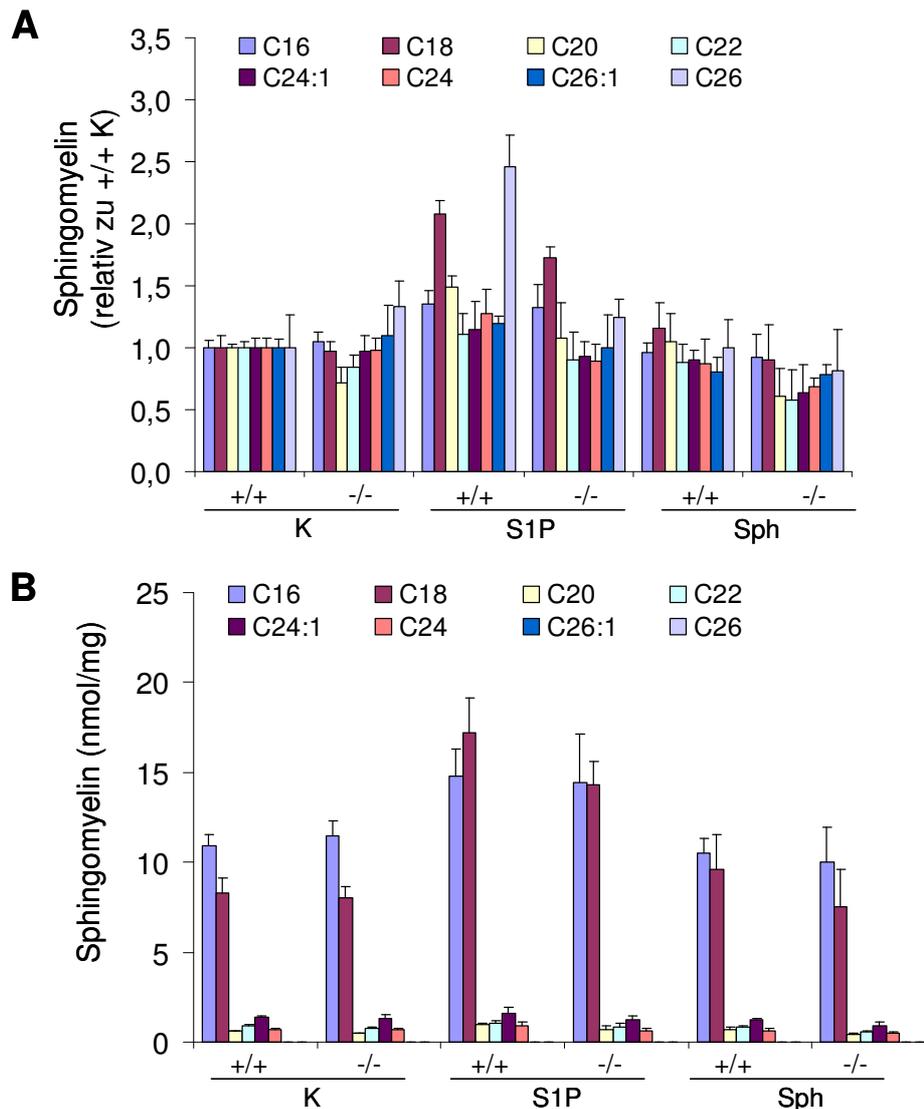
### 2.2.3 Effekte der SPL-Defizienz auf den intrazellulären Gehalt an Hexosylceramid und Sphingomyelin

Aufgrund der Änderungen im Gehalt der bioaktiven Sphingoidbasen sowie den Veränderungen im Ceramidgehalt wurden weitere Sphingolipide wie die Hexosylceramide und Sphingomyelin mittels Massenspektrometrie analysiert. Analog zu den bereits untersuchten unglycosylierten Ceramiden hatten auch hier die Hexosylceramide, welche Stearinsäure (C18:0) und Palmitinsäure (C16:0) enthalten den größten Anteil (**Abb. 18B**). In den SPL-defizienten Neuronen war dagegen der Anstieg von C26:1 Hexosylceramiden besonders auffallend, der jedoch nicht durch die Zugabe von S1P verstärkt wurde, im Gegensatz zu den mit S1P behandelten Wildtypen (**Abb. 18A**). Interessanterweise schien vor allem die Zugabe von Sphingosin eine starke Veränderung der C16 und C18 Hexosylceramide in SPL-defizienten Neuronen zu bewirken.



**Abb. 18: SPL-Defizienz beeinflusst die Hexosylceramide.** Neuronen aus Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Sphingolipide extrahiert und massenpektrometrisch (ESI/MS/MS) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle (**A**) oder sind als absolute Werte in nmol/mg Zellprotein (**B**) angegeben.

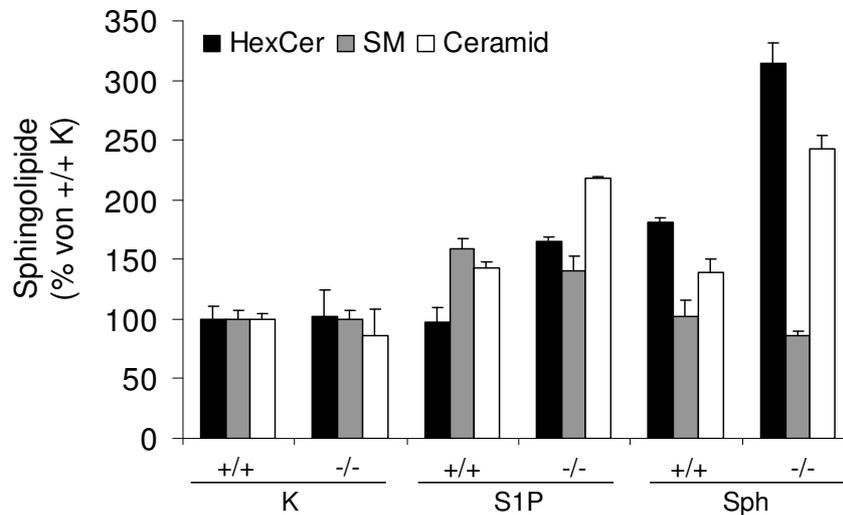
**Abbildung 19** verdeutlicht, dass die Deletion des SPL-Gens keine signifikanten Auswirkungen auf den Sphingomyelingehalt der Zelle ausübt. Einzig in Wildtyp Neuronen, welche mit S1P inkubiert wurden, war eine deutliche Erhöhung von jenen Sphingomyelinspezies, welche Stearinsäure (C18:0) bzw. Cerotinsäure (C26:0) enthielten detektierbar. Ein leichter Anstieg von C18 Sphingomyelin war zudem in SPL-defizienten Neuronen nach Zugabe von S1P erkennbar.



**Abb. 19: SPL-Defizienz hat keine Auswirkungen auf den Sphingomyelingehalt der Neuronen.** Neuronen aus Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Sphingolipide extrahiert und massenpektrometrisch (ESI/MS/MS) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle (A) oder sind als absolute Werte in nmol/mg Zellprotein (B) angegeben.

Wie **Abbildung 20** darstellt, intervenierte Sphingosin am stärksten mit dem Hexosylceramid und Ceramid Metabolismus, was wahrscheinlich auf der Tatsache beruht, dass Sphingosin der direkte Vorläufer von Ceramid ist und dieses wiederum der Ausgangspunkt für die

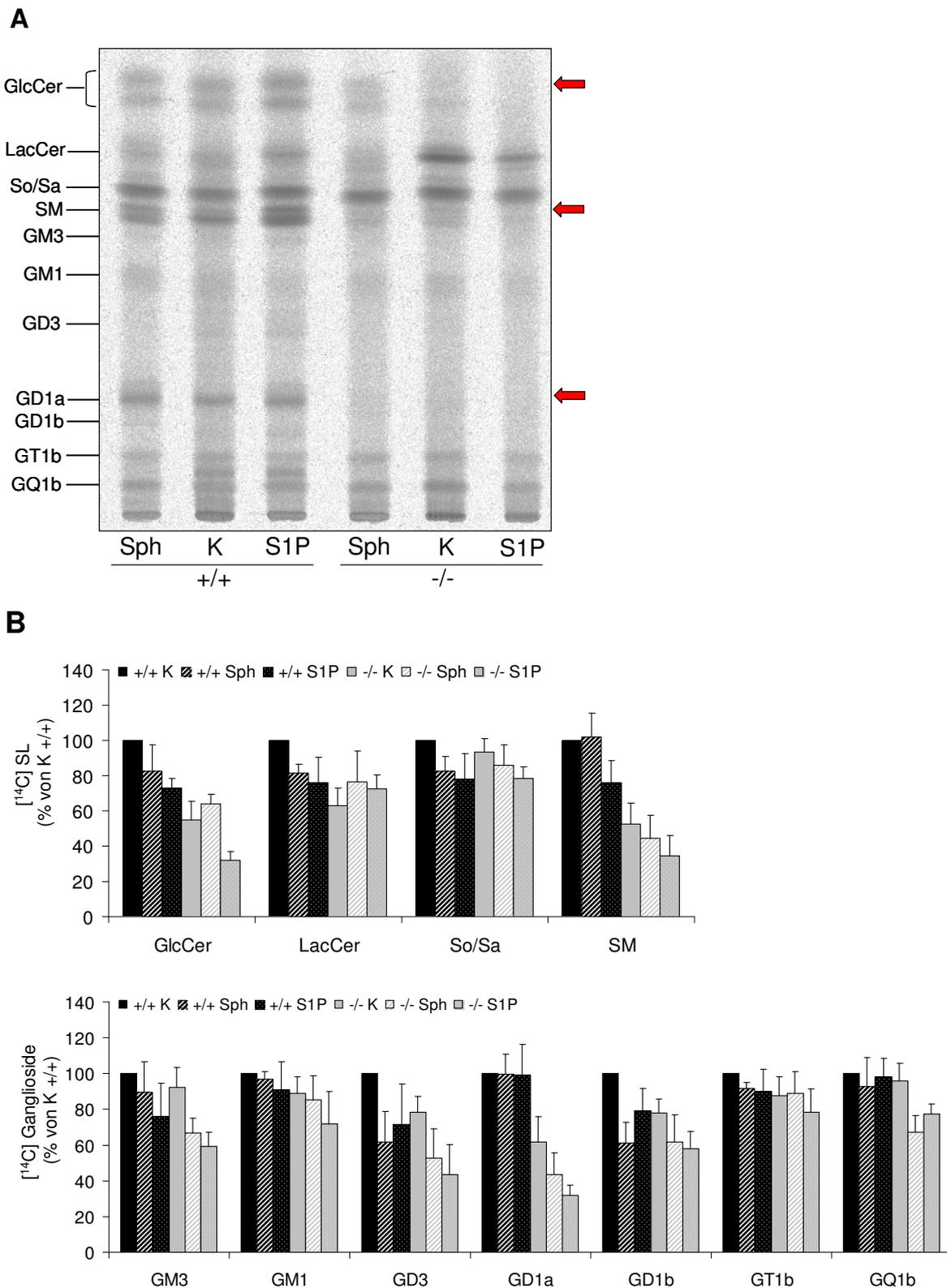
Glycosylierungen darstellt. Werden allerdings nur die beiden Kontrollen betrachte, ist deutlich zu erkennen, dass der Gesamtgehalt der genannten Sphingolipide in den SPL-defizienten Neuronen kaum verändert ist.



**Abb. 20: Der Gesamtgehalt an Hexosylceramid, Sphingomyelin und Ceramid wird nicht durch die SPL-Defizienz beeinflusst.** Neuronen aus Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Sphingolipide extrahiert und massenpektrometrisch (ESI/MS/MS) analysiert. Die Daten sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung und beziehen sich auf die Wildtyp Kontrolle. HexCer – Hexosylceramid, SM – Sphingomyelin.

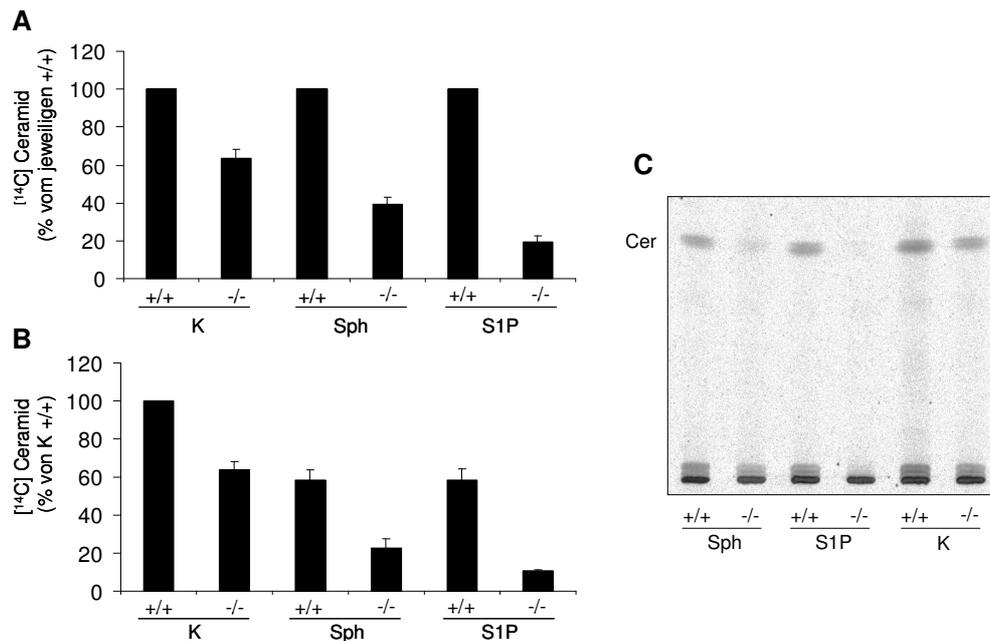
#### 2.2.4 Inhibierung der *de novo* Sphingolipid-Synthese in SPL-defizienten Neuronen

Zusätzlich zu den massenspektrometrischen Messungen, in denen der Gesamtgehalt an zellulären Lipiden bestimmt wurde, wurde die Sphingolipid-Biosynthese genauer mittels radioaktiver Markierungen analysiert. Zunächst wurden Wildtyp und SPL-defiziente Neuronen mit Lösungsmittel als Kontrolle, Sphingosin oder S1P behandelt und nach 4 h mit [ $^{14}$ C]-Serin markiert. Es war deutlich zu erkennen, dass alle SPL-defizienten Zellen unabhängig von ihrer Behandlung eine verringerte *de novo* Synthese der Sphingolipide aufwiesen (**Abb. 21**). Hierbei war die a-Serie, besonders GD1a, stärker betroffen als die b-Serie (**Abb. 21A**). Überraschend im Hinblick auf das Ergebnis des vorherigen Abschnitts – die Menge an Hexosylceramid und Sphingomyelin blieb in den SPL-defizienten Neuronen konstant – nahm die *de novo* Synthese von Glucosylceramid (GlcCer) und Sphingomyelin (SM) in SPL-defizienten Neuronen ab (**Abb. 21**). Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatographie bestätigte die gefundene Reduktion der *de novo* Synthese in SPL-defizienten Neuronen (**Abb. 21B**).



**Abb. 21: SPL-Defizienz hat eine Reduktion der Sphingolipid Biosynthese zur Folge.** Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) oder 10  $\mu$ M S1P behandelt. Nach 4 h wurde [ $^{14}$ C] Serin (2  $\mu$ Ci/ml) in das Medium gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die Lipide bestimmt. **A:** Dünnschichtchromatographie (DC), **B:** Quantitative Analyse der Daten mit TINA, schwarze Balken - +/+ Neuronen, graue Balken - -/- Neuronen, kein Muster – Kontrollen, gestrichelt – Sph Zusatz, gepunktet – S1P Zusatz. GlcCer – Glucosylceramid, LacCer – Lactosylceramid, SM – Sphingomyelin, So/Sa – Sphingosin/Sphingalin. Laufmittel 60:35:8 Chloroform / Methanol / 0,22% CaCl<sub>2</sub>

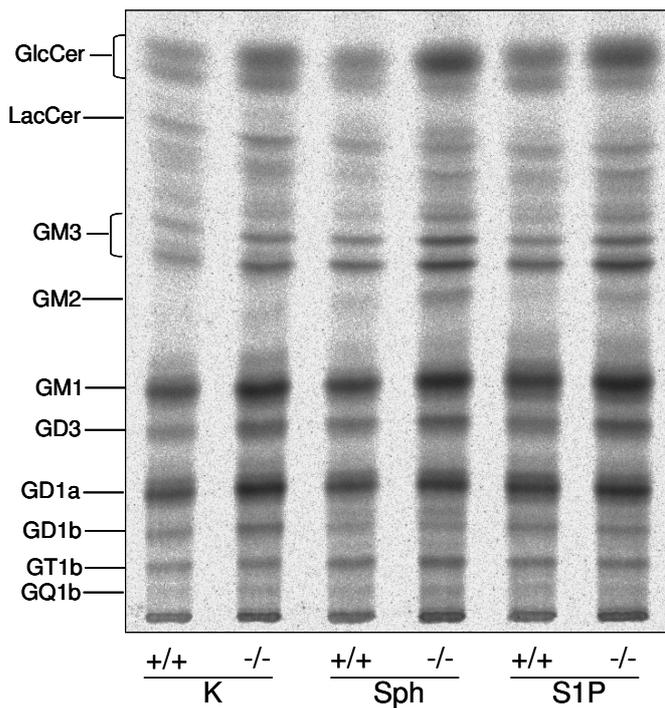
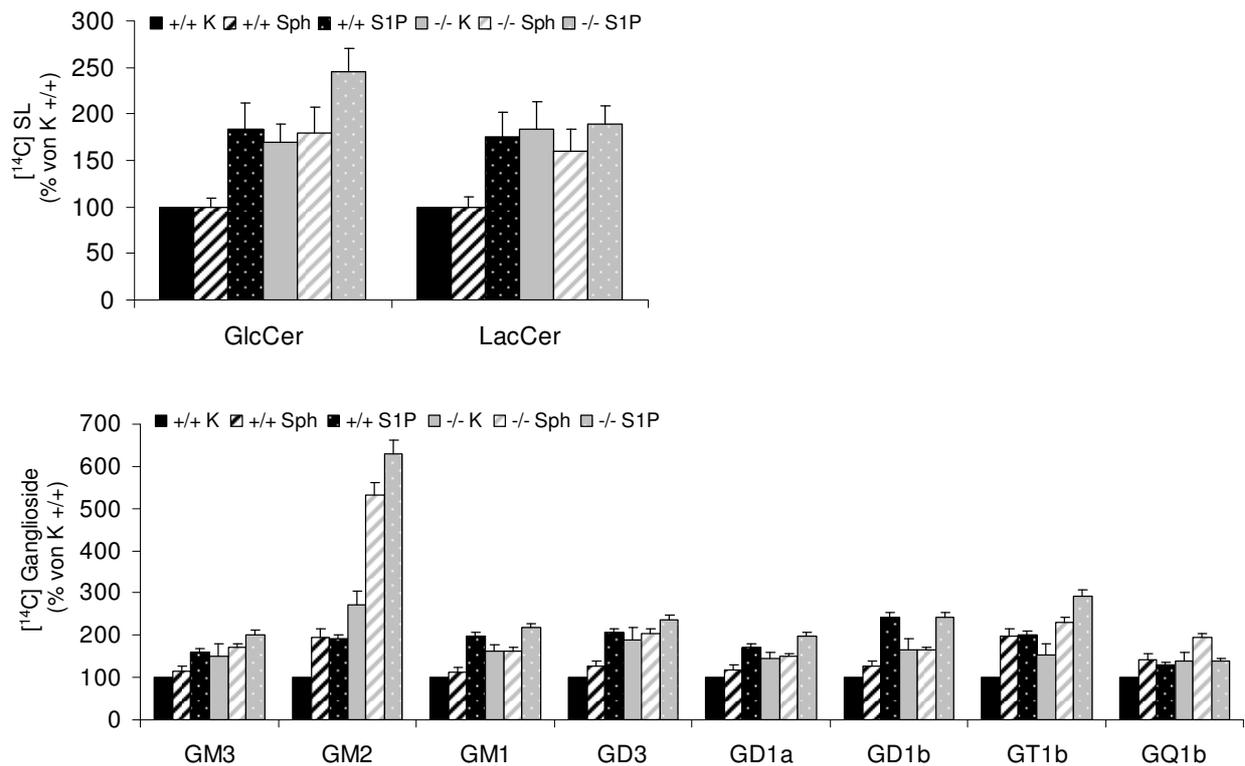
Die *de novo* Synthese von Ceramid wurde ebenfalls mittels [ $^{14}\text{C}$ ]-Serin Markierung analysiert. Hierzu wurden die Neuronen wie zuvor behandelt, die Lipide extrahiert und diese mittels Dünnschichtchromatographie in einem für Ceramid geeigneten Laufmittel aufgetrennt. Auch die *de novo* Ceramid Synthese war in SPL-defizienten Neuronen reduziert, vor allem in Gegenwart von exogenem S1P oder Sphingosin (Abb. 22). Nach Zugabe von S1P war die *de novo* Ceramid Synthese um 80% reduziert, während sie in Gegenwart von Sphingosin um 50% abnahm.



**Abb. 22: S1P hemmt die *de novo* Ceramid-Synthese in SPL-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu\text{M}$  Sphingosin (Sph) oder 10  $\mu\text{M}$  S1P behandelt. Nach 4 h wurde [ $^{14}\text{C}$ ] Serin (2  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) in das Medium gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und Ceramid bestimmt. **A:** %Ceramid bezogen auf den jeweiligen Wildtyp (+/+). **B:** %Ceramid bezogen auf wildtyp Kontrolle (K +/+). **C:** Dünnschichtchromatographie. Laufmittel 190:9:1 Chloroform / Methanol / Eisessig.

## 2.2.5 Aktivierung des Sphingolipid-Recyclingweges in SPL-defizienten Neuronen

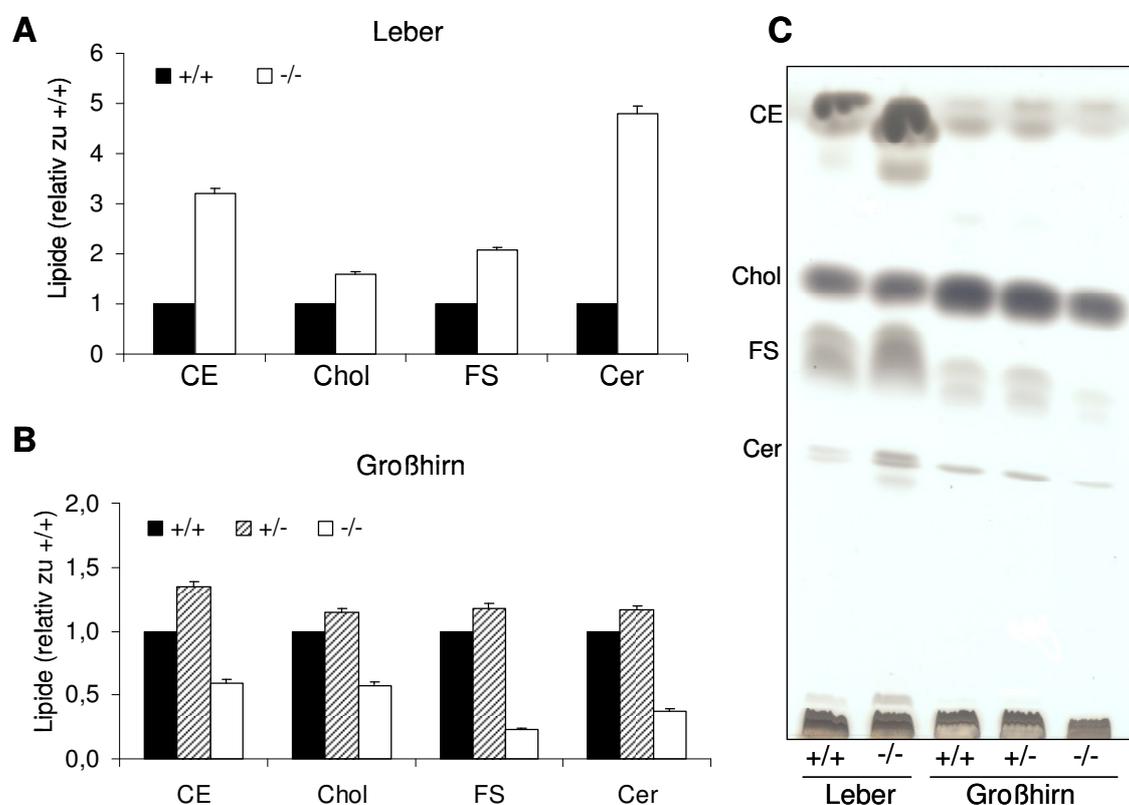
Um Veränderungen im Katabolismus (Recycling) der Ganglioside sichtbar zu machen, wurden die Neuronen wie zuvor beschrieben behandelt, aber mit D[1- $^{14}\text{C}$ ]Galaktose anstelle von [ $^{14}\text{C}$ ]-Serin markiert. Nach der Extraktion der Lipide wurden diese mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. In den SPL-defizienten Neuronen war der Recyclingweg im Vergleich zu den Wildtypen unabhängig der Zusätze erhöht (Abb. 23). Vor allem die Wiederverwertung von GM2, einem Gangliosid der  $\alpha$ -Serie, nahm in SPL-defizienten Neuronen stark zu.

**A****B**

**Abb. 23: SPL-Defizienz bewirkt die Zunahme der SL-Bildung via Recycling.** Wildtyp (+/+) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) oder 10  $\mu$ M S1P behandelt. Nach 4 h wurde D[1- $^{14}$ C] Galaktose (2  $\mu$ Ci/ml) in das Medium gegeben. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Lipide bestimmt. **A:** Dünnschichtchromatographie (DC), **B:** Quantitative Analyse der Daten mit TINA, schwarze Balken - +/+ Neuronen, graue Balken - -/- Neuronen, kein Muster – Kontrollen, gestrichelt – Sph Zusatz, gepunktet – S1P Zusatz. GlcCer – Glucosylceramid, LacCer – Lactosylceramid. Laufmittel 60:35:8 Chloroform / Methanol / 0,22%  $\text{CaCl}_2$ .

## 2.2.6 Veränderungen des Lipidmetabolismus in Leber und Gehirn von SPL-defizienten Mäusen

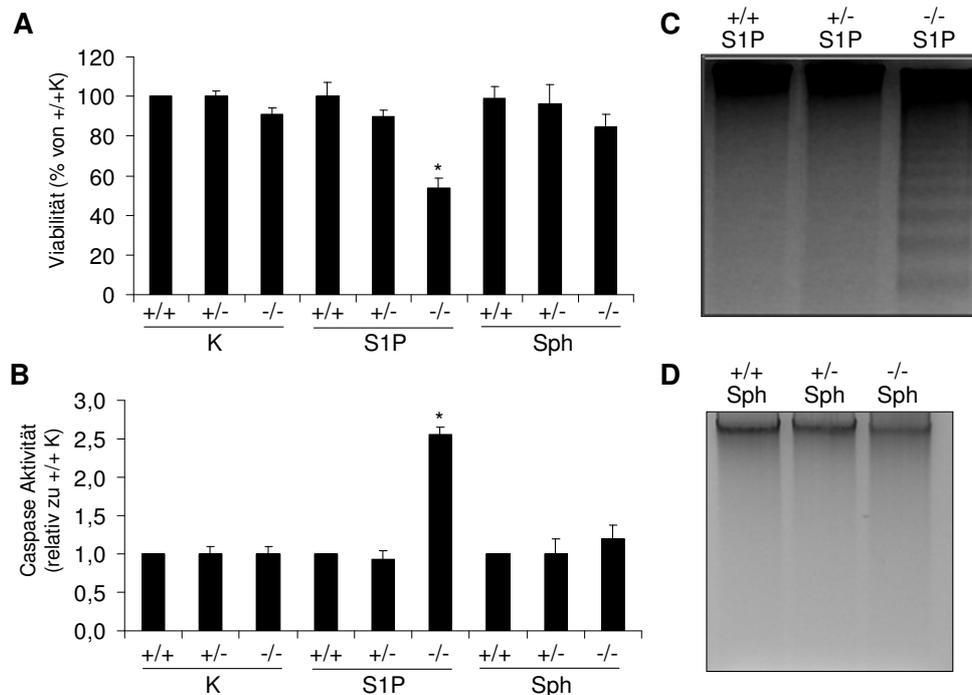
Die Veränderung des Lipidmetabolismus in SPL-defizienten Mäusen betraf auch andere Gewebe als das Cerebellum. Untersuchungen an Leber und Großhirn zeigten Unterschiede in den Lipiden (**Abb. 24**). In der Leber waren Cholesterolester (CE), Cholesterol (Chol), Fettsäuren (FS) und Ceramid erhöht (**Abb. 24A**). Im Gegensatz dazu zeigte sich im Großhirn der SPL-defizienten Mäuse eine Verringerung der genannten Lipide (**Abb. 24B**). Die Abwesenheit der S1P-Lyase führt demnach zu weit reichenden Veränderungen in dem Lipidmetabolismus von Gehirn und Leber.



**Abb. 24: SPL-Defizienz führt in Leber und Gehirn zu Veränderungen der Lipidkonzentration.** Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden Leber und Großhirn entnommen. Die Lipide wurden wie im Methodenteil angegeben analysiert. Die Daten wurden auf das Feuchtgewicht normalisiert und relativ zum Wildtyp dargestellt. **A:** Leber, relativ zu Wildtyp (+/+), **B:** Großhirn, relativ zu Wildtyp (+/+), **C:** Dünnschichtchromatographie. CE – Cholesterolester, Chol – Cholesterol, Cer – Ceramid, FS – Fettsäuren. Laufmittel 190:9:1 Chloroform / Methanol / Eisessig.

### 2.3 Im Gegensatz zu Sphingosin induziert S1P Apoptose in SPL-defizienten Neuronen.

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, bewirkten exogen angebotenes Sphingosin und S1P nahezu identische Veränderungen im intrazellulären Gehalt bioaktiver Sphingolipide in SPL-defizienten Neuronen. Überraschenderweise hatte die Gegenwart von exogenem Sphingosin bzw. S1P unterschiedliche Auswirkungen auf die Viabilität der SPL-defizienten Neuronen. Neuronen aller drei Genotypen wurden für 24 h mit Lösungsmittel als Kontrolle, 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin behandelt. Nach dieser Zeit wurde die Viabilität der Zellen durch Zugabe des Farbstoffs Resazurin in das Kulturmedium bestimmt. Nur in den mit S1P behandelten Zellen wurde eine Verringerung der Viabilität um ca. 40% gefunden (**Abb. 25A**). Um die Art des Zelltodes zu bestimmen, wurden des Weiteren die Aktivität der Caspasen sowie die Integrität der genomischen DNA untersucht.

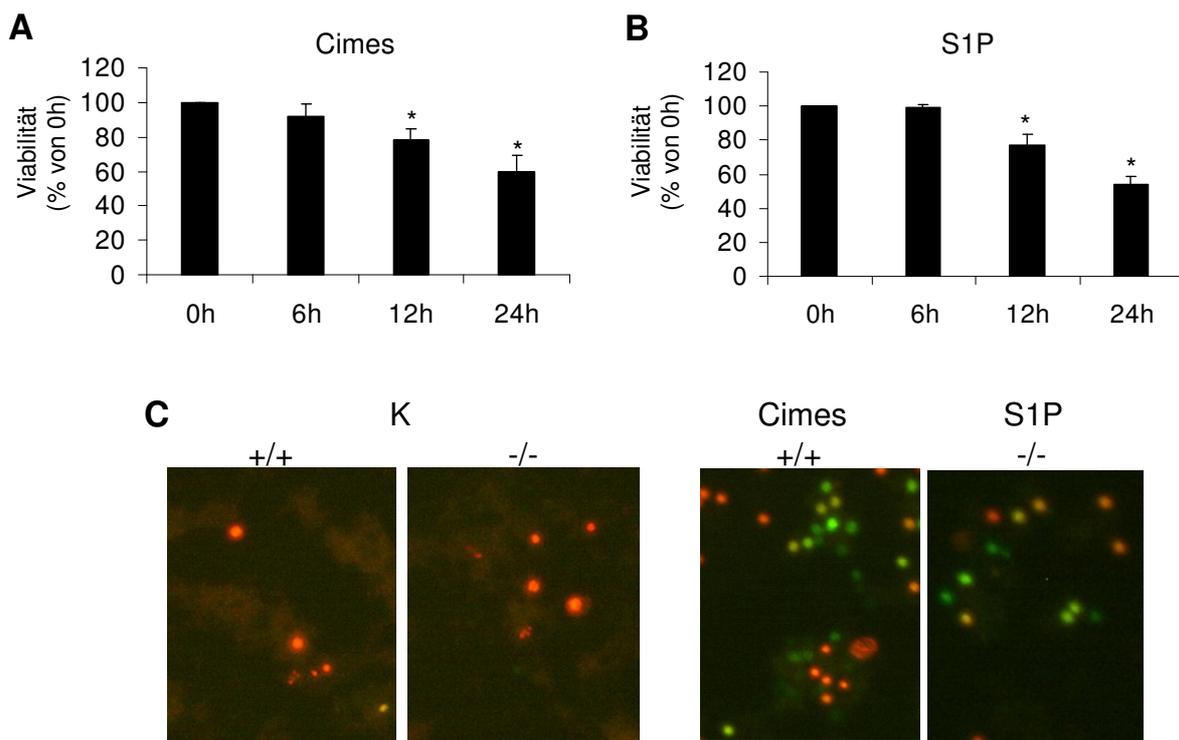


**Abb. 25: S1P induziert Apoptose in SPL-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+), heterozygote (+/-) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Sphingosin (Sph) behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität (**A**), die relative Effektor-Caspase Aktivität (**B**) sowie die genomische DNA (**C, D**) analysiert. \* signifikant verschieden von +/+ K ( $p < 0,05$ ).

Die Aktivität der Effektor-Caspase-3 war in S1P behandelten SPL-defizienten Zellen 2,5fach erhöht, nicht aber in wildtyp und heterozygoten Neuronen (**Abb. 25B**). Die Aktivierung der Caspasen nach S1P Zugabe wurde von der Fragmentierung der DNA begleitet (**Abb. 25C**). Bei den mit Sphingosin behandelten Neuronen traten weder Veränderungen in der Viabilität noch in der Caspase Aktivität oder der Integrität der DNA auf (**Abb. 25D**).

## 2.4 S1P und Cimes induzieren Apoptose in SPL-defizienten bzw. Wildtyp Neuronen

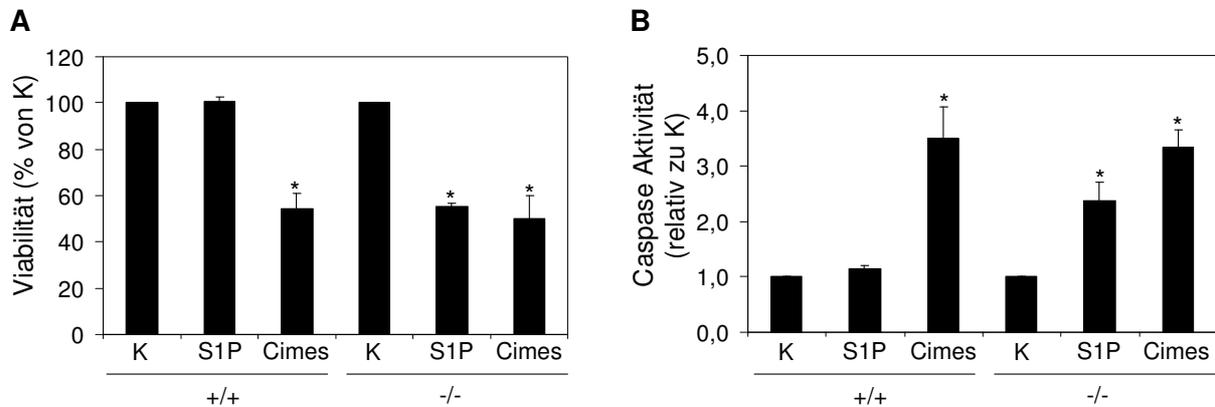
Der Effekt von S1P auf SPL-defiziente Neuronen wurde mit der bereits beschriebenen apoptotischen Wirkung von Cimes (cis-4-Methylsphingosin) verglichen (Naetzker et al., 2006). Cimes ist ein synthetisches Sphingosin Analogon, welches intrazellulär phosphoryliert (CimesP) und damit erst bioaktiv wird. Die zeitabhängige Wirkung von S1P in SPL-defizienten Neuronen und Cimes in wildtyp Neuronen ist nahezu identisch (**Abb. 26A, B**). Zusätzlich wurde ein Fluoreszenzassay (YO-PRO) angewendet, bei dem apoptotische Zellen grün und nekrotische Zellen rot markiert werden (**Abb. 26C**). Es war deutlich zu sehen, dass es sich in beiden Fällen vornehmlich um Apoptose und nicht um Nekrose handelte. Die nekrotischen Zellen erschienen in allen Proben unabhängig der Zusätze (Cimes, S1P) und sind ein typisches Kulturphänomen von primär kultivierten Zellen.



**Abb. 26: Die Wirkung von S1P auf die Zellviabilität von SPL-defizienten Neuronen ist vergleichbar mit jener von Cimes in Wildtyp Neuronen.** Wildtyp Neuronen wurden mit 10  $\mu$ M Cimes (**A**) und SPL-defiziente Neuronen mit 10  $\mu$ M S1P (**B**) für die angegebenen Zeiten inkubiert und deren Viabilität bestimmt. **C:** Fluoreszenzaufnahme apoptotischer Zellen. Wildtyp (+/+) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), Cimes (nur +/+) oder S1P (nur -/-) behandelt. Nach 24 h wurden die apoptotischen Zellen (grün) mit Hilfe des YoPro Assays bestimmt. Nekrotische Zellen sind rot. \*signifikant verschieden von 0 h ( $p < 0,05$ ).

Wurden Wildtyp oder heterozygote Neuronen jedoch mit S1P behandelt, so wurde deren Viabilität in keiner Weise beeinträchtigt (**Abb. 27**). Dagegen starben Wildtyp, heterozygote

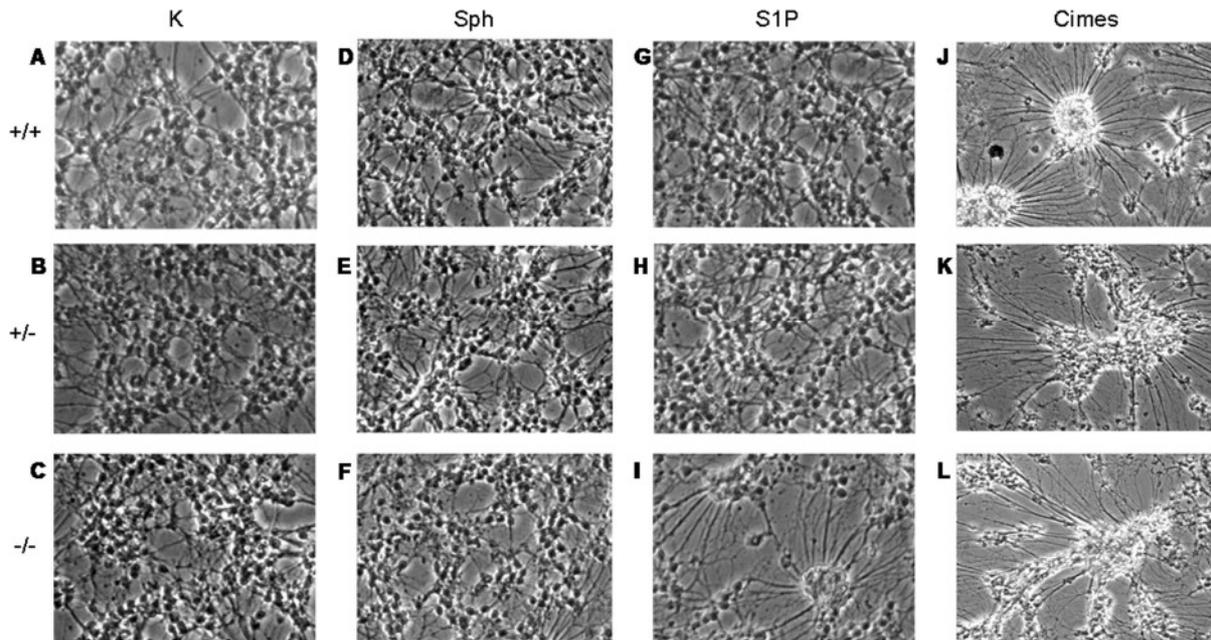
und SPL-defiziente Neuronen nach der Behandlung mit Cimes an Apoptose, was sich in der sinkenden Viabilität und der steigenden Aktivität der Caspasen darstellte (**Abb. 27**).



**Abb. 27: Im Gegensatz zu Cimes induziert S1P Apoptose nur in SPL-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+) und SPL-defiziente (-/-) Zellen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Cimes behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität (**A**) und die relative Effektor-Caspase Aktivität (**B**) bestimmt. \*signifikant verschieden von K desselben Genotyps ( $p < 0,05$ ).

#### 2.4.1 Korrelation der apoptotischen Wirkung von Cimes und S1P mit morphologischen Veränderungen der Neuronen.

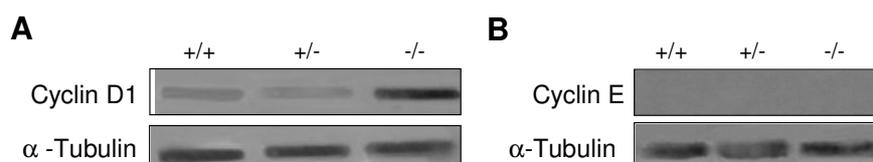
Lichtmikroskopische Untersuchungen der Zellmorphologie ergaben keine Unterschiede in wildtyp, heterozygoten und SPL-defizienten Neuronen (**Abb. 28A-C**). Neuronen aller drei Genotypen waren vollständig differenziert und wiesen ein dichtes Netzwerk von Neuriten auf. Die Zugabe von Sphingosin in das Kulturmedium ließ keine Veränderungen in der Morphologie erkennen (**Abb. 28D-F**), während eine Inkubation der Neuronen mit S1P nur in den SPL-defizienten Zellen zu einer veränderten Morphologie führte, die Wildtypen und Heterozygoten jedoch nicht beeinflusste (**Abb. 28G-I**). Im Gegensatz hierzu führte eine Inkubation mit Cimes in allen drei Genotypen zu einer veränderten Morphologie (**Abb. 28J-L**). Diese zeigte sich in der Bildung von neuronalen Zellaggregaten, die durch strahlenförmig deutlich faszikulierte Neurite verbunden waren. Einige Neurite wiesen zudem eine beginnende Degradation auf.



**Abb. 28: Morphologische Untersuchung von Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und SPL-defizienten (-/-) Neuronen.** Lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme von wildtyp (A, D, G, J), heterozygoten (B, E, H, K) und SPL-defizienten (C, F, I, L) Neuronen. Am fünften Kulturtag wurden die Zellen mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) (A-C), Sphingosin (D-F), S1P (G-I) oder Cimes (J-L), jedes 10  $\mu$ M, für 24 h inkubiert und anschließend mikroskopisch betrachtet. 100fach vergrößert.

## 2.5 S1P induziert eine unvollständige Aktivierung des Zellzyklus in SPL-defizienten Neuronen

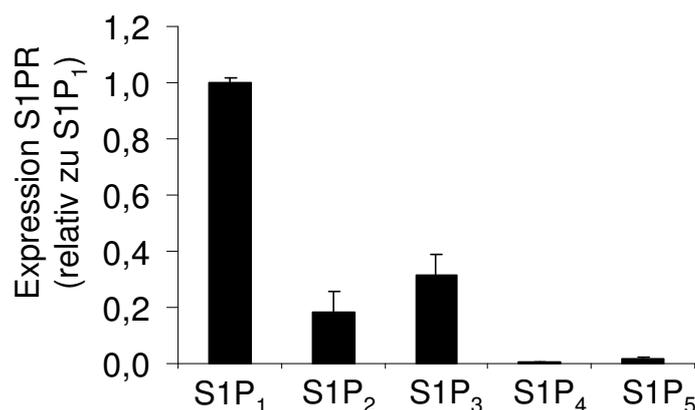
In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Cimes in wildtyp Neuronen zu einer partiellen Reaktivierung des Zellzyklus führte, die zum Teil für die Cimes induzierte Apoptose verantwortlich war (Naetzker et al., 2006). Um zu prüfen, ob der S1P induzierten Apoptose in SPL-defizienten Neuronen ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt, wurde die Expression von Cyclin D1 und Cyclin E untersucht. Cyclin D1 und die zugehörige Kinase CDK4 (Cyclin dependent kinase4) sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus und steuern unter anderem den Wiedereintritt ruhender Zellen aus der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase (Baldin et al., 1993). Cyclin D1 ist zudem an der Apoptose in Neuronen beteiligt (Freeman et al., 1994; Sakai et al., 1999). Cyclin E zeigt dagegen den Eintritt der Zelle in die auf die G<sub>1</sub>-Phase folgende S-Phase an. In mit S1P behandelten SPL-defizienten Neuronen zeigte sich wie schon bei Cimes eine deutliche Erhöhung der Cyclin D1 Expression (Abb. 29A), während keine Expression von Cyclin E detektiert werden konnte (Abb. 29B).



**Abb. 29: S1P führt zur Expression von Cyclin D1 in SPL-defizienten Neuronen.** Western Blot Analyse der Expression von Cyclin D1 (A) und Cyclin E (B). Kleinhirnneuronen von Wildtyp (+/+), heterozygoten (+/-) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurde für 24 h mit 10  $\mu$ M S1P inkubiert und die Expression von Cyclin D1 und Cyclin E untersucht.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Auftragskontrolle eingesetzt.

## 2.6 Beteiligung der S1P-Rezeptoren an der Spingoid-induzierten Apoptose

Um eine mögliche Beteiligung der S1P-Rezeptoren an dem toxischen Effekt von S1P in SPL-defizienten Neuronen zu untersuchen wurde zunächst die Expression der S1P Rezeptoren in den in dieser Arbeit verwendeten Kleinhirnneuronen mittels Real-Time PCR analysiert. Entsprechend den Angaben in der Literatur (Anelli et al., 2005) wurde eine Expression der Rezeptoren S1P<sub>1-3</sub> erwartet. Wie in **Abbildung 30** dargestellt, war S1P<sub>1</sub> der Hauptvertreter der S1P Rezeptoren in Kleinhirnneuronen der Maus, gefolgt von S1P<sub>3</sub> und S1P<sub>2</sub>, deren Expression allerdings deutlich geringer ausfiel als jene von S1P<sub>1</sub>. S1P<sub>5</sub> wird hauptsächlich in Oligodendrocyten und neuronalen Vorläuferzellen exprimiert, während S1P<sub>4</sub> sich hauptsächlich im Lymphgewebe befindet (Kluk and Hla, 2002; Terai et al., 2003; Im et al., 2004; Yu et al., 2004)

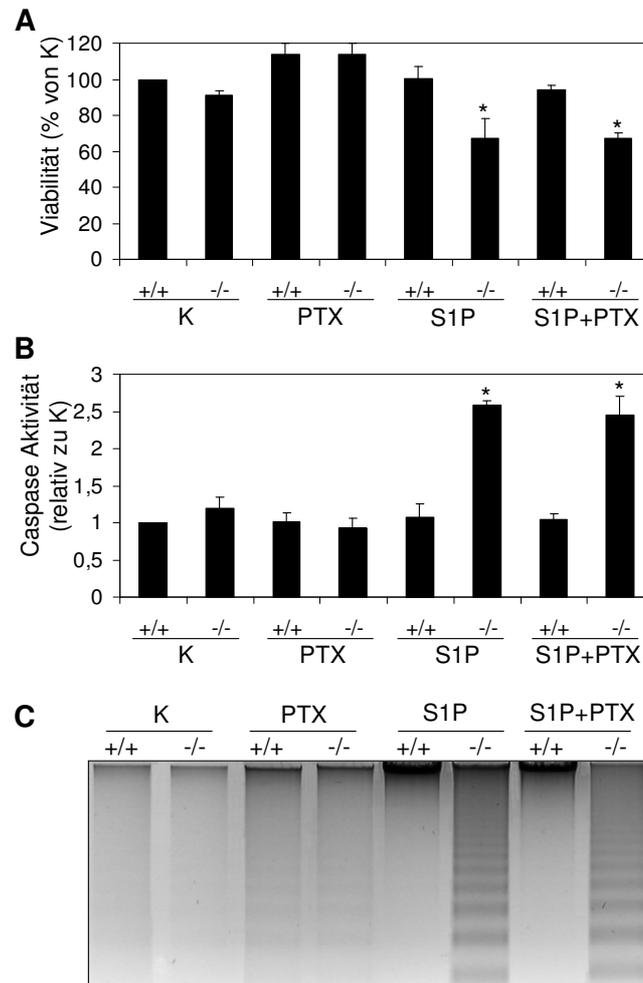


**Abb. 30: Expressionsmuster der S1P-Rezeptoren (S1PR) in Neuronen des Maus Cerebellums.** Nach dem Ernten der Neuronen wurde deren RNA isoliert, mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe von Real-Time PCR die Expression der 5 S1P-Rezeptoren (S1P<sub>1-5</sub>) ermittelt. Die relative Expression der Rezeptoren bezieht sich auf S1P<sub>1</sub>.

Um nun die Beteiligung dieser Rezeptoren an der neurotoxischen Wirkung von S1P in SPL-defizienten Neuronen zu überprüfen, wurden verschiedene Ansätze gewählt.

## 2.6.1 PTX verhindert nicht die S1P-induzierte Apoptose in den SPL-defizienten Neuronen

Zuerst wurde die S1P-Rezeptor-vermittelte Signalkaskade mittels Pertussistoxin (PTX) inhibiert. PTX katalysiert die Übertragung einer ADP-Riboseeinheit von NAD<sup>+</sup> auf Gi<sub>α</sub> und Gi<sub>0</sub>, an die die S1P<sub>1-3</sub>-Rezeptoren gekoppelt sind. Das ADP-Ribosylierte G-Protein kann nun sein gebundenes GDP nicht mehr mit einem GTP tauschen und bleibt inaktiv, wodurch keine Weiterleitung des Signals mehr stattfindet (Fields and Casey, 1997). SPL-defiziente Neuronen wurden mit PTX (100 ng/ml) 30 min lang inkubiert, bevor 10 μM S1P für 24 h zugegeben wurde. PTX verhinderte nicht die S1P-induzierte Apoptose in den SPL-defizienten Neuronen (**Abb. 31**). Weder die Viabilität noch die Aktivität der Caspasen wurde durch PTX beeinflusst (**Abb. 31A, B**) und auch die Fragmentierung der DNA war unabhängig von der PTX Behandlung zu erkennen (**Abb. 31C**).



**Abb. 31: Pertussistoxin (PTX) hat keinen Einfluss auf den apoptotischen Effekt von S1P in SPL-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+) und SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10 μM S1P, 100 ng/mg PTX oder einer Kombination aus beiden (PTX + S1P) inkubiert. Die Vorinkubation mit PTX betrug 30 min. Nach 24 h wurde die Viabilität (**A**), die relative Caspase Aktivität (**B**) sowie die genomische DNA (**C**) analysiert. Die Caspase Aktivität bezieht sich auf +/+ K. \* signifikant verschieden von +/+ K ( $p < 0,05$ ).

## 2.6.2 Die Inhibierung von S1P<sub>2</sub> hat keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose

Um Fehler auszuschließen wurde zusätzlich ein S1P-Rezeptor Antagonist verwendet, JTE013 (Abb. 32), der hauptsächlich S1P<sub>2</sub> hemmt (Parrill et al., 2004). Die kultivierten Neuronen wurden dafür mit 10  $\mu$ M JTE für 30 min vorinkubiert, anschließend wurde 10  $\mu$ M Cimes für 24 h zugegeben.

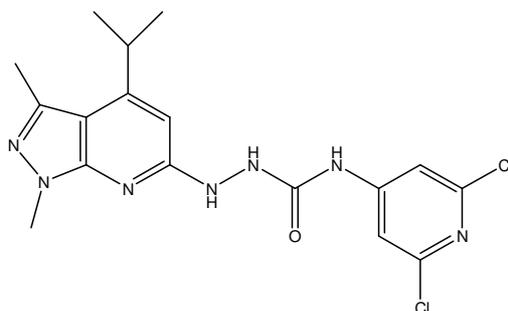


Abb. 32: JTE013, S1PR Antagonist. JTE inhibiert hauptsächlich S1P<sub>2</sub>.

JTE hatte allerdings keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose (Abb. 33). Cimes führte in An- und Abwesenheit von JTE zu einer verringerten Viabilität, einer erhöhten Caspase Aktivität und einer DNA Fragmentierung.

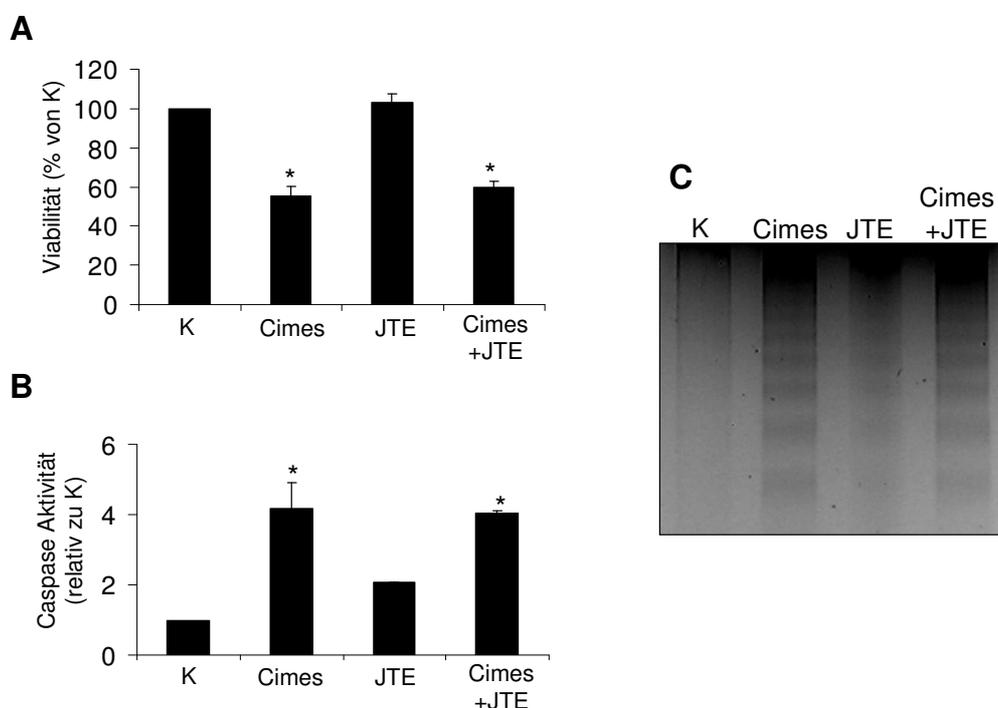
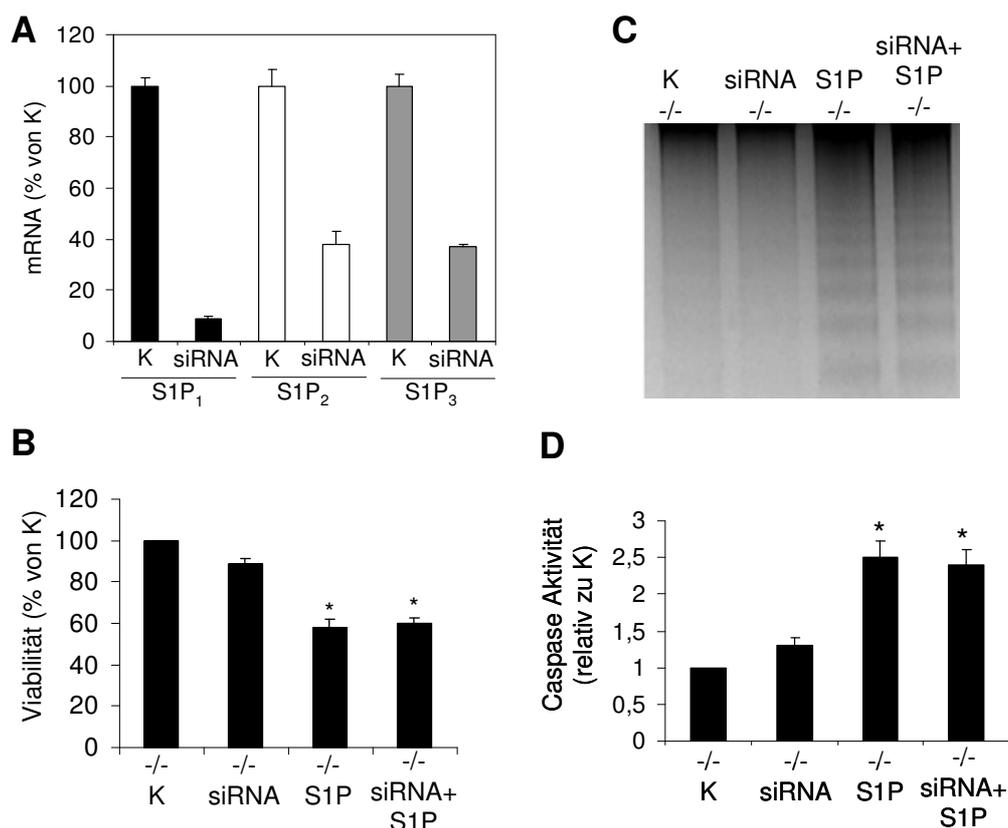


Abb. 33: JTE (S1PR Antagonist) hat keinen Einfluss auf den apoptotischen Effekt von Cimes. Wildtyp Neuronen wurden am fünften Kulturtag mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M JTE oder einer Kombination aus JTE und Cimes (JTE + Cimes) behandelt. Die Vorinkubation mit JTE betrug 30 min. Nach 24 h wurde die Viabilität (A), die relative Caspase Aktivität (B) sowie die genomische DNA (C) analysiert. Die Caspase Aktivität bezieht sich auf K. \* signifikant verschieden von K ( $p < 0,05$ ).

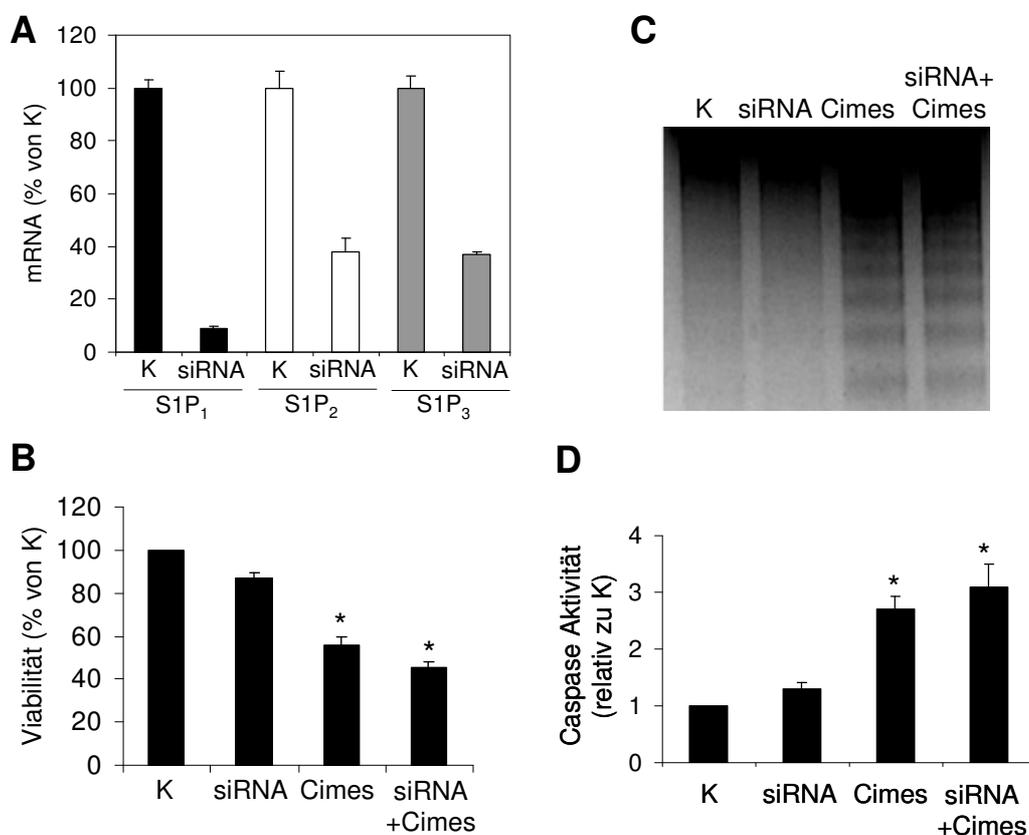
### 2.6.3 S1P<sub>1-3</sub> sind nicht an der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose beteiligt

Zusätzlich zur Verwendung von Rezeptor Antagonisten und G-Protein Inhibitoren wurde die eventuelle Beteiligung der S1P Rezeptoren an der neurotoxischen Wirkung von S1P und Cimes auch mittels siRNA untersucht. Die zuvor gewonnenen Ergebnisse wurden mittels siRNA gegen die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> bestätigt. 24 h nach Inkubation mit siRNA gegen die drei genannten Rezeptoren wurde das Ausmaß des Knock Downs mittels Real-Time PCR überprüft; die Rezeptoren waren 70 bis 90% herunter reguliert (**Abb. 34A**). Es ist anzumerken, dass die simultane Inkubation der Neuronen mit siRNA gegen alle drei Rezeptoren keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Neuronen ausübte. Selbst die gleichzeitige Unterdrückung der Expression aller drei Rezeptoren hatte keinen Einfluss auf die apoptotischen Effekte von S1P in SPL-defizienten Neuronen. Weder die Viabilität (**Abb. 34B**), noch die DNA Fragmentierung (**Abb. 34C**) oder die Caspase Aktivität (**Abb. 34D**) wurde durch den Einsatz der siRNA beeinflusst.



**Abb. 34: Die S1P-Rezeptoren 1-3 sind nicht an der S1P induzierten Apoptose in SPL-defizienten Neuronen beteiligt.** **A:** Kontrolle des S1P<sub>1-3</sub> Rezeptoren Knock Downs durch siRNA. SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden ohne (K) oder mit siRNA gegen S1P<sub>1-3</sub> inkubiert. Nach 24 h wurde die RNA isoliert, die cDNA durch reverse Transkription hergestellt und eine Real-Time PCR mit den Primern gegen S1P<sub>1</sub> (schwarze Balken), S1P<sub>2</sub> (weiße Balken) oder S1P<sub>3</sub> (graue Balken) wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. **B, C, D:** SPL-defiziente (-/-) Neuronen wurden mit siRNA gegen die S1P Rezeptoren 1, 2 und 3 bzw. mit dem entsprechenden Medium für 24 h vorinkubiert. Anschließend wurden sie für weitere 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M S1P behandelt. Viabilität (**B**), die relative Caspase Aktivität (**D**) sowie die genomische DNA (**C**) wurden analysiert. \*signifikant verschieden von K ( $p < 0,05$ ).

Ebenso wurde überprüft, ob das synthetische Analogon Cimes mit den S1P-Rezeptoren interagiert. Wildtyp Neuronen wurden wie im vorigen Experiment mit siRNA gegen drei S1P-Rezeptoren inkubiert. Auch hier verlief der Knock Down der Rezeptoren erfolgreich (**Abb. 35A**). Anschließend wurden die Viabilität, die Caspase Aktivität und die Integrität der genomischen DNA überprüft. In Gegenwart der siRNA gegen S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> wurde kein Unterschied in der Viabilität der Neuronen festgestellt (**Abb. 35B**). Auch die Aktivität der Caspasen (**Abb. 35D**) und die Fragmentierung der DNA (**Abb. 35C**) blieben in Anwesenheit der siRNA unverändert. Ebenso wie die S1P induzierte Apoptose ist auch der Cimes-induzierte Zelltod unabhängig von den S1P-Rezeptoren.



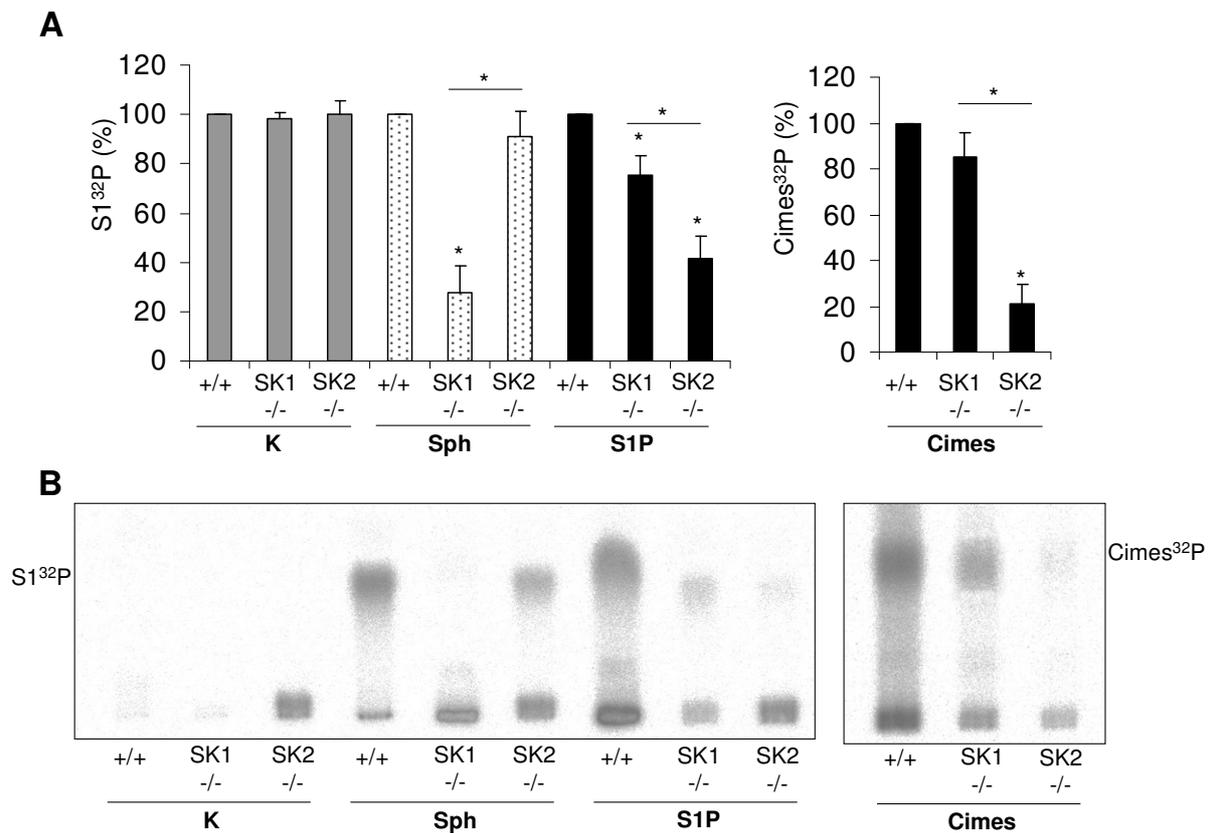
**Abb. 35: Die S1P-Rezeptoren 1-3 sind auch bei der Cimes induzierten Apoptose nicht beteiligt.** Neuronen wurden mit siRNA gegen die S1P Rezeptoren 1, 2 und 3 bzw. mit dem entsprechenden Medium für 24 h vorinkubiert. Anschließend wurden sie für weitere 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M Cimes behandelt. Viabilität (**B**), die relative Caspase Aktivität (**D**) sowie die genomische DNA (**C**) wurden analysiert. \*signifikant verschieden von K ( $p < 0,05$ ) **A**: Kontrolle des S1P<sub>1-3</sub> Rezeptoren Knock Downs durch siRNA. Neuronen wurden ohne (K) oder mit siRNA gegen S1P<sub>1-3</sub> inkubiert. Nach 24 h wurde die RNA isoliert, die cDNA durch reverse Transkription hergestellt und eine Real-Time PCR mit den Primern gegen S1P<sub>1</sub> (schwarze Balken), S1P<sub>2</sub> (weiße Balken) oder S1P<sub>3</sub> (graue Balken) wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

## 2.7 Unterschiede in der Phosphorylierung von exogenem Sphingosin und S1P

S1P induzierte in SPL-defizienten Neuronen Effekte, die denen von Cimes in Wildtyp Neuronen gleichen. Dabei ist allerdings zu bemerken, dass Sphingosin, das eigentliche Vorbild von Cimes, eine andere Wirkung aufwies. Zwar stieg der S1P Gehalt in SPL-defizienten Neuronen nach Zugabe von Sphingosin und S1P gleichermaßen an, aber nur die Inkubation mit S1P bewirkte Apoptose. Daraus ergab sich die Frage nach dem Schicksal der exogen angebotenen Sphingolipide. Es wurde bereits in anderen Zellen gezeigt, dass exogenes S1P nach der Internalisierung durch Lipid-Phosphatasen im Cytosol oder mittels der S1P-Phosphatase am ER dephosphoryliert wird (Mandala, 2001; Long et al., 2008). Für die intrazelluläre Rephosphorylierung des aus dem exogenen S1P entstandenen Sphingosins kamen unterschiedliche subzelluläre Entstehungsorte in Frage. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsexperimente in SK1- bzw. SK2-defizienten Neuronen durchgeführt. Kleinhirnneuronen wurden aus SK1- oder SK2-defizienten Mäusen präpariert, kultiviert und mit radioaktivem Phosphor ( $^{32}\text{P}$ ) markiert. Neu gebildetes  $\text{S1}^{32}\text{P}$  war somit radioaktiv markiert und konnte von dem hinzu gegebenen S1P unterschieden werden. Die Menge an  $\text{S1}^{32}\text{P}$  unterschied sich in SK1- oder SK2-defizienten Neuronen nicht von den Wildtypen (**Abb. 36A**, graue Balken). Nach der Zugabe von Sphingosin war in SK1-defizienten Neuronen die Bildung von  $\text{S1}^{32}\text{P}$  verglichen mit den Wildtypen um  $\sim 70\%$  reduziert, wohingegen die Abwesenheit der SK2 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung des Sphingosins hatte (**Abb. 36A**, gepunktete Balken). Dagegen war die Bildung von  $\text{S1}^{32}\text{P}$  aus zugegebenem S1P in den SK2-defizienten Neuronen um ca. 60% reduziert, während das Ausschalten der SK1 nur einen geringen Effekt ( $\sim 20\%$ ) auf die Bildung von  $\text{S1}^{32}\text{P}$  aus S1P hatte (**Abb. 36A**, schwarze Balken). Die Phosphorylierung von Cimes war in SK1-defizienten Neuronen ebenfalls nicht eingeschränkt, fehlte in SK2-defizienten Neuronen jedoch fast vollständig (ca. 80%, **Abb. 36A**).

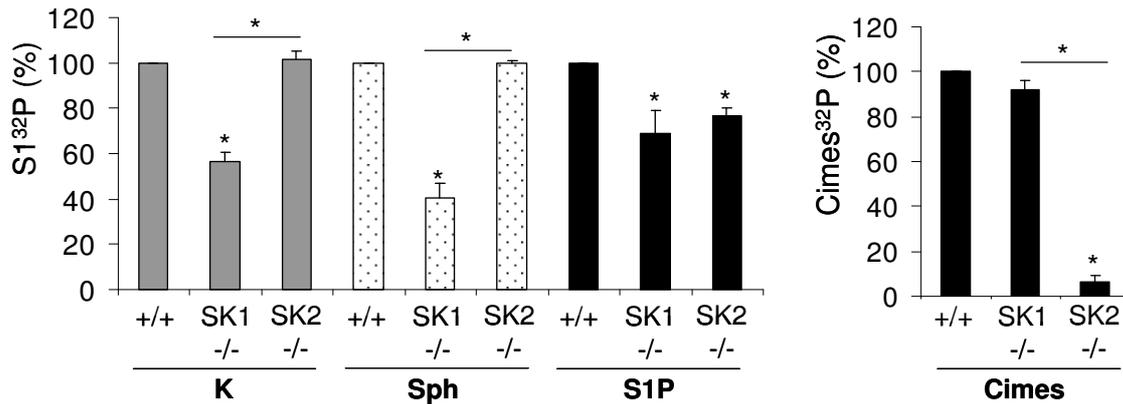
**Abbildung 36B** zeigt eine DC der Versuche. Es ist deutlich zu sehen, dass in den SK1-defizienten Mäusen aus zugegebenem Sphingosin kein  $\text{S1}^{32}\text{P}$  mehr gebildet wurde. Das Ausschalten der SK1 verringerte dagegen die Menge an rephosphoryliertem  $\text{S1}^{32}\text{P}$  aus S1P weniger als ein Fehlen der SK2. Ebenso wurde Cimes in SK2-defizienten Neuronen nicht mehr phosphoryliert.

Dies zeigt, dass SK1 und SK2 unterschiedlich an der Phosphorylierung von Sphingoidbasen beteiligt sind.



**Abb. 36: Isoformen der Sphingosinkinase (SK) tragen unterschiedlich zur Bildung von intrazellulärem S1P aus exogen zugegebenem Sphingosin bzw. S1P bei.** Wildtyp (+/+), SK1-defiziente (SK1 -/-) und SK2-defiziente (SK2 -/-) Neuronen wurden mit phosphatfreiem MEM gewaschen und im selben Medium mit <sup>32</sup>P (30 μ Ci/ml) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde Lösungsmittel (K, graue Balken), Sphingosin (Sph, gepunktete Balken), S1P (schwarze Balken) oder Cimes (je 10 μM) zugegeben. Nach 1 h wurden die Zellen geerntet und die Sphingoidphosphate extrahiert, mittels DC getrennt und quantifiziert (A). Die Daten beziehen sich auf die jeweilige wildtyp Kontrolle (+/+ K). **B:** Dünnschichtchromatographie. \*signifikant verschieden von der jeweiligen wildtyp Kontrolle (+/+ K) oder voneinander (p<0,05). Laufmittel 80:20:10:20 1-Butanol / Methanol / Eisessig / H<sub>2</sub>O.

Derselbe Versuch wurde vergleichend im MEFs (mouse embryonic fibroblasts) durchgeführt (**Abb. 37**). Die MEFs wurden ebenso wie die Neuronen mit radioaktivem Phosphor (<sup>32</sup>P) markiert. Die Phosphorylierung der Sphingoidbasen betreffend verhielten sich die MEFs bis auf zwei Unterschiede genauso wie die Neuronen. Der erste Unterschied bestand in dem starken Rückgang von intrazellulärem S1<sup>32</sup>P in den Kontrollen der SK1-defizienten MEFs, wohingegen ein Fehlen der SK2 keinen Einfluss auf die Menge an neu gebildetem S1<sup>32</sup>P hatte (**Abb. 37**, graue Balken). Der zweite Unterschied fand sich in der Rephosphorylierung des S1P. In Abwesenheit einer der beiden Kinasen wurde die Menge an radioaktiv markiertem S1<sup>32</sup>P um ca. 30% reduziert, unabhängig davon, welche SK vorhanden war (**Abb. 37**, schwarze Balken). Sphingosin wurde in den MEFs ebenso wie in den Neuronen von der SK1 phosphoryliert (**Abb. 37**, gepunktete Balken) und Cimes von der SK2 (**Abb. 37**).

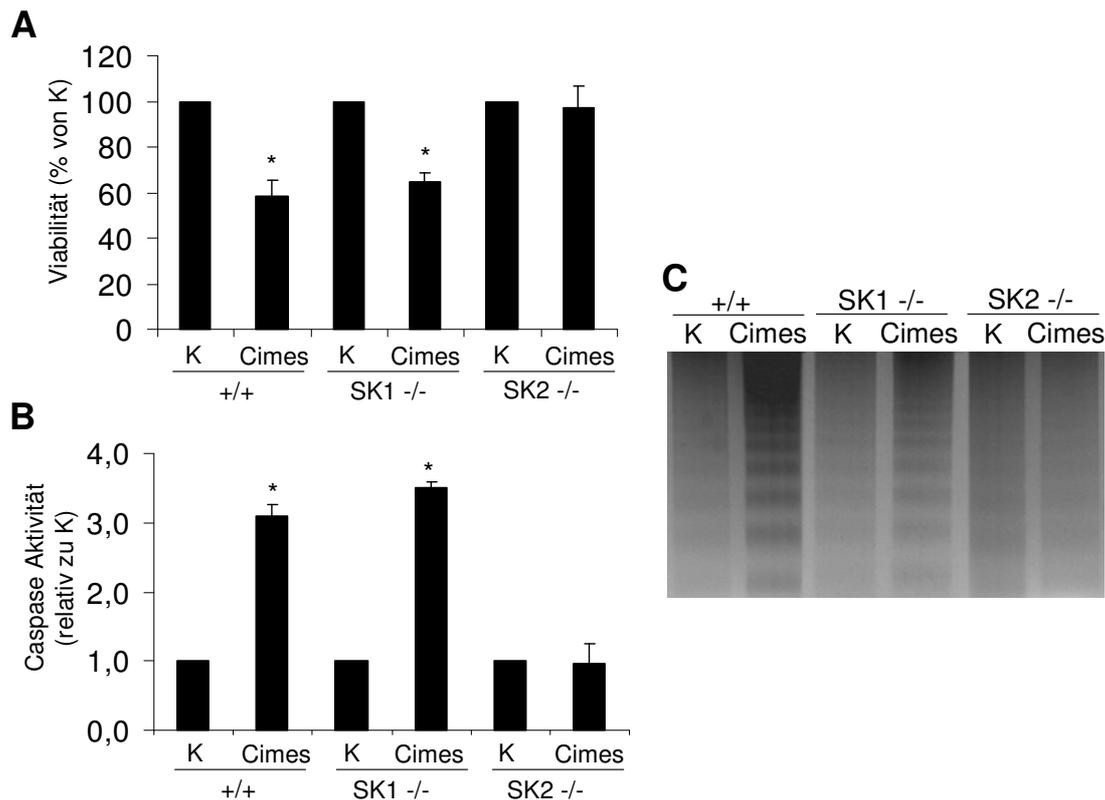


**Abb. 37: Isoformen der Sphingosinkinase (SK) tragen unterschiedlich zur Bildung von intrazellulärem S1P aus exogen zugegebenem Sphingosin bzw. S1P in MEFs bei.** Wildtyp (+/+), SK1-defiziente (SK1 -/-) und SK2-defiziente (SK2 -/-) MEFs wurden mit phosphatfreiem MEM gewaschen und im selben Medium mit <sup>32</sup>P (30 μ Ci/ml) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde Methanol (K, graue Balken), 10 μM Sphingosin (Sph, gepunktete Balken), S1P (schwarze Balken) oder Cimes zugegeben. Nach 1 h wurden die Zellen geerntet und die Sphingoid-Phosphate (S1P, CimesP) extrahiert, mittels DC getrennt und quantifiziert wie im Methodenteil angegeben. Die Daten beziehen sich auf die jeweilige wildtyp Kontrolle (+/+ K). \*signifikant verschieden von der jeweiligen +/+ Kontrolle oder voneinander (p<0,05). 80:20:10:20 1-Butanol / Methanol / Eisessig / H<sub>2</sub>O

Damit unterscheidet sich die Phosphorylierung der Sphingosins durch die beiden Sphingosin-Kinase Isoformen in MEFs und Neuronen.

## 2.8 Die Phosphorylierung von Cimes durch die Sphingosin-Kinase2 ist essentiell für dessen neurotoxische Wirkung

Cimes und S1P wurden größtenteils von der SK2 phosphoryliert und wirkten beide toxisch in Wildtyp bzw. SPL-defizienten Neuronen. Sphingosin wurde von der SK1 phosphoryliert und führte in SPL-defizienten Neuronen nicht zu Apoptose. Um zu überprüfen, ob die Induktion der Apoptose mit der Phosphorylierung durch die SK2 verbunden war, wurden SK1- und SK2-defiziente Neuronen für 24 h mit 10 μM Cimes inkubiert und mit ebenso behandelten Wildtyp Neuronen verglichen. Diese Versuche wurden mit dem stabilen Analogon Cimes durchgeführt, da die S1P-Lyase in den Sphingosin-Kinase defizienten Neuronen aktiv ist und den schnellen Abbau von S1P katalysiert. Wie in **Abbildung 38A** zu erkennen ist, reduzierte Cimes die Viabilität von wildtyp und SK1-defizienten Neuronen, nicht aber jene von SK2-defizienten Neuronen. Entsprechend wurde eine Aktivierung der Caspasen nur in wildtyp und SK1-defizienten Zellen detektiert (**Abb. 38B**), ebenso wie die Fragmentierung der DNA (**Abb. 38C**).

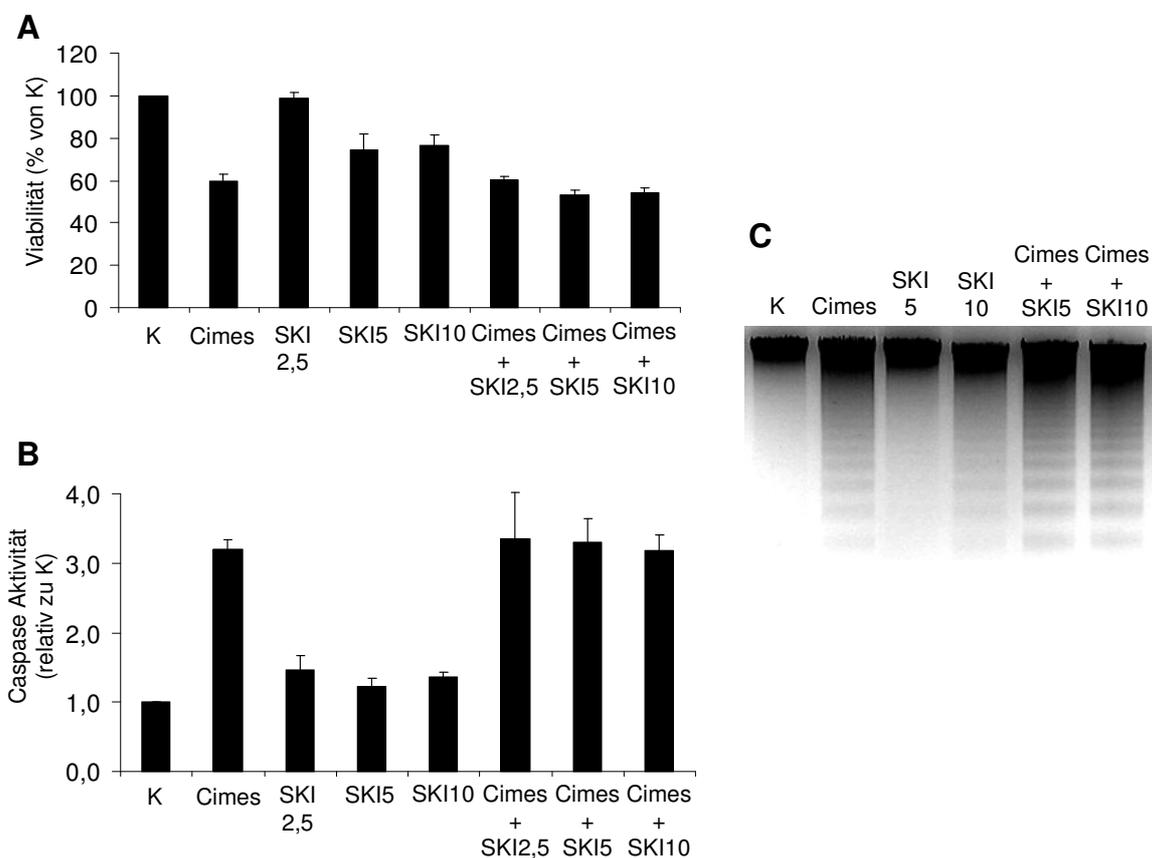


**Abb. 38: Cimes induziert keine Apoptose in SK2-defizienten Neuronen.** Wildtyp (+/+), SK1-defiziente (SK1 -/-) und SK2-defiziente (SK2 -/-) Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M Cimes behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität (A), die relative Effektor-Caspase Aktivität (B) sowie die genomische DNA (C) analysiert. \* signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle ( $p < 0,05$ ).

### 2.8.1 Die Sphingosin-Kinase1 hat keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose

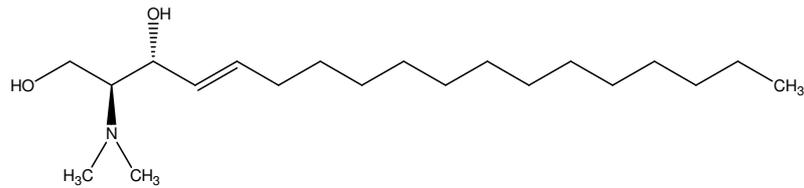
Um die zuvor beschriebenen Ergebnisse zu validieren, wurde der pharmakologische Sphingosin-Kinase-Inhibitor2 (hier: SKI, Hersteller: SPHKI2) 4-[[4-(4-chlorophenyl)-2-thiazolyl]amino]-phenol ( $C_{15}H_{11}ClN_2OS$ ) verwendet, der die Aktivität der Sphingosin-Kinase1 hemmt. Drei verschiedene Ansätze mit 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M wurden getestet, um die optimale Konzentration des Inhibitors zu finden. Die Vorinkubation mit SKI betrug 30 min. Den Kleinhirneuronen wurde für 24 h Lösungsmittel als Kontrolle, 10  $\mu$ M Cimes, die entsprechende Konzentration an SKI und eine Kombination aus SKI und Cimes zugegeben. Die beiden höheren Konzentrationen von SKI verringerten den Anteil lebensfähiger Zellen um ca. 20%, während die niedrige Konzentration von 2,5  $\mu$ M keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausübte (Abb. 39A). Allerdings hatte keine der drei getesteten Konzentrationen des Inhibitors eine Reduktion der Cimes-induzierten Toxizität zur Folge. Ungeachtet der Zugabe des Inhibitors fand Apoptose in den mit Cimes inkubierten Neuronen statt (Abb. 39B, C).

Der Inhibitor alleine hatte keinen Effekt auf die Aktivität der Caspasen, führte in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  allerdings zu einer leichten Fragmentierung der DNA (**Abb. 39C**). Der Versuch mit dem SK1 Inhibitor SKI bestätigt das Ergebnis, dass Cimes durch die SK2 phosphoryliert wird.



**Abb. 39: Die Hemmung der Sphingosin-Kinase1 hat keinen Einfluss auf die Cimes induzierte Apoptose.** Kleinhirnneuronen wurden für 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu\text{M}$  Cimes, 2,5, 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Sphingosin-Kinase1 Inhibitor (SKI) oder einer Kombination aus Cimes und SKI (Cimes + SKI) inkubiert. Die Vorinkubation mit SKI betrug 30 min. Die Viabilität (**A**), die Effektor-Caspase Aktivität (**B**) und die DNA Fragmentierung (**C**) wurden bestimmt. Die Caspase Aktivität ist relativ zu K angegeben.

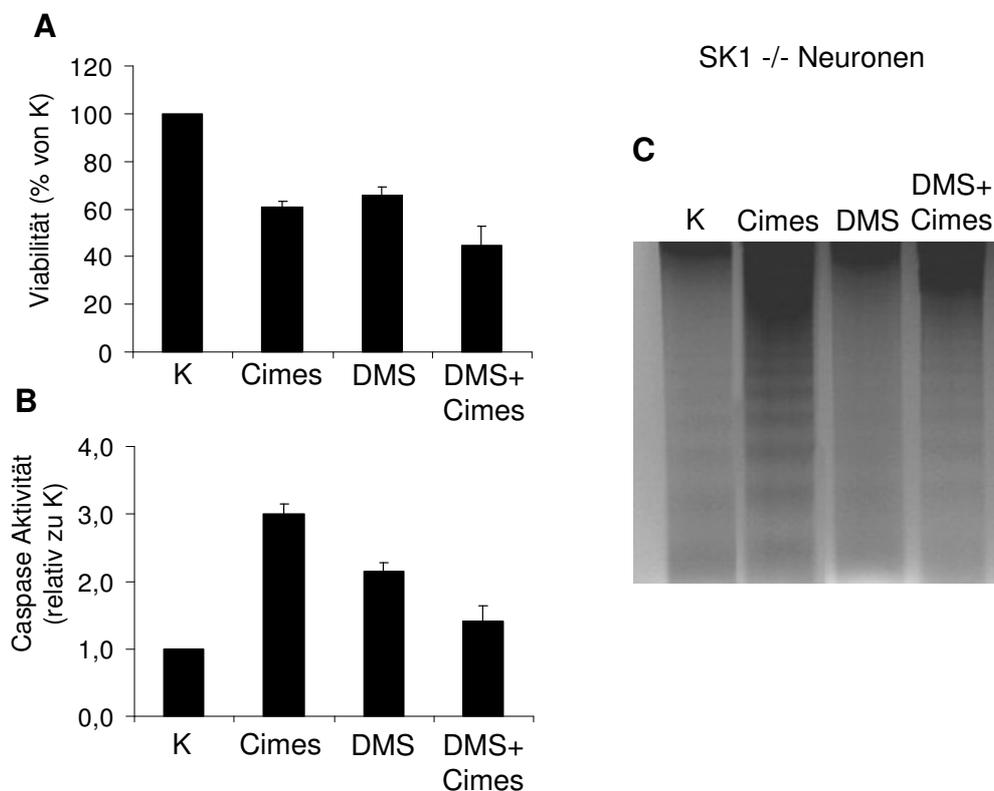
Anschließend wurden SK1-defiziente Neuronen mit DMS (D-erythro-N,N-Dimethylsphingosin,  $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{NO}_2$ ), einem Inhibitor beider Sphingosin-Kinasen behandelt (**Abb. 40**). Da die SK1 in diesen Zellen nicht vorhanden ist, führte die Verwendung von DMS zu einer Inhibierung der SK2, so dass keine Sphingosin-Kinase Aktivität mehr vorhanden sein sollte.



**Abb. 40: DMS, Inhibitor beider Sphingosin-Kinasen.** D-erythro-N,N-Dimethylsphingosin,  $C_{20}H_{41}NO_2$

Wie in **Abbildung 41A** dargestellt, reduzierte DMS die Viabilität der SK1-defizienten Neuronen ähnlich wie Cimes. Wurden beide Analoga zusammen gegeben, addierte sich ihre cytotoxische Wirkung anstelle einer Reduktion der Cimes induzierten Apoptose. Sowohl Cimes als auch DMS aktivierten die Caspasen (**Abb. 41B**), allerdings führte nur Cimes zu einer Fragmentierung der genomischen DNA (**Abb. 41C**). Cimes und DMS zusammen bewirkten jedoch trotz einer reduzierten Zellviabilität weder eine Caspase Aktivierung noch eine DNA-Fragmentierung (**Abb. 41B, C**). Es ist daher anzunehmen, dass es unter diesen Bedingungen zu einem nekrotischen Neuronensterben kam.

Demnach kann abschließend festgestellt werden, dass die simultane Inhibierung beider SK cytotoxisch ist und in Gegenwart von Cimes Nekrose hervorruft.

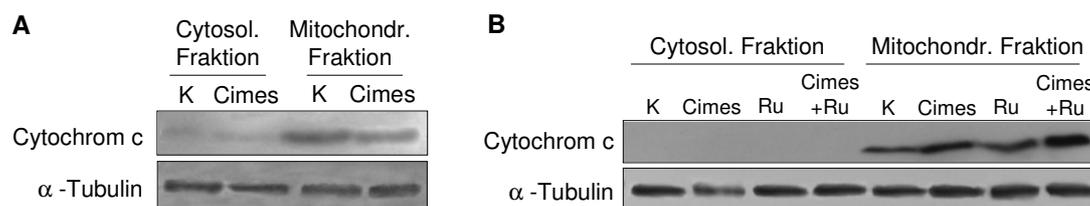


**Abb. 41: DMS bewirkt Nekrose in SK1-defizienten Neuronen.** SK1-defiziente Neuronen wurden am fünften Kulturtag für 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 5  $\mu$ M DMS oder einer Kombination aus beiden (Cimes + DMS) inkubiert. Die Vorinkubation mit DMS betrug 30 min. Die Viabilität (**A**), die Effektor-Caspase Aktivität (**B**) und die DNA Fragmentierung (**C**) wurden wie im Methodenteil angegeben bestimmt. Die Caspase Aktivität ist relativ zu K angegeben.

## 2.9 Mitochondrien sind nicht an der Sphingoidphosphat (Cimes, S1P) induzierten Apoptose beteiligt

Die zentrale Rolle der Mitochondrien während der Apoptose ist gut dokumentiert (Kaufmann and Hengartner, 2001). Bei der mitochondrial vermittelten Apoptose kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren mitochondrialen Membran in das Cytosol (Leist and Nicotera, 1998). Um nun festzustellen, ob Mitochondrien an der Cimes induzierten Apoptose beteiligt sind, wurde die Freisetzung des Cytochrom c ins Cytosol untersucht. Wenn die Mitochondrien an der Apoptose beteiligt wären, bildeten sich Poren in der inneren Membran und ihr Cytochrom c fände sich im Cytosol der Zelle wieder.

Neuronen aus Wildtyp Mäusen wurden 24 h lang mit 10  $\mu$ M Cimes behandelt. Um das Cytochrom c zu bestimmen, wurde Zellprotein aus der mitochondrialen und der cytosolischen Fraktion isoliert (vergleiche Kapitel 5.18 für die Methode) und mittels eines Antikörpers gegen Cytochrom c detektiert. **Abbildung 42A** zeigt deutlich, dass sich in den mit Cimes behandelten Proben kein Cytochrom c in der cytosolischen Fraktion befand.

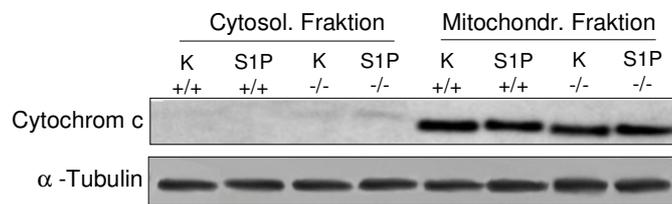


**Abb. 42: Die Cimes induzierte Apoptose ist Mitochondrien-unabhängig.** Western Blot Analyse des Cytochrom c in der cytosolischen bzw. mitochondrialen Fraktion. Kleinhirnneuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M Cimes (**A**) oder zusätzlich mit 10  $\mu$ M Ru360 (Ru) oder 10  $\mu$ M Ru360 und 10  $\mu$ M Cimes (Ru + Cimes) (**B**) für 24 h inkubiert. Die Lysate wurden mit einem Cytochrom c Antikörper analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Auftragskontrolle verwendet.

Da die Aufnahme von Calcium für die Freisetzung des Cytochrom c während der Apoptose essentiell ist (Nutt et al., 2002), wurde die Cytochrom c Freisetzung zusätzlich in Gegenwart von Ru360, einem Inhibitor, der die mitochondriale Calciumaufnahme blockiert, untersucht. Ru360 beeinflusste weder in den Kontrollen noch in Gegenwart von Cimes die Freisetzung des Cytochrom c (**Abb. 42B**).

Um die zuvor beschriebenen Ergebnisse zu validieren wurde der Versuch zudem mit S1P in wildtyp und SPL-defizienten Neuronen wiederholt. Auch hier blieb das Ergebnis negativ; es wurde in keiner Probe Cytochrom c im Cytosol gefunden (**Abb. 43**).

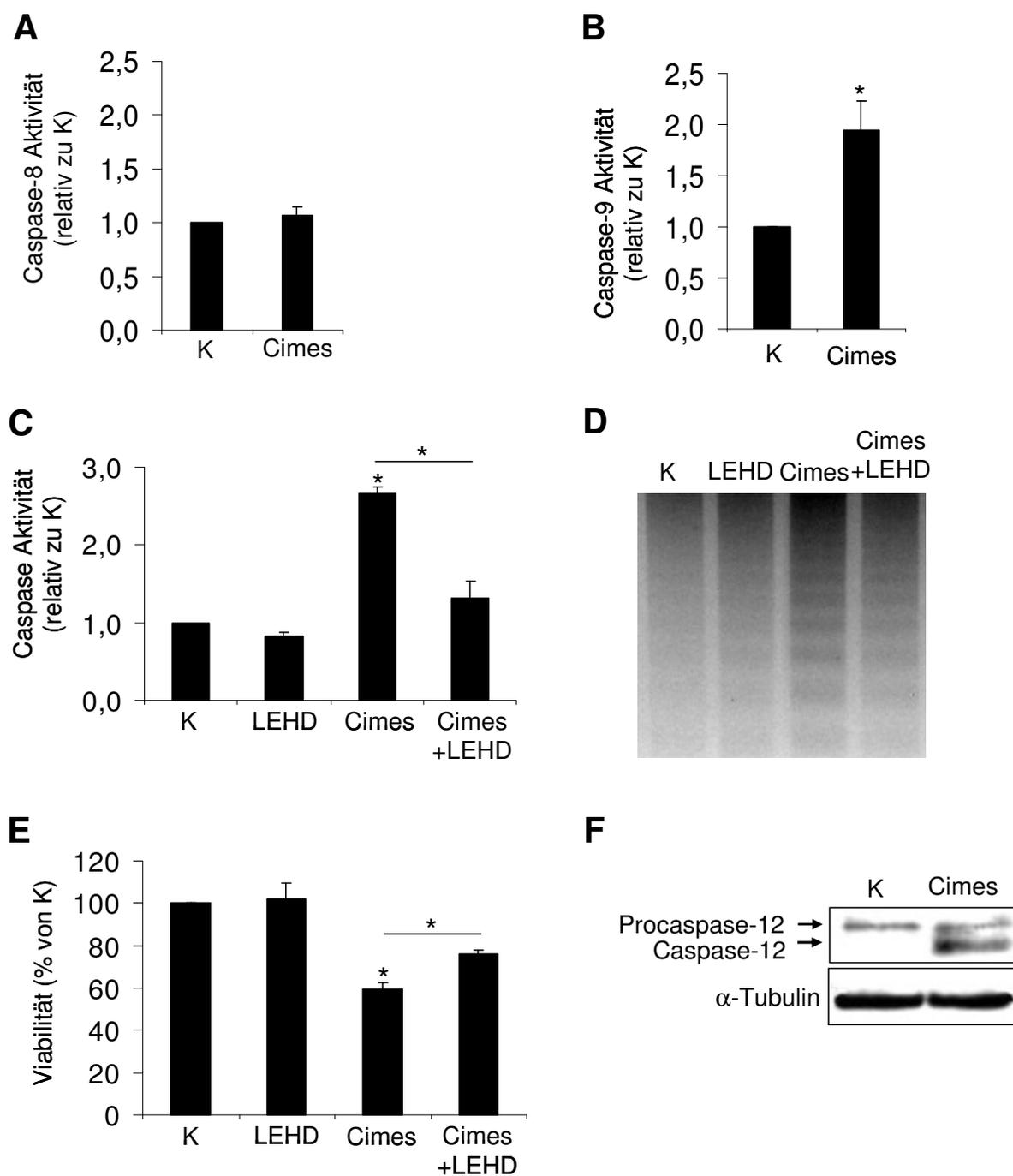
Diese Versuche deuten darauf hin, dass die von Cimes in wildtyp Neuronen und von S1P in SPL-defizienten Neuronen ausgelöste Apoptose unabhängig von den Mitochondrien verläuft.



**Abb. 43: Die S1P induzierte Apoptose in SPL-defizienten Neuronen ist auch Mitochondrien-unabhängig.** Western Blot Analyse des Cytochrom c in der cytosolischen bzw. mitochondrialen Fraktion. Kleinhirnneuronen aus wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M S1P für 24 h inkubiert. Die Lysate wurden mit einem Cytochrom c Antikörper analysiert.  $\alpha$ -Tubulin wurde als Auftragskontrolle verwendet

## 2.10 Caspase-9 und Caspase-12 vermitteln die Mitochondrien-unabhängige Apoptose.

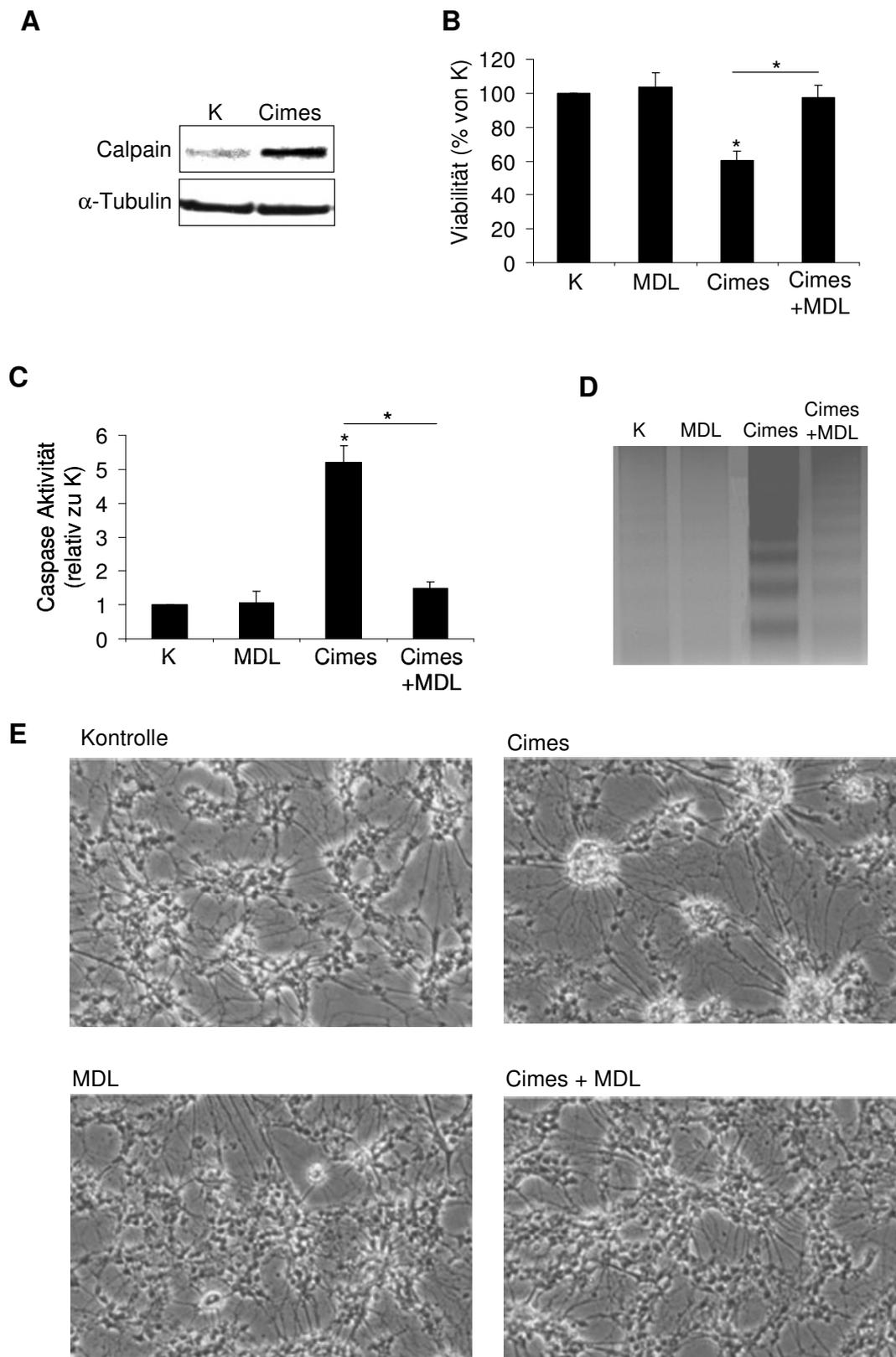
Wie zuvor gezeigt, ist die Aktivität der Effektor-Caspasen in mit Cimes behandelten Neuronen erhöht. Der nächste Schritt war nun die Untersuchung, welche Initiator-Caspasen für die Aktivierung der Caspase-3 verantwortlich sind. Caspase-8 wurde in Gegenwart von Cimes nicht aktiviert (**Abb. 44A**). Überraschenderweise wurde jedoch eine erhöhte Aktivität von Caspase-9 gefunden (**Abb. 44B**), die normalerweise mit dem mitochondrialen Apoptoseweg verbunden ist, der zuvor jedoch ausgeschlossen wurde (siehe Abschnitt 2.9). Um dieses unerwartete Ergebnis zu bestätigen, wurde der Caspase-9-Inhibitor Z-LEHD-fmk verwendet. Der Inhibitor verhinderte fast vollständig die Aktivierung von Caspase-3 (**Abb. 44C**). Obwohl Z-LEHD die Aktivierung der Caspasen durch Cimes fast gänzlich unterband, blieb der Einfluss des Inhibitors auf Viabilität und DNA-Integrität gering (**Abb. 44D, E**). Da Caspase-9 unabhängig von den Mitochondrien aktiviert wurde, wurde nach einer Alternative für die Aktivierung dieser Initiator-Caspase gesucht. Eine solche zeigte sich in der Gestalt der Caspase-12, die einen Teil des ER-Stress spezifischen apoptotischen Signalweges darstellt. Mit Lösungsmittel bzw. Cimes behandelte Neuronen wurden mittels eines Caspase-12 Antikörpers, der sowohl die Pro-Caspase-12 wie auch die gespaltene und damit aktive Caspase-12 erkennt, auf die Caspase-12 Expression hin untersucht. In Übereinstimmung mit dem ER-Stress spezifischen Signalweg konnte in Gegenwart von Cimes die aktive Form der Caspase-12 detektiert werden (**Abb. 44F**), welche Caspase-9 unabhängig von den Mitochondrien aktivieren kann.



**Abb. 44: Caspase-9 und Caspase-12 vermitteln die Cimes induzierte, Mitochondrien-unabhängige Apoptose.** Aktivitätsassay von Caspase-8 (A) und -9 (B): Neuronen wurden 24 h lang mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) oder 10  $\mu$ M Cimes inkubiert. Für den Effektor-Caspase Assay (C), die DNA Analyse (D) und den Viabilitätstest (E) wurden die Zellen zusätzlich mit 100  $\mu$ M Z-LEHD-fmk (LEHD) oder einer Kombination aus LEHD und Cimes behandelt. Die Caspase Aktivität ist relativ zu K. F: Western Blot der Caspase-12 Expression. Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K) bzw. 10  $\mu$ M Cimes 24 h inkubiert. Die Lysate wurden mit einem Antikörper, der Procaspase-12 und Caspase-12 erkennt analysiert. Als Auftragskontrolle diente die Expression von  $\alpha$ -Tubulin. \* signifikant verschieden von K oder voneinander ( $p < 0,05$ ).

## 2.11 Calpain vermittelt die Cimes induzierte Apoptose

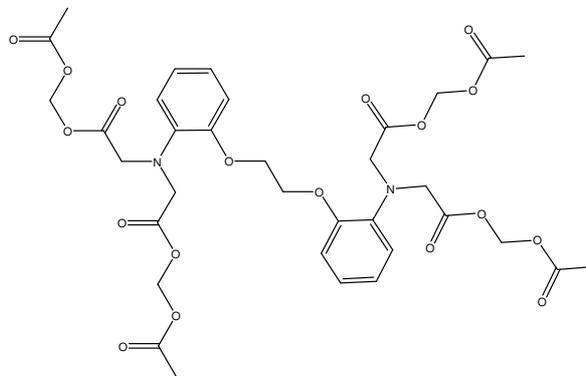
Wie in **Abbildung 44** dargestellt ist, blieb sowohl eine verminderte Viabilität als auch die Fragmentierung der DNA trotz fast vollständigen Fehlens der Caspase Aktivität bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass Sphingoidphosphate eine Calcium-Freisetzung aus dem ER induzieren (Meyer Zu Heringdorf, 2004) und Caspase-12 Teil eines ER-stress spezifischen Signalweges ist (Nakagawa and Yuan, 2000), wurde die Beteiligung Calcium-abhängiger Enzyme in Betracht gezogen. Tatsächlich konnte in mit Cimes inkubierten Neuronen eine stark erhöhte Calpain Expression detektiert werden (**Abb. 45A**). Calpain ist eine cytosolische Protease, welche durch Veränderungen des cytosolischen Calciumspiegels gesteuert wird (Neumar et al., 2003). Um nun zu klären, ob Calpain tatsächlich Teil des Cimes induzierten apoptotischen Signalweges war, wurde der pharmakologische Calpain Inhibitor MDL28170 eingesetzt, der spezifisch die Calpain Aktivität hemmt (Mehdi et al., 1988). Die Neuronen wurden 1 h lang mit 10  $\mu$ M MDL vorbehandelt, anschließend erfolgte die Inkubation mit 10  $\mu$ M Cimes für 24 h. Erstaunlicherweise führte die Inhibierung von Calpain zu einem vollständigen Rückgang der Cimes induzierten Apoptose (**Abb. 45B**). Ebenso konnte weder eine Aktivierung der Caspasen (**Abb. 45C**) festgestellt werden, noch eine Fragmentierung der genomischen DNA (**Abb. 45D**). Die Inhibierung von Calpain verhinderte überdies die durch Cimes hervorgerufenen morphologischen Veränderungen (**Abb. 45E**). Neuronen, die mit Cimes behandelt wurden wiesen die typischen Veränderungen in der Morphologie auf, die sich in der Bildung von Zell-Aggregaten, welche durch radial verlaufende Neuriten verbunden waren zeigte. Dagegen induzierte Cimes in Gegenwart von MDL keine morphologischen Änderungen.



**Abb. 45: Calpain vermittelt die Neurotoxizität von Cimes.** Neuronen wurden für 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL 28170 oder einer Kombination aus beiden (Cimes + MDL) inkubiert. Die Vorinkubation mit MDL betrug 1 h. Die Expression von Calpain (A) wurde mittels Western Blotting unter Verwendung eines Calpain Antikörpers in den Lysaten analysiert.  $\alpha$ -Tubulin diente als Auftragskontrolle. Die Viabilität (B), die Effektor-Caspase Aktivität (D) und die DNA Fragmentierung (B) wurden bestimmt. Die Caspase Aktivität ist relativ zu K. Die Morphologischen Änderungen (E) wurden nach der oben beschriebenen Behandlung mittels mikroskopischer Phasenkontrastaufnahme untersucht.  $\times 100$ . \* $p < 0,05$ .

## 2.12 Die Reaktivierung des Zellzyklus ist abhängig von Calpain und CDK5/p25.

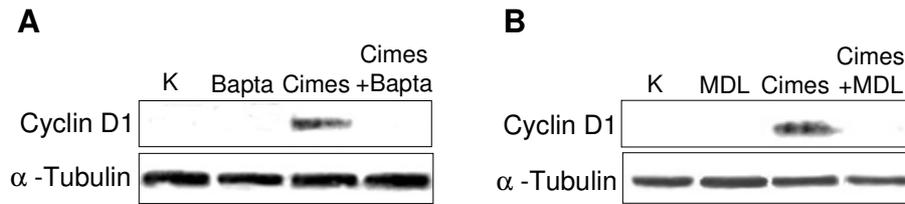
Wie bereits gezeigt, ist die Reaktivierung des Zellzyklus Teil der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose in Neuronen (Naetzker et al., 2006; Hagen et al., 2009). Der Effekt von MDL, den Cimes induzierten neuronalen Zelltod vollständig zu verhindern, gab den Anstoß, die Beteiligung von Calpain auch an der Reaktivierung des Zellzyklus zu untersuchen. Einleitend wurde der Zusammenhang zwischen dem Zellzyklus und einer cytosolischen Calciumerhöhung, durch die Calpain aktiviert wird analysiert. Hierzu wurde mittels Western Blot überprüft, ob eine Verringerung des cytosolischen Calciumlevels die Cimes induzierte Expression von Cyclin D1 beeinflusste. Der zellpermeable Calciumchelator Bapta-AM (**Abb. 46**) wurde eingesetzt, um das cytosolische Calcium zu komplexieren und damit die intrazelluläre Calciumkonzentration zu senken. Bapta ist mit Acetomethylgruppen (AM) verestert, was die Aufnahme in die Zellen erleichtert und eine Reaktion mit dem Calcium im Medium verhindert. In der Zelle werden die Acetomethylgruppen von Esterasen abgespalten, woraufhin Bapta innerhalb der Zellen verbleibt und nur das intrazelluläre Calcium komplexiert (Dieter et al., 1993).



**Abb. 46: Bapta.** Calciumchelator, 1,2-bis-(2-aminophenoxy-)ethan-tetra-acetat.

Bapta-AM konnte die Cimes induzierte Cyclin D1 Expression vollständig verhindern (**Abb. 47A**).

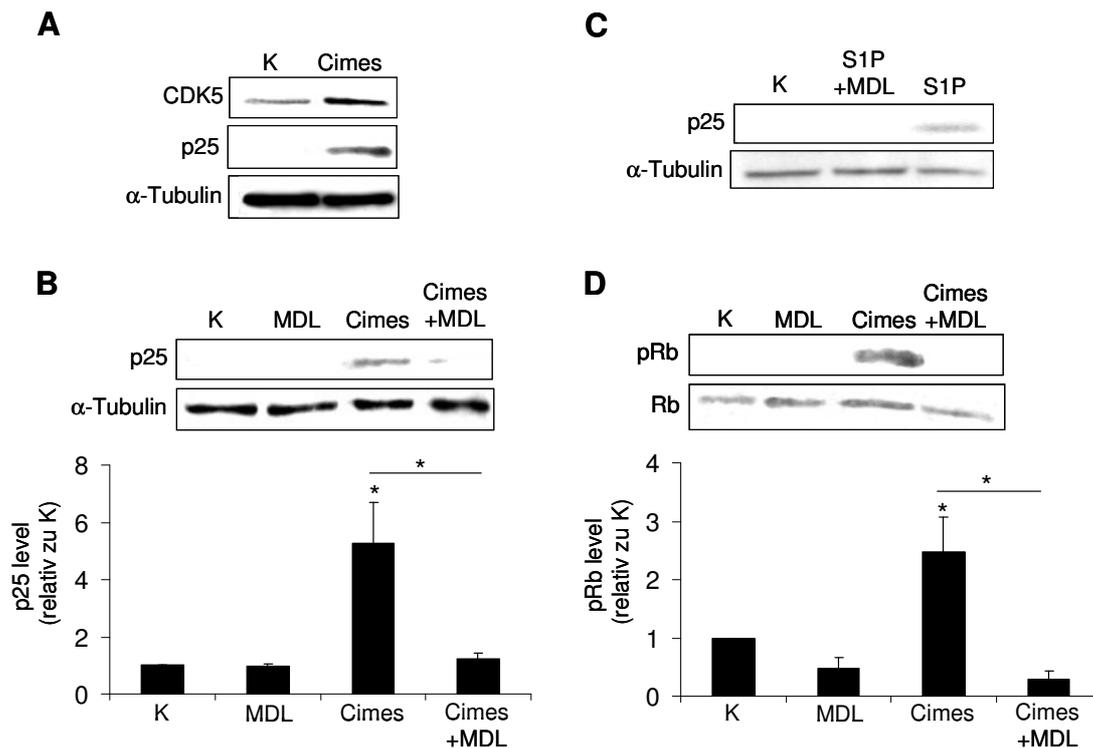
Dieses Ergebnis deutete auf eine Verbindung zwischen der Reaktivierung des Zellzyklus und des durch Cimes erhöhten cytosolischen Calciums hin. Als logische Konsequenz dieses Ergebnisses wurde nun Calpain mittels MDL inhibiert und die Expression von Cyclin D1 erneut analysiert (**Abb. 47B**). Die Inhibierung von Calpain führte zu demselben Resultat wie die Komplexierung des intrazellulären Calciums; die Cimes induzierte Expression von Cyclin D1 wurde unterbunden.



**Abb. 47: Die Reaktivierung des Zellzyklus ist abhängig von Calpain.** Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M Bapta-AM (Bapta) oder einer Kombination aus Bapta und Cimes (Bapta + Cimes) (A) bzw. mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL 28170 (MDL) oder einer Kombination aus MDL28170 und Cimes (B) für 24 h behandelt. Die Vorinkubation mit MDL betrug 1 h. Die Lysate der Zellen wurden mit einem CyclinD1 Antikörpern analysiert. Als Auftragskontrolle diente die Expression von  $\alpha$ -Tubulin.

Der nächste Schritt war nun die Identifikation Calpain gesteuerter Proteine, die eine Reaktivierung des Zellzyklus ermöglichen. Hierzu wurden Neuronen mit 10  $\mu$ M Cimes oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Protein isoliert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels des entsprechenden Antikörpers untersucht. In Gegenwart von Cimes wurde schließlich eine leichte Erhöhung der CDK5 Expression detektiert sowie die Anwesenheit des Proteins p25 (**Abb. 48A**). Die CDK5 (cyclin dependent kinase) katalysiert die Phosphorylierung zahlreicher Substrate und ist für die Entwicklung und Funktion des Gehirns essentiell. Diese Kinase wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und wird trotz einiger Sequenzhomologien mit anderen CDKs nicht von Cyclinen gesteuert, sondern von der regulatorischen Untereinheit p35, die von Proteasen wie Calpain zu dem C-terminalen Fragment p25 gespalten werden kann. p25 bindet stärker als p35 an die CDK5, was eine Überaktivierung der Kinase zur Folge hat (Dhavan and Tsai, 2001). Die Spaltung des CDK5 Regulators p35 zu p25 wurde von dem Calpain Inhibitor MDL verhindert (**Abb. 48B**). p25 konnte auch in SPL-defizienten Neuronen nach Zugabe von S1P detektiert werden, nicht aber wenn die Zellen zuvor mit MDL inkubiert worden waren (**Abb. 48C**).

Die Aktivierung der CDK5 sowie die Aktivierung der Cyclin D1 gesteuerten CDK4 können zur Phosphorylierung von Rb (retinoblastoma protein) führen, einem der essentiellen Schritte bei der Zellzyklus Reaktivierung (Weinberg, 1995; Lee et al., 1997; Tannoch et al., 2000). Tatsächlich wurden erhöhte Mengen an phosphoryliertem Rb (pRb) in Gegenwart von Cimes gefunden (**Abb. 48D**). Eine Vorinkubation der Neuronen mit dem Calpain Inhibitor MDL verhinderte jedoch das Auftreten von pRb (**Abb. 48D**).



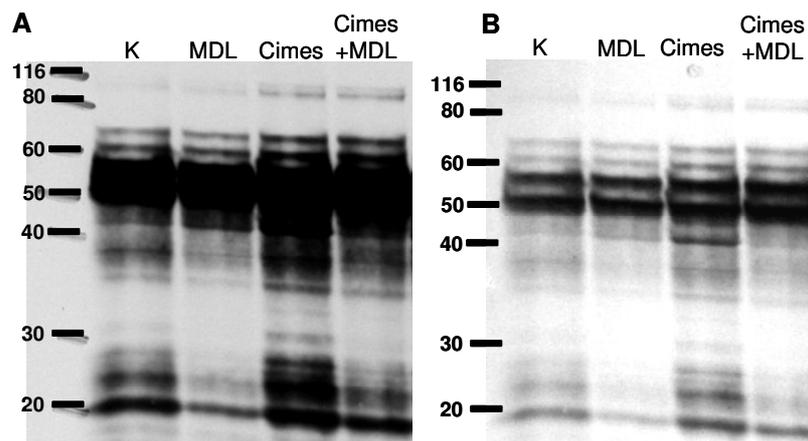
**Abb. 48: Die Reaktivierung des Zellzyklus wird über die Calpain vermittelte Aktivierung des CDK5/p25 Komplexes ermöglicht.** Kleinhirnneuronen wurden wie folgt behandelt: **A:** Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes für 24 h. **B:** SPL-defiziente Neuronen wurden für 24 h mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M S1P oder einer Kombination aus S1P und MDL (beide 10  $\mu$ M) inkubiert. **C und D:** Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL 28170 (MDL) oder eine Kombination aus beiden (MDL + Cimes) für 24 h. **C:** Western Blot Analyse, p25 Signal auf  $\alpha$ -Tubulin bezogen und relativ zu K. **D:** Western Blot Analyse, pRb Signal auf Rb bezogen und relativ zu K. Die Vorinkubation mit MDL betrug 1 h. Die Lysate wurden mit Antikörpern gegen CDK5, p35 C-Terminus (für p25) und pRb bzw. Rb analysiert. Als Auftragskontrolle diente die Expression von  $\alpha$ -Tubulin. \* signifikant verschieden von K oder voneinander ( $p < 0,05$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reaktivierung des Zellzyklus mit der cytosolischen Calciuserhöhung und der Calpain-abhängigen Bildung von CDK5/p25 sowie der Phosphorylierung von Rb zusammenhängt.

### 2.13 Einfluss von Cimes auf das Tau Protein

Das klinische Erscheinungsbild vieler neurodegenerativer Krankheiten beruht auf einer Degeneration von Nervenzellen und Synapsen. Neben der Neurodegeneration kommt es nicht nur bei Morbus Alzheimer zur extrazellulären Bildung von Amyloid Plaques und / oder der intrazellulären Akkumulation von Tau Fibrillen. Beide Veränderungen sind krankheitstypisch, jedoch nicht spezifisch. Sie sind auch bei einer Reihe anderer neurodegenerativer Krankheiten nachweisbar. Die beobachtete neurotoxische Wirkung von Cimes gab den Anlass mögliche Veränderungen im Tau Expressionsmuster und dessen Phosphorylierungen zu suchen.

Im adulten Gehirn entstehen durch alternatives Spleißen der Tau-mRNA 6 unterschiedliche Isoformen (Goedert et al., 1989). Diese zeigen sich in der SDS-PAGE als 3-4 nah beieinander liegende Banden bei ca. 45-55, 64 und 69 kDa, einer schwächeren Bande bei 72-74 kDa und einer nicht immer detektierbaren Bande bei 116 kDa. Durch proteolytische Enzyme wie Calpain können kürzere Tau Fragmente auftreten, die die Bildung der Tau Fibrillen fördern (Park and Ferreira, 2005). Unter Verwendung des Tau Antikörpers K9JA, der alle Isoformen von Tau erkennt, wurde ein Tau Profil der in dieser Arbeit verwendeten Neuronen erstellt (**Abb. 49**). Hierfür wurden die Neuronen für 24 h lang mit Lösungsmittel als Kontrolle, 10  $\mu$ M MDL28170, 10  $\mu$ M Cimes sowie einer Kombination aus 10  $\mu$ M MDL28170 und 10  $\mu$ M Cimes inkubiert. Anschließend wurde das Zell-Protein isoliert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels K9JA auf die Tau Expression untersucht. **Abbildung 49A und B** zeigen denselben Lauf, der auf zwei unterschiedlich sensitiven Filmen entwickelt wurde. Erwartungsgemäß sind die zahlreichen Spleißformen von Tau zu erkennen, sogar die Bande bei 116 kDa ist auf dem sensitiveren Film (**Abb. 49A**) schwach zu sehen. Auffallend ist die zusätzliche Bande bei 30 kDa in der Kontrolle, die in Gegenwart von Cimes besonders deutlich erkennbar ist. Das Verschwinden der Bande bei gleichzeitiger Gabe von MDL weist jedoch darauf hin, dass es sich bei dieser Bande um ein Calpain generiertes Tau-Fragment handeln könnte. MDL alleine scheint keinen qualitativen aber einen quantitativen Einfluss auf das Tau Vorkommen zu haben, denn viele Banden wirken im Vergleich zu den Kontrollbanden schwächer.

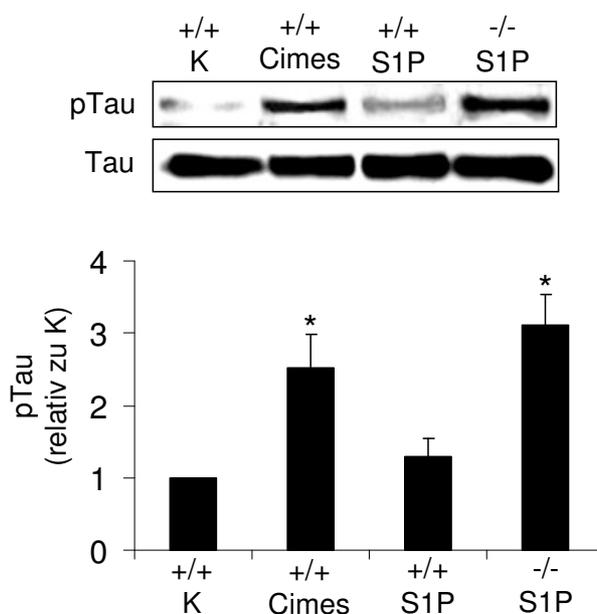


**Abb. 49: Expression des Tau-Proteins.** Western Blot Analysen von neuronalen Lysaten, die mit dem Tau Antikörper K9JA, der unphosphoryliertes Tau erkennt, untersucht wurden. Kleinhirnneuronen aus 6 Tage alten Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL28170 oder 10  $\mu$ M Cimes und 10  $\mu$ M MDL28170 (MDL + Cimes) für 24 h inkubiert. **A:** Kodak BioMax Light Film, **B:** Kodak Light Film.

Die Kleinhirnneuronen wiesen somit eine normale Tau Expression mit zahlreichen Spleißformen auf, die sich in Gegenwart von Cimes leicht veränderte.

### 2.13.1 Sphingoidphosphate induzieren eine Tau Hyperphosphorylierung

Die Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau ist ein weiteres Charakteristikum vieler neurodegenerativer Krankheiten (zusammengefasst unter dem Namen Tauopathien), unter anderen auch Alzheimer (Lee et al., 2001). Um zu überprüfen, ob Cimes bzw. S1P einen Einfluss auf die Tau Phosphorylierung ausüben, wurden Neuronen aus Wildtyp Mäusen mit Lösungsmittel als Kontrolle, 10  $\mu$ M S1P oder 10  $\mu$ M Cimes und Neuronen aus SPL-defizienten Mäusen mit 10  $\mu$ M S1P für 24 h behandelt. Das isolierte Zellprotein wurde nach SDS-PAGE und Western Blot mit dem Antikörper PHF-1 untersucht, der pathologisch relevante Phosphorylierungsstellen erkennt (pTau, **Abb. 50**). In Wildtypzellen führte Cimes im Gegensatz zu S1P zu einer stark erhöhten Phosphorylierung von Tau (**Abb. 50**). In den SPL-defizienten Neuronen induzierte S1P ebenso wie Cimes in wildtyp Zellen eine Hyperphosphorylierung von Tau.



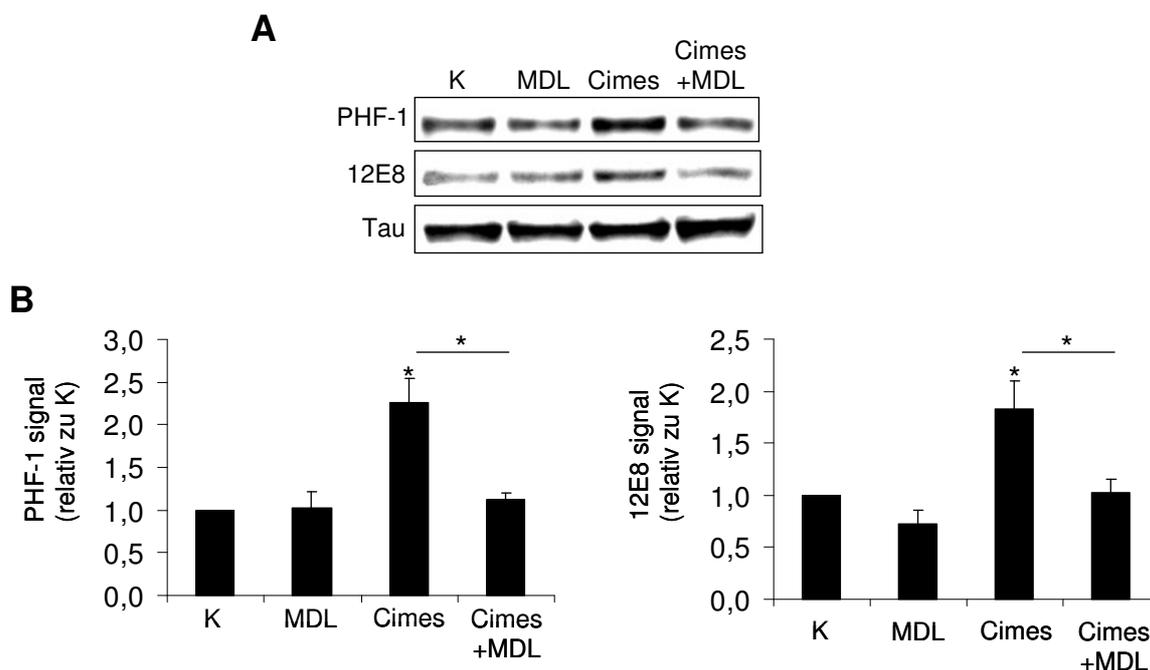
**Abb. 50: Cimes (in wildtyp Neuronen) und S1P (in SPL-defizienten Neuronen) induzieren eine Tau Hyperphosphorylierung.** Western Blot Analyse der Tau Phosphorylierung mittels des PHF-1 Antikörpers (Ser-396/404) sowie die quantitative Auswertung. Kleinhirnneuronen aus wildtyp Mäusen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes oder 10  $\mu$ M S1P und Neuronen aus SPL-defizienten mit 10  $\mu$ M S1P für 24 h behandelt. \*signifikant verschieden von K ( $p < 0,05$ ).

### 2.13.2 Calpain vermittelt die Cimes induzierte Tau-Hyperphosphorylierung

Da sowohl Cimes wie auch S1P zu einer Hyperphosphorylierung von Tau in Wildtyp bzw. SPL-defizienten Neuronen führten, wurden die weiteren Versuche bezüglich der Phosphorylierung des Tau-Proteins mit dem Analogon durchgeführt. Aufgrund der bisherigen

Ergebnisse, in denen eine Calpain Inhibierung die Cimes-induzierten Effekte negierte, wurde nun der Einfluss von Calpain auf die Cimes-induzierte Tau Hyperphosphorylierung untersucht. Die Neuronen wurden hierfür 24 h lang mit Lösungsmittel, 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL28170 oder einer Kombination aus Cimes und MDL behandelt und deren Lysate anschließend mittels Antikörpern auf die unterschiedlichen Tau Phosphorylierungsstellen untersucht. Cimes führte zu einer erhöhten Phosphorylierung an der PHF-1 (Serin 396/404) sowie an der 12E8 (Serin 262/214) Seite (**Abb. 51**). PHF-1 bindet an phosphorylierte Motive in dem flankierenden Bereich (*flanking region*) beiderseits der internen Wiederholungssequenzen (*internal repeats*) während 12E8 an phosphorylierte Serinreste des KXGS Motivs innerhalb der *internal repeats* bindet. In beiden Fällen verhinderte der Calpain Inhibitor MDL die pathologisch relevante Phosphorylierung. MDL alleine hatte keinen Einfluss auf die Tau Phosphorylierung.

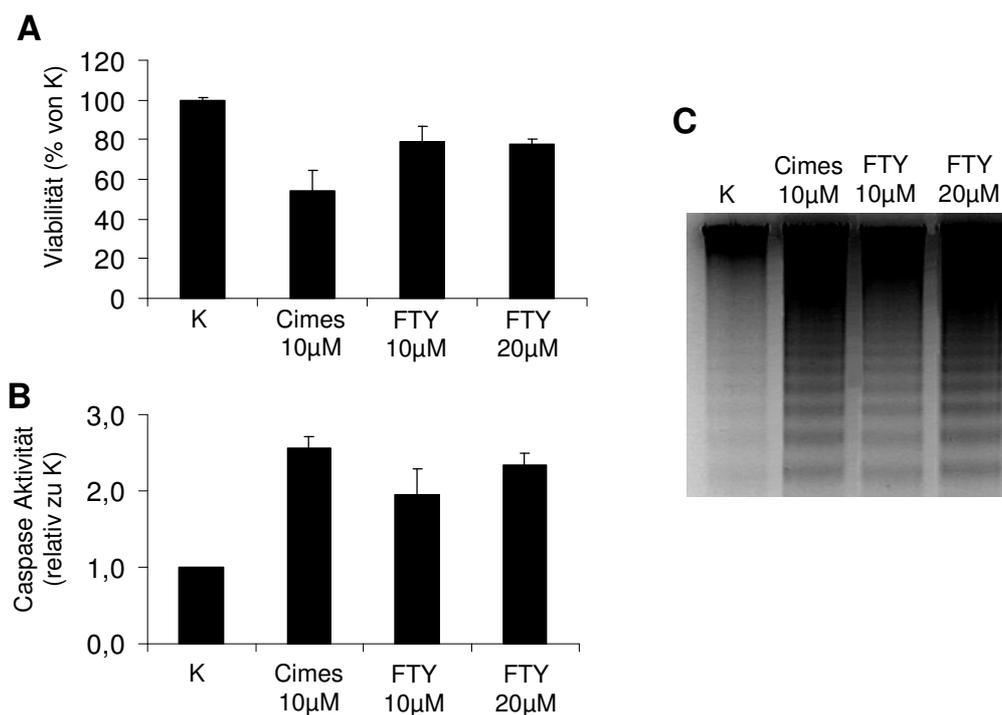
Die Cimes-induzierte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins konnte somit durch die Inhibierung von Calpain verhindert werden.



**Abb. 51: Die Cimes induzierte Tau Hyperphosphorylierung wird durch eine Inhibierung von Calpain verhindert.** **A:** Western Blot von neuronalen Lysaten, die mit den spezifischen Phospho-Tau Antikörpern PHF-1 (Serin 396/404) oder 12E8 (Serin 262/356), welche pathologisch relevante Phosphoepitope erkennen, sowie dem pan-Tau Antikörper K9JA untersucht wurden. Neuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu$ M Cimes, 10  $\mu$ M MDL28170 oder einer Kombination aus beiden (Cimes + MDL) für 24 h inkubiert. **B:** Quantitative Analyse der Western Blots. Die Werte sind relative zu K. \*signifikant verschieden von K oder voneinander ( $p < 0,05$ ).

## 2.14 Vergleich zwischen FTY720 und Cimes

FTY720 ist wie auch Cimes ein Sphingosinanalogen, welches intrazellulär von der SK2 phosphoryliert wird (Billich et al., 2003). Folglich war es von Interesse zu überprüfen, ob FTY in Neuronen ähnlich wie Cimes wirkt. Hierzu wurden Neuronen für 24 h mit Lösungsmittel, 10  $\mu\text{M}$  Cimes, 10  $\mu\text{M}$  oder 20  $\mu\text{M}$  FTY behandelt. Anschließend wurden die Viabilität sowie die apoptotischen Merkmale wie Caspase Aktivität und DNA Fragmentierung untersucht. In Anbetracht der vielen mit FTY durchgeführten klinischen Studien gegen die Krankheit Multiple Sklerose (Comi et al., 2010; Rammohan and Shoemaker, 2010) war das Auftreten apoptotischer Merkmale in neuronalen Zellen in Gegenwart von FTY überraschend. FTY reduzierte ähnlich wie Cimes in einer Konzentration von 10 wie auch 20  $\mu\text{M}$  die Viabilität der Neuronen um ca. 30% (**Abb. 52A**). Alle drei Analoga erhöhten die Aktivität der Caspasen (**Abb. 52B**) und führten zu einer Fragmentierung der DNA (**Abb. 52C**).



**Abb. 52: Cimes und FTY induzieren beide Apoptose in Neuronen.** Kleinhirnneuronen wurden mit Lösungsmittel (Kontrolle, K), 10  $\mu\text{M}$  Cimes, 10  $\mu\text{M}$  oder 20  $\mu\text{M}$  FTY720 behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität (A), die relative Effektor-Caspase Aktivität (B) sowie die genomische DNA (C) analysiert.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass FTY720 wie Cimes Apoptose in neuronalen Zellen induzieren kann

### 3 Diskussion

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) steuert eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Motilität, Cytoskelett Organisation und Calcium Homeostase (Pyne and Pyne, 2000; Spiegel and Milstien, 2003). In peripheren Geweben fördert S1P das Zellwachstum, gleichwohl scheint es in terminal differenzierten Neuronen toxisch zu wirken. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die dem Sphingoidphosphat induziertem neuronalen Zelltod zugrunde liegen.

Beruhend auf vorherigen Arbeiten unserer AG (Naetzker et al., 2006), welche die apoptotische Wirkung des semi-synthetischen S1P Analogons CimesP (cis-4-Methylsphingosin-Phosphat) in Neuronen demonstrierten, wurde untersucht ob S1P in S1P-Lyase-defizienten Zellen ebenfalls neurotoxisch wirkt. Dies konnte in dieser Arbeit erstmalig bestätigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass nicht nur die Menge an Sphingoidphosphaten für den neurotoxischen Effekt verantwortlich ist, sondern auch die Kinase, welche die Phosphorylierung katalysiert. Untersuchungen mit SK1 und SK2-defizienten Mäusen ergaben, dass Cimes nur in SK1-defizienten Neuronen toxisch wirkte, nicht aber in SK2-defizienten.

Demnach ist die SK2 sowohl für die Cimes induzierte Apoptose in wildtyp Neuronen wie auch für die S1P induzierte Apoptose in S1P-Lyase-defizienten Neuronen essentiell. Tatsächlich entsprachen die Effekte von Cimes in wildtyp Neuronen denen von S1P in S1P-Lyase-defizienten Nervenzellen (Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht: (Hagen et al., 2009)).

Schließlich wurde die cytosolische Protease Calpain als Mediator der Sphingoidphosphat induzierten Neurotoxizität identifiziert.

In Übereinstimmung mit der S1P-gesteuerten Regulation der Calcium Homeostase (Milstien et al., 2007) wurde auch der Einfluss der Sphingoidphosphate auf die Integrität des Endoplasmatischen Reticulums (ER) mittels Aktivierung der ER-Stress spezifischen Caspasen Kaskade nachgewiesen.

Ferner konnte eine funktionelle Verbindung zwischen den Sphingoidphosphaten und der Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, dessen neurofibrilläre Bündel das zweite Charakteristikum von AD sowie zahlreichen weiteren neurodegenerativen Erkrankungen bilden, dargestellt werden.

### 3.1 Die S1P-Lyase ist für eine normale Entwicklung in Mäusen essentiell

Die S1P-Lyase (SPL) ist ein membranständiges Enzym des Endoplasmatischen Reticulums (ER), welches die irreversible Spaltung von S1P katalysiert (Van Veldhoven et al., 2000).

Die Disruption des SPL Gens (*sgpl1*) hat einen bemerkenswert komplexen Phänotyp zur Folge. Äußerlich fällt die geringe Größe der SPL-defizienten Mäuse auf, sowie das lichte Fell und die leichte Schädelverkürzung. Obwohl S1P normalerweise das Zellwachstum stimuliert, sind SPL-defiziente Mäuse auch als Adulte viel kleiner als wildtyp- oder heterozygote Geschwistertiere. Zudem erlangen die SPL-defizienten Tiere die Geschlechtsreife auch in einem Alter von 8 Wochen nicht. Im Gegensatz zu den heterozygoten Tieren, deren Lebenserwartung der der Wildtypen entspricht, ist die Lebenserwartung der SPL-defizienten Mäuse auf wenige Wochen (6 bis 9) reduziert. Die häufigste Todesursache war dabei eine Pneumonie (persönliche Mitteilung, Paul P. Van Veldhoven).

Die geringe Größe und die hohe Sterblichkeit der SPL-defizienten Mäuse wurden von Schmahl und Kollegen bestätigt, die die Signalwirkung von PDGF (platelet derived growth factor) auf die frühen Gene der Mausentwicklung, zu denen auch *sgpl1* gehört, analysiert haben (Schmahl et al., 2007). Die SPL-defizienten Tiere gehörten dabei mit einem Todesalter von 8 Wochen zu der Gruppe von Tieren mit der geringsten Lebenserwartung (Schmahl et al., 2007), was mit den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen übereinstimmte. Obwohl die *sgpl1*-Deletion nicht embryonal letal war (Schmahl et al., 2007), wurden nur wenige SPL-defiziente Tiere geboren. Somit kann aufgrund des geringen Vorkommens und der nicht auf Mendel beruhenden Verteilung der Genotypen der SPL-defizienten Nachkommen auf eine essentielle Rolle der S1P-Lyase bei der embryonalen Entwicklung geschlossen werden. Allerdings berichteten Vogel und Kollegen von der Firma Lexicon in ihrer Arbeit über Lymphopenie in SPL-defizienten Mäusen von einer Mendelschen Verteilung der Genotypen (Vogel et al., 2009). Sowohl in der vorliegenden Arbeit wie auch in der von der Firma Lexicon wurden ca. 900 Tiere genotypisiert, die jedoch zwei verschiedenen Mauslinien entstammten. Vogel et al. verwendeten SPL-defiziente Mäuse, die mittels eines embryonalen Stammzellenklons aus einer OmniBank (OST58278) mit einer *Gene Trap* Mutation im zweiten Intron des SPL Gens generiert wurden. Der genetische Hintergrund basierte auf den Mauslinien 129S5/SvEvBrd und C57Bl/6. Die hier verwendeten SPL-defizienten Tiere basieren auf denselben Stammzellklonen wurden aber in der Gruppe von Prof. Paul P. Van Veldhoven durch Einkreuzung in die Swiss Webster Linie generiert (VanVeldhoven, 2005).

Auffallend an den SPL-defizienten Mäusen ist neben der geringen Größe zudem das niedrige Gewicht, was vermutlich auf den Mangel an Körperfett zurückzuführen ist (Bektas et al., 2010).

Da in SPL-defizienten Mäusen so gut wie kein Fettgewebe nachweisbar war, könnte die vergrößerte Leber ein Reservoir für ektopische Fette bei diesen Tieren darstellen. Zudem wies die Leber SPL-defizienter Tiere erhöhte Mengen an Fettsäuren, Cholesterol und Cholesterolester auf. Auch der Ceramidgehalt in Lebern SPL-defizienter Mäuse war um ein Vielfaches erhöht. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde überdies von erhöhten Mengen an Lipiden wie Triacylglyceriden (TAG) und Sphingolipiden, unter anderem Sphingomyelin, S1P, Sphingosin und Ceramid, in Lebern von SPL-defizienten Mäusen berichtet (Bektas et al., 2010). Untersuchungen der Leber dieser Tiere von Bektas und Kollegen zeigten zudem eine Ansammlung von *lipid droplets* sowie eine erhöhte PPAR $\gamma$ - (Peroxisome proliferator-activated receptor, ein wichtiger Regulator des Lipid-Stoffwechsels) Expression (Bektas et al., 2010). Fettanreicherungen in der Leber sowie die erhöhte PPAR $\gamma$ - Expression stellen Zeichen einer Fettleber dar (Gavrilova et al., 2003).

Die Veränderungen im Lipidmetabolismus der SPL-defizienten Mäuse betrafen auch das Gehirn dieser Tiere. Im Großhirn nahmen die Lipide im Gegensatz zu den Befunden in der Leber allerdings ab; Fettsäuren, Cholesterol, Cholesterolester und Ceramid waren im Vergleich zu den wildtyp Mäusen niedriger. Die physiologischen Auswirkungen dieser Veränderungen sind allerdings noch unklar.

Dagegen gleichen die Auswirkungen der S1P-Lyase Defizienz im Immunsystem der Wirkung von FTY720. In SPL-defizienten Mäusen wurde wie in mit FTY behandelten Personen eine Lymphopenie festgestellt, die mit der Internalisierung des S1P<sub>1</sub> Rezeptors zusammenhängt (Pinschewer et al., 2000; Vogel et al., 2009). Dieser Effekt konnte durch die Wiederherstellung der S1P-Lyase Aktivität revidiert werden (Vogel et al., 2009).

### **3.2 Veränderungen im Lipidmetabolismus von SPL-defizienten Neuronen**

Die Lipidanalysen im Kleinhirn der SPL-defizienten Mäuse zeigten eine Verringerung der *de novo* Sphingolipidsynthese und einen Anstieg des Recyclingweges sowie eine erhöhte intrazelluläre S1P Konzentration. Nach Zugabe von Sphingosin bzw. S1P in das Kulturmedium der SPL-defizienten Neuronen nahm der Gehalt an intrazellulärem S1P und Sphingosin weiter zu (Gesamtlipide, Massenspektrometer). Ceramid stieg sowohl nach der

Zugabe von S1P wie auch Sphingosin in SPL-defizienten Neuronen an. Bemerkenswert war, dass der Anstieg von Ceramid in den Neuronen fast ausschließlich auf die Erhöhung der kurzkettigen Ceramide (C16, C18) zurückzuführen war und auch in der Leber von SPL-defizienten Mäusen detektiert werden konnte (Bektas et al., 2010). Trotz des erhöhten Ceramidgehalts in den Zellen nach Zugabe von Sphingosin bzw. S1P war die *de novo* Synthese von Ceramid verringert. Ebenso nahm die Biosynthese der Glycosphingolipide und Ganglioside unabhängig den Zusätzen in SPL-defizienten Neuronen ab. Die Gesamtmenge an Ceramid, Sphingomyelin und Glycosphingolipiden blieb allerdings in den SPL-defizienten Zellen im Vergleich zu den Wildtypen unverändert. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme von Ceramid trotz der reduzierten *de novo* Synthese wäre die gefundene erhöhte Aktivität des Recyclingweges. Gegen eine Zunahme der *de novo* Synthese spricht unter anderem die Hemmung der Serin-Palmitoyl-Transferase (SPT), welche die *de novo* Synthese reguliert, durch Sphingoidphosphate (van Echten-Deckert et al., 1997) sowie die geringere Expression einer der beiden SPT-Untereinheiten (*sptlc1*) (Bektas et al., 2010). Eine Speicherung von Ceramid und anderen Lipiden in den Lysosomen konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da der lysosomale Abbau in den SPL-defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt und daher nicht für die Erhöhung der Lipide verantwortlich war (Bektas et al., 2010). Die Akkumulation von S1P in SPL-defizienten Zellen scheint demnach eine Aktivierung des Recyclingweges zu induzieren, der S1P als Startpunkt verwendet (Le Stunff et al., 2007). Hierbei wird S1P mittels einer von S1P-Phosphatasen (SPP) katalysierten Reaktion im ER zu Sphingosin dephosphoryliert. Ceramid, das Ausgangsmolekül für die höheren Sphingolipide, entsteht durch die anschließende Acylierung von Sphingosin (van Echten-Deckert and Herget, 2006). Tatsächlich zeigen langsam proliferierende oder ruhenden Zellen wie Neuronen eine Präferenz für die Synthese von Glycosphingolipiden aus Sphingosin mittels des Recyclingweges, während dem Bedarf an Sphingolipiden in schnell proliferierenden Zellen mit einer gesteigerten *de novo* Synthese entsprochen wird (Gillard et al., 1998). Diese Befunde werden durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestärkt. Sphingosin induzierte in SPL-defizienten Neuronen einen Anstieg der Gesamt-Ceramide, inhibierte allerdings die *de novo* Ceramid-Synthese. Folglich muß das fehlende Ceramid aus dem Recycling von Sphingosin bzw. S1P kommen.

Zu Bedenken ist dabei stets, dass S1P in einer viel geringeren Menge als Ceramid in der Zelle vorkommt (**Abb. 53**). Eine Phosphorylierung von 1-3 % des intrazellulären Sphingosins kann demnach schon die Menge an S1P verdoppeln (Hannun and Obeid, 2008).

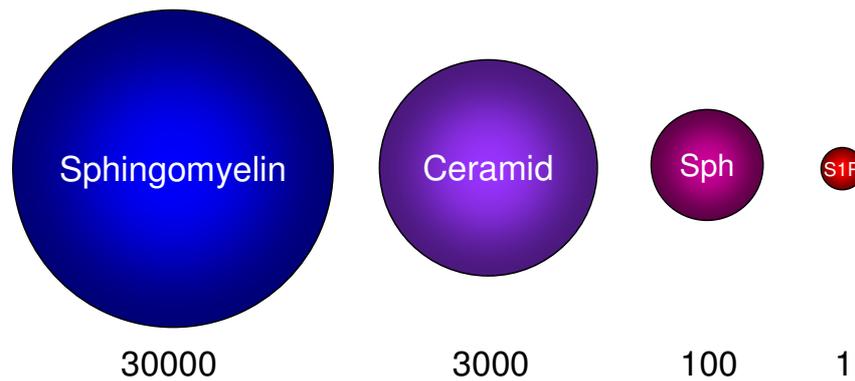


Abb. 53: Relative Menge von Sphingomyelin, Ceramid, Sphingosin (Sph) und S1P. nach (Hannun and Obeid, 2008)

Eine Erhöhung der intrazellulären S1P Konzentration stellt einen Anstieg eines bioaktiven Moleküls und damit eine potentielle Gefahr für die Zelle dar. Die Induktion des Recyclingweges wäre demnach eine Methode für die Zelle, die Menge an akkumulierendem S1P zu reduzieren (Abb. 54).

Da allerdings trotz des erhöhten Recyclings eine S1P Akkumulation in den SPL-defizienten Neuronen stattfand, scheint die Kapazität dieses Weges nicht auszureichen, die entstehenden S1P Mengen abzubauen, mit durchaus folgenreichen Konsequenzen für die Zelle.

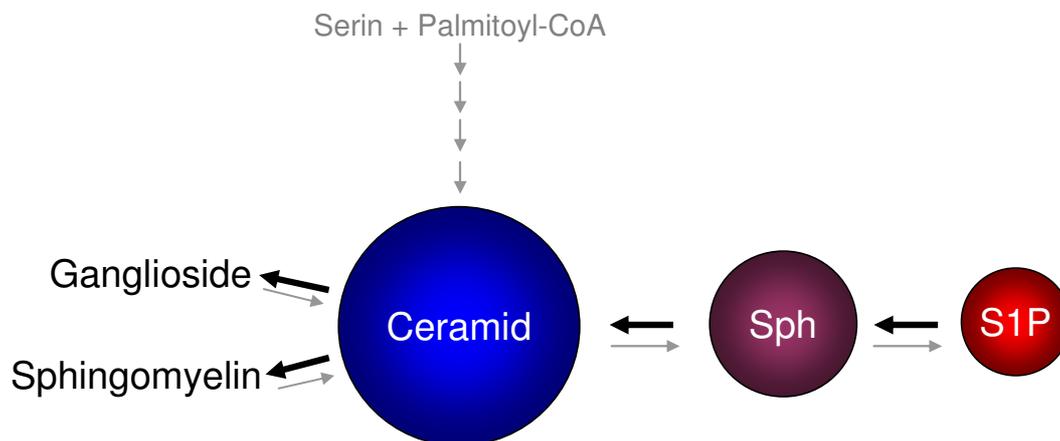


Abb. 54: SPL-Defizienz induziert eine Inhibierung der *de novo* Sphingolipid Synthese (graue Pfeile) und einen Anstieg des Recyclingweges. Sph – Sphingosin; S1P – Sphingosin-1-Phosphat

### 3.3 Der Ursprung der Sphingoidphosphate ist entscheidend für deren Wirkungen

Die Hypothese, dass S1P neuronale Apoptose induziert, wenn es über einen bestimmten Schwellenwert akkumuliert, sollte verifiziert werden. Um den Abbau von S1P zu vermeiden, wurden kultivierte Neuronen aus sechs Tage alten SPL-defizienten Mäusen verwendet.

Die Behandlung der SPL-defizienten Neuronen mit S1P oder Sphingosin resultierte in gleich hohen S1P Konzentrationen. Ausgehend von der zuvor genannten Hypothese wurde eine toxische Wirkung in mit S1P bzw. Sphingosin behandelten SPL-defizienten Neuronen erwartet, da beide Zusätze zu einer erhöhten S1P Konzentration führten. Allerdings konnte nur in mit S1P inkubierten Neuronen Apoptose festgestellt werden, wohingegen die mit Sphingosin behandelten keine Beeinträchtigung ihrer Vitalität aufwiesen. Zur besseren Unterscheidung wird im Folgenden S1P, welches durch die Phosphorylierung von Sphingosin hergestellt wurde, als  $S1P_{Sph}$  bezeichnet werden, während S1P, das aus der Rephosphorylierung von zugegebenem S1P hervorgegangen ist, als  $S1P_{S1P}$  bezeichnet wird. Nur  $S1P_{S1P}$  führte zu Apoptose, einer veränderten Morphologie und einer Reaktivierung des Zellzyklus. Bemerkenswert war, dass die von  $S1P_{S1P}$  hervorgerufenen Effekte jenen in wildtyp Zellen ähnelten, die zuvor mit Cimes, welches intrazellulär phosphoryliert wird, behandelt worden waren (van Echten-Deckert et al., 1997; Naetzker et al., 2006). Die apoptotischen Effekte konnten nicht durch einen erhöhten Ceramidgehalt erklärt werden, da dieser in beiden Versuchsansätzen, unabhängig der Zugabe von S1P oder Sphingosin anstieg. Es hat demnach den Anschein, als wäre Ceramid nicht die Ursache für die in postmitotischen Neuronen beobachteten apoptotischen Ereignisse.

Der Grund für die unterschiedlichen Effekte von S1P und Sphingosin musste folglich auf einem Unterschied in der Verstoffwechslung dieser beiden Moleküle beruhen. Die Differenz bestand in den unterschiedlichen Ursprüngen von  $S1P_{Sph}$  und  $S1P_{S1P}$ . Während Sphingosin fast ausschließlich von der SK1 phosphoryliert wurde und zur Bildung von  $S1P_{Sph}$  führte, wurde S1P zuerst dephosphoryliert und anschließend vornehmlich von der SK2 zu  $S1P_{S1P}$  rephosphoryliert. Ebenso wurde das synthetische Analogon Cimes vornehmlich von der SK2 zu CimesP phosphoryliert. Auch andere Sphingosin Analoga wie FTY720 (Allende et al., 2004) und FTY720 Analoga wie AAL(R) (Don et al., 2007) werden hauptsächlich von der weniger spezifischen SK2 phosphoryliert.

Die Phosphorylierung von Sphingosin durch zwei unterschiedliche Kinasen ist in Anbetracht der verschiedenen Eigenschaften der Sphingosin-Kinasen gut vorstellbar. SK1 und SK2 variieren trotz einiger Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz in ihren kinetischen

Eigenschaften und ihrer subzellulären Lokalisation sowie in entwicklungs- und gewebespezifischer Expression, was auf unterschiedliche physiologische Funktionen hindeutet (Kohama et al., 1998; Liu et al., 2000). SK1 befindet sich im Cytosol und wird bei ihrer Aktivierung zur Plasmamembran rekrutiert. Die Aktivität der SK1 wird mit Zellwachstum und Überleben assoziiert, während die am ER lokalisierte SK2 mit Wachstums-Suppression und Apoptose in Verbindung gebracht wird (Maceyka et al., 2005). Interessanterweise ist die SK2-vermittelte Apoptose S1P-Rezeptor unabhängig (Liu et al., 2003), ebenso wie die S1P- und Cimes-induzierte Apoptose.

Unterstützt wird die These der SK2-vermittelten Sphingoidbasen induzierten Apoptose durch den Befund, dass Cimes in wildtyp und SK1-defizienten Neuronen Apoptose induzierte, nicht aber in SK2-defizienten. Der mit der SK2 assoziierte apoptotische Effekt ließ sich allerdings durch einen Wechsel der Positionen beider Sphingosin-Kinasen umkehren. Befand sich die SK1 nicht im Cytosol sondern am ER, der Lokalisation der SK2, förderte sie ebenso wie die SK2 Apoptose (Maceyka et al., 2005). Diese apoptotische Wirkung bedingt durch den Positionswechsel der SK1 zeigt, dass die Bildung von Sphingoidphosphaten am ER für den apoptotischen Effekt verantwortlich ist und nicht das Enzym per se. Don und Mitarbeiter konnten zudem mittels fluoreszierender Sphingosin-Derivate die Akkumulation von SK2 generierten Sphingoidphosphaten in der ER Membran zeigen (Don et al., 2007).

In Anbetracht der Lokalisation der SK2 und der Produktion von  $S1P_{S1P}$  und CimesP vorwiegend durch diese Kinase sowie der beobachteten apoptotischen Wirkung, die eine am ER lokalisierte Kinaseaktivität voraussetzt (Maceyka et al., 2005), liegt die Bildung dieser beiden Sphingoidphosphate am ER nahe. Folglich hat der Ursprung der phosphorylierten Sphingoidbasen einen wichtigen Einfluss auf deren Wirkung. Diese Daten stehen im Einklang mit der Hypothese, dass die regulatorischen Funktionen bioaktiver Sphingolipide mit den subzellulären Kompartimenten, in denen sie synthetisiert wurden, assoziiert sind (Hannun and Obeid, 2008).

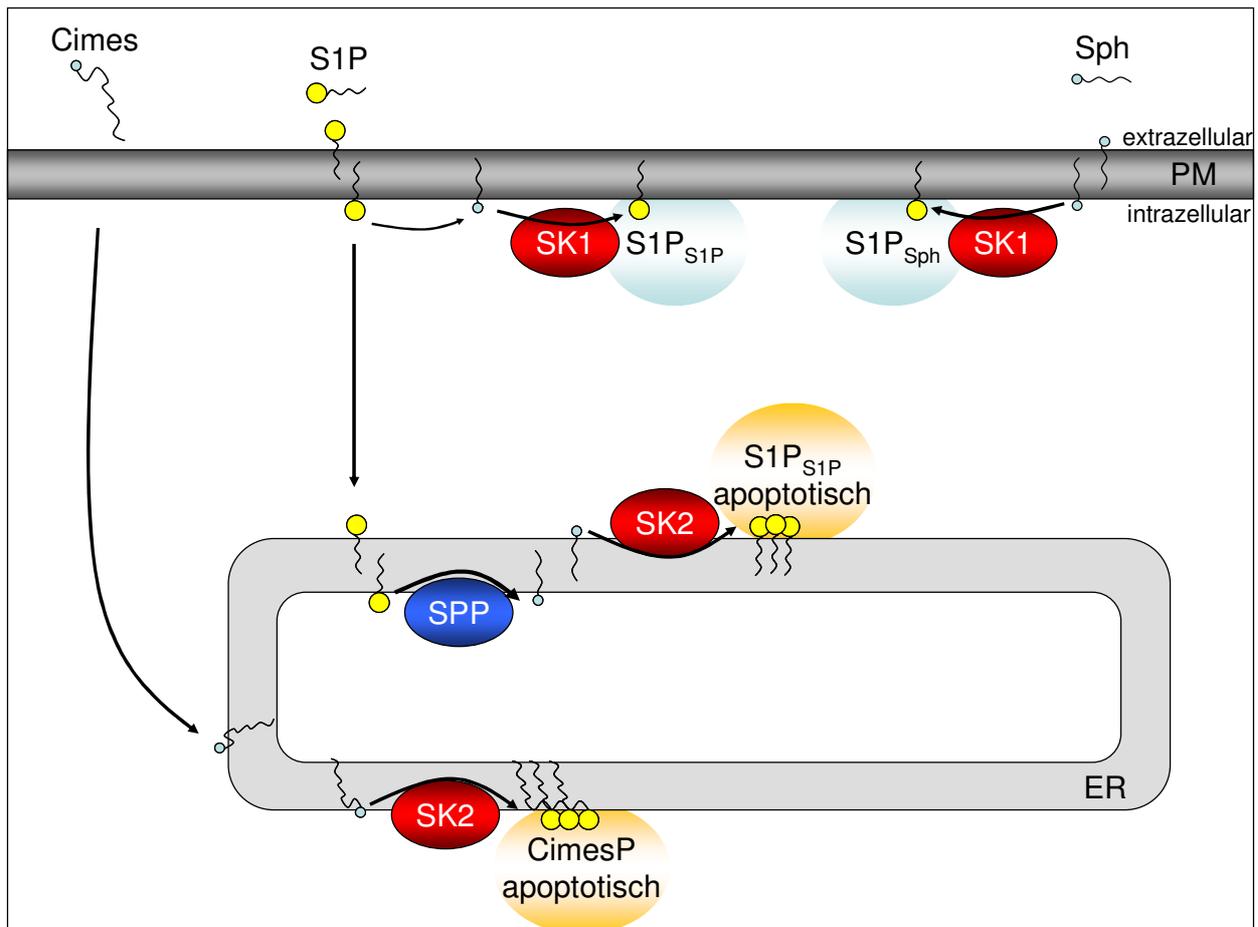
Die Aufnahme der Sphingoidbasen bzw. -phosphate von den Zellen ist bisher allerdings noch nicht vollständig geklärt worden. S1P wird von den Zellen mittels eines bisher unbekanntes Mechanismus aufgenommen. Im Medium von HTC4 Zellen (rat hepatoma) wurde eine Dephosphorylierung des S1P zu Sphingosin beschrieben, die allerdings auch ohne Zellen nur im Medium stattfand (Peest et al., 2008). Unter Einsatz von Phosphatase-Inhibitoren, insbesondere Natrium-Orthovanadat, konnte die Dephosphorylierung im Medium verhindert werden, woraus geschlossen wurde, dass die Zellen S1P erst dephosphorylieren müssen, um dieses in Form von Sphingosin aufzunehmen (Peest et al., 2008). Eine Inhibierung der

Phosphatasen mit Natrium-Orthovanadat führte in denselben Zellen nach extrazellulärer S1P Zugabe jedoch zu einem intrazellulären Anstieg von S1P (Peest et al., 2008). Dagegen bewirkte dieselbe Behandlung in primären Splenocyten (Nierenzellen) weder eine Inhibierung des S1P Abbaus im Medium noch einen intrazellulären S1P Anstieg. Zudem war die Aufnahme von S1P auch in den Zellen ohne Phosphatase-Inhibitor kaum vorhanden (Peest et al., 2008). Diese Beobachtungen konnten in der hier vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Würde eine Dephosphorylierung von S1P zu Sphingosin im Medium stattfinden, dürfte kein Unterschied in der Reaktion der SPL-defizienten Neuronen auf die Zugabe von S1P oder Sphingosin in das Kulturmedium auftreten, da nur Sphingosin aufgenommen werden könnte. Allerdings induzierte S1P Apoptose in den SPL-defizienten Neuronen, während Sphingosin keine toxische Wirkung aufwies. Nach Zugabe von S1P ins Medium fand sich zudem eine erhöhte Menge an intrazellulärem S1P in den Neuronen, was ebenfalls gegen eine beeinträchtigte Aufnahme von S1P spricht. Somit kann in dem hier verwendeten Zellsystem davon ausgegangen werden, dass die Neuronen die Fähigkeit besitzen, extrazellulär zugegebenes S1P über einen bisher unbekanntem Mechanismus aufzunehmen.

Basierend auf den hier genannten Ergebnissen wird folgendes Schema vorgestellt (**Abb. 55**). Das internalisierte S1P gelangt zum ER, wo es von der S1P-Phosphatase (SPP) zu Sphingosin dephosphoryliert wird (Mandala, 2001). Aus S1P generiertes Sphingosin befindet sich in der ER Membran, wo es gut von der SK2 erreicht werden kann, die es wieder zu S1P<sub>S1P</sub> rephosphoryliert. Das rephosphorylierte S1P akkumuliert nun in der ER-Membran, da es in den SPL-defizienten Zellen nicht gespalten werden kann. Mit Cimes verhält es sich ähnlich. Cimes gelangt in die Zelle und kann nicht durch die spezifische SK1 phosphoryliert werden. Es erreicht auf bisher nicht geklärtem Wege das ER, wo es von der SK2 phosphoryliert wird und schließlich am ER akkumuliert, da es metabolisch stabil ist. Sphingosin kann auf Grund seiner amphiphilen Eigenschaften die Plasmamembran passieren (Hannun and Obeid, 2008) und schnell von der SK1 phosphoryliert (S1P<sub>Sph</sub>) werden. Auch S1P<sub>Sph</sub> akkumuliert in Abwesenheit der S1P-Lyase, allerdings nicht am ER.

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass S1P und CimesP cytotoxisch sind, wenn sie von der SK2 in SPL-defizienten bzw. wildtyp Neuronen generiert werden und einen bestimmten Schwellenwert überschreiten. Dies stimmt mit bisherigen Ergebnissen überein, die zeigen, dass S1P in wildtyp Neuronen die selben Effekte wie Cimes induziert, allerdings kürzer und schwächer ausgeprägt (Naetzker et al., 2006). Im Gegensatz dazu führte SK1 generiertes S1P nicht zu Apoptose, obwohl dieses in gleichem Maße wie von der SK2 generiertes S1P in SPL-defizienten Zellen akkumulierte.





**Abb. 56:** Schema der vorgeschlagenen S1P Generierung aus verschiedenen Ursprüngen, die zu funktionell unterschiedlichem intrazellulärem S1P führen, mit Berücksichtigung von Lipid Phosphatasen. Cimes – cis-4-Methylsphingosin, CimesP – cis-4-Methylsphingosin-Phosphat, PM – Plasmamembran, S1P – Sphingosin-1-Phosphat, S1P<sub>S1P</sub> – S1P aus zugegebenem S1P, S1P<sub>Sph</sub> – S1P aus zugegebenem Sph, Sph – Sphingosin, SPP – Sphingosin-Phosphat-Phosphatase.

Der hier beschriebene Weg der S1P Rephosphorylierung scheint allerdings nicht in allen Zellen gleichermaßen vonstatten zu gehen, denn in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) wurden betreffend der Phosphorylierung durch Sphingosin-Kinasen Differenzen zu den Neuronen festgestellt. Während die Deletion der SK1 in den Neuronen zu keinerlei Störung der S1P Generierung führte, induzierte das Ausschalten der SK1 in MEFs einen deutlichen Rückgang in der intrazellulären S1P Menge. Zudem wurde S1P in den MEFs zu gleichen Anteilen (50:50) von den beiden Kinasen rephosphoryliert, während das Verhältnis in den Neuronen bei 70% SK2 und 30% SK1 lag. Die SK2 scheint diesen Ergebnissen zu Folge in den MEFs nicht sehr aktiv zu sein. Dies zeigt, wie sehr die Effekte von bioaktiven Molekülen von der Zellspezies abhängen, in denen die Experimente durchgeführt werden.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf die Wichtigkeit des Ursprungs und der subzellulären Lokalisation der S1P Produktion im Hinblick auf die Interpretation der zellulären Funktion dieses bioaktiven Moleküls hin.

Ferner wurden vergleichbare Ergebnisse betreffend der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose in Hefen vorgestellt, in denen eine Akkumulation von Sphingoidphosphaten, bedingt durch das Ausschalten abbauender Enzyme, zum Zelltod führte (Zhang et al., 2001). Der Sphingoidphosphat-induzierte Zelltod in Hefen lässt die Vermutung zu, dass der toxische Effekt phosphorylierter Sphingoidbasen nicht ausschließlich in Neuronen stattfindet, sondern auch in anderen Zellsystemen vorkommen kann. In teilungsfähigen Swiss 3T3 Fibroblasten (van Echten-Deckert et al., 1998) und MEFs (persönliche Mitteilung G. van Echten-Deckert) induzierte eine Akkumulation von Sphingoidphosphaten dagegen Proliferation, während die unter Zellkultur-Bedingungen stark proliferierenden B104 Neuroblastomazellen sich nicht wie erwartet zu teilen begannen sondern apoptotisch wurden (Natzker et al., 2002). Die genannten Unterschiede in der Wirkungsweise der Sphingoidphosphate unterstreichen die zelltyp-spezifischen Eigenschaften dieser rätselhaften Moleküle und zeigen deutlich, wie wichtig eine genaue Kenntnis der molekularen Signalwege ist, um diese Effekte nachvollziehen zu können.

### **3.4 Identifikation des Sphingoidphosphat induzierten apoptotischen Signalweges**

Der Ursprung der phosphorylierten Sphingoidbasen hat wie oben beschrieben einen wichtigen Einfluss auf deren Wirkung. Der apoptotische Effekt der Sphingoidphosphate ist in Neuronen von der SK2-katalysierten Phosphorylierung abhängig und erfordert deren intrazelluläre Akkumulation. Unterstützt wird diese These durch folgende Befunde: (i) Cimes induzierte zwar in Wildtyp und SK1-defizienten Neuronen Apoptose, nicht aber in SK2-defizienten Neuronen und (ii) S1P<sub>S1P</sub>, welches von der SK2 generiert wird, wirkte in S1P-Lyase-defizienten Neuronen ebenfalls toxisch im Gegensatz zu (iii) S1P<sub>Sph</sub>, welches von der SK1 phosphoryliert wurde und keine apoptotische Wirkung aufwies. In Anbetracht der Lokalisation der SK2 und der Produktion von S1P<sub>S1P</sub> und CimesP vorwiegend durch diese Kinase wurde die Bildung dieser beiden Sphingoidphosphate am ER angenommen.

In Übereinstimmung mit dieser These wurde in Gegenwart von Cimes die Aktivierung von ER-spezifischen Proteasen gefunden. Eine solche ist Caspase-12, welche als Antwort auf toxische Einflüsse, denen das ER ausgesetzt ist aktiviert wird (Nakagawa et al., 2000). ER-Stress kann unter anderem durch Calcium Ionophoren (z.B. Ionomycin), Inhibitoren der ER-spezifischen Calcium-ATPasen (z.B. Thapsigargin) oder Störungen in den Glycosylierungs-Reaktionen (z.B. Tunicamycin) hervorgerufen werden. Nakagawa und Kollegen konnten

zudem zeigen, dass Caspase-12-defiziente Zellen resistent gegenüber ER-Stress sind (Nakagawa et al., 2000), was die Bedeutung der Caspase-12 bei ER-Stress spezifischen apoptotischen Reaktionen unterstreicht. Caspase-12 wird nur bei ER-Stress aktiviert, der seinen Ursprung in Störungen der ER-Homeostase hat und nicht von extrazellulären oder die Mitochondrien betreffenden apoptotischen Signalen ausgelöst wird (Nakagawa et al., 2000). Die Beteiligung der Mitochondrien an der Sphingoidphosphat-induzierten Apoptose konnte im Einklang mit den oben genannten Bedingungen ausgeschlossen werden, da eine Inkubation der Neuronen mit Cimes bzw. S1P nicht zu einer Freisetzung von Cytochrom c führte. Aufgrund der gefundenen Caspase-9-Aktivierung war dies ein überraschendes Ergebnis, denn gewöhnlich geht der Aktivierung der Procaspase-9 die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol voraus. Dort bildet sich aus Cytochrom c sowie dem Protein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) das Apoptosom, welches üblicherweise die Spaltung von Procaspase-9 ermöglicht (Li et al., 1997).

Eine Permeabilisierung der Mitochondrien wurde allerdings von Don und Kollegen in Immunzellen detektiert, die mit Sphingoidphosphaten inkubiert wurden (Don et al., 2007). Dies steht nicht zwangsläufig im Widerspruch zu dem hier vorgestellten Ergebnis, sondern verdeutlicht vielmehr die Spezifität der apoptotischen Signalwege von Sphingoidphosphaten in verschiedenen Zellspezies.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass der Ceramid induzierte Zelltod sowohl die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wie auch die Aktivierung der Initiator-Caspase-8 beinhaltet (Lin et al., 2004). Im Gegensatz dazu fand bei der Cimes bzw. S1P induzierten Apoptose weder die Permeabilisierung der Mitochondrien noch die Aktivierung der Caspase-8 statt. Die Differenz zwischen der von Cimes induzierten apoptotischen Signalkaskade und der von Ceramid ausgelösten unterstützt die Theorie, dass sich die Cimes bzw. S1P induzierte Apoptose von der Ceramid-induzierten Apoptose unterscheidet.

Die Beobachtungen, dass Caspase-9 unabhängig von der Cytochrom c Freisetzung aktiviert wurde sowie die Spaltung der Procaspase-12 gaben den Hinweis nach ER-abhängigen Faktoren zur Aktivierung von Caspase-9 zu suchen. Im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen kann die Spaltung und somit Aktivierung von Procaspase-9 auch mittels Caspase-12 erfolgen (Morishima et al., 2002). Zudem wurde von einer Beteiligung der Caspase-12 an der Amyloid-beta (A $\beta$ ) induzierten Apoptose in primären Neuronen berichtet (Nakagawa et al., 2000). Das A $\beta$ -Protein ist der Hauptbestandteil der amyloiden Plaques, eines der Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung. In Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen wurde Caspase-12 in dem Fall der A $\beta$ -induzierten Toxizität

spezifisch durch Störungen der ER Homeostase aktiv und nicht durch Membranschäden oder Apoptosesignale, die die Mitochondrien betreffen (Nakagawa et al., 2000).

Die Spaltung der Procaspase-12 ist eine der apoptotischen Reaktionen die von Calpain durchgeführt werden (Nakagawa and Yuan, 2000). Die Abhängigkeit von Calcium macht diese cytosolische Protease anfällig für Änderungen der Calcium Homeostase. Da S1P eine Freisetzung des Calciums aus internen Speichern induziert (Ghosh et al., 1994; Meyer zu Heringdorf et al., 2003) und auch Cimes zu einem cytosolischen Calciumanstieg führte (Kooperation mit Prof. Dr. Swandulla und Dr. Michael Hans), wäre Calpain ein passendes Zielmolekül für die von den Sphingoidphosphaten hervorgerufenen Veränderungen der Calciumhomeostase. Die Tatsache, dass sich die Cimes-induzierte Apoptose mit der Inhibierung von Calpain vollständig verhindern ließ, weist auf die zentrale Bedeutung von Calpain in der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose hin. Die Aktivierung von Calpain wurde in vielen Krankheiten festgestellt (Li et al., 1998; Chen et al., 2006; Raynaud and Marcilhac, 2006), häufig verbunden mit der Fehlregulation der CDK5 (Tsai et al., 2004; Wen et al., 2007; Alvira et al., 2008).

Die CDK5 (cyclin dependent kinase) wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und ist eine untypische Cyclin abhängige Kinase, die trotz einiger Sequenzhomologien mit anderen CDKs nicht von Cyclinen gesteuert wird oder direkt an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Hellmich et al., 1992; van den Heuvel and Harlow, 1993; Tsai et al., 1994). Die CDK5 ist für die Entwicklung und Funktion des Gehirns essentiell und eine unkontrollierte Aktivität kann zu zahlreichen neurologischen Störungen führen (Dhavan and Tsai, 2001). Die monomere Form der CDK5 ist inaktiv und benötigt für die Kinaseaktivität die Bindung der regulatorischen Untereinheit p35 (protein 35 kDa) (Zheng et al., 1998). Durch einen Myristoylanker am N-Terminus ist p35 an der Plasmamembran verankert. Aktiviertes Calpain kann p35 zu einem C-terminalen Fragment mit der Bezeichnung p25 spalten, welches beständiger als p35 ist und fester an die CDK5 bindet. Zudem besitzt p25 nicht den N-terminalen Membrananker und befindet sich daher im Cytosol und im Zellkern (Patrick et al., 1999). Die nicht reversible Bindung von p25 an die CDK5 führt zu einem delokalisierten, überaktiven CDK5/p25 Komplex, der mit vielen neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht wurde (Patrick et al., 1999). Da eine Inhibierung der Calpain Aktivität die Cimes-induzierte Spaltung von p35 zu p25 verhindert, wird eine Calpain katalysierte Spaltung von p35 zu p25 angenommen, die in einer Überaktivierung der CDK5 resultiert. Interessanterweise wurde eine CDK5 Überaktivierung auch in Neuronen gefunden, die A $\beta$

ausgesetzt waren sowie in transgenen Mausmodellen von AD (Cruz et al., 2003; Kitazawa et al., 2005; Lopes et al., 2007).

Neben der Beteiligung der CDK5 an zahlreichen neurologischen Störungen, war deren Aktivität oft mit der Expression verschiedener Zellzyklus Marker verbunden. Aufgrund der veränderten subzellularen Lokalisation des CDK5/p25 Komplexes, verändert sich auch die Substratspezifität und führt zu Phosphorylierungen von Substraten, die üblicherweise nicht von dieser Kinase erreicht werden wie der Zellzyklusregulator Rb (Retinoblastoma protein) (Dhavan and Tsai, 2001). In Gegenwart von Cimes wurde in terminal differenzierten Neuronen eine Phosphorylierung von Rb sowie ein Anstieg der Cyclin D1 Expression detektiert, verbunden mit der Reaktivierung des Zellzyklus.

Der Wiedereintritt in den Zellzyklus scheint mit der neuronalen Degeneration in Verbindung zu stehen (Yang and Herrup, 2007) und wurde in Gehirnen von AD Patienten (Busser et al., 1998), AD Maus Modellen (Yang et al., 2006) sowie in kultivierten Neuronen, die A $\beta$  ausgesetzt waren (Majd et al., 2008; Lopes et al., 2009a) beobachtet. Tatsächlich zeigen Neuronen in AD Gehirnen eine Reaktivierung des Zellzyklus lange bevor sich die ersten pathologischen Krankheitsanzeichen im Gehirn entwickeln (Varvel et al., 2008). Ein Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde sogar als mögliches neuropathologisches Merkmal von AD vorgeschlagen (Hernandez-Ortega et al., 2007; Lopes et al., 2009b). Sowohl in Neuronen, die mit A $\beta$  behandelt wurden (Arendt, 2000) wie auch in solchen, die Cimes ausgesetzt waren wurde ein Wechsel von der G0-Phase in die G1-Phase des Zellzyklus beobachtet. Der Beginn der G1-Phase wird durch die Aktivierung der CDK4/6 mittels erhöhter Cyclin D1 Expression eingeleitet (Morgan, 1997). Die CDK4 kann ebenso wie die CDK5 Rb phosphorylieren, was die Dissoziation von dem Transkriptions-Repressor-Komplex bedeutet und ein Fortschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Obwohl neuronale Zellen die S- oder sogar G2-Phase erreichen können und die DNA-Replikation beginnt, passieren sie nicht den G2/M Checkpoint und degenerieren vor der Mitose, da sie im Vergleich zu mitotischen Zellen keine normale Zellzyklus Maschinerie mehr besitzen (Heintz, 1993; Hernandez-Ortega et al., 2007).

Mit Hilfe des Calcium-Chelators Bapta ließ sich die Expression von Cyclin D1 und somit die Reaktivierung des Zellzyklus verhindern. Dieses Ergebnis deutete auf eine Verbindung zwischen der Reaktivierung des Zellzyklus und dem erhöhten cytosolischen Calcium, hervorgerufen durch Cimes hin. Auf Grund der gefundenen essentiellen Beteiligung von Calpain an der Cimes induzierten Apoptose wurde Calpain auch in diesem Falle als Bindeglied zwischen der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration und der aberranten

Aktivierung des Zellzyklus in Betracht gezogen. Tatsächlich verhinderte die Inhibierung von Calpain sowohl die erhöhte Expression von Cyclin D1 als auch die Phosphorylierung von Rb.

Da eine Inhibierung von Calpain nicht nur die Generierung von p25 und damit die Aktivierung der CDK5 betraf, sondern auch einen Einfluss auf die Zellzyklus Marker (Rb, CyclinD1) aufwies, wird eine CDK5 Überaktivierung stromaufwärts von dem Wiedereintritt in den Zellzyklus angenommen.

Diese Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass die CDK5 katalysierte Phosphorylierung von Rb als eine Folge der Calpain Aktivierung an der Reaktivierung des Zellzyklus beteiligt ist.

### **3.5 Cimes bewirkt eine Calpain vermittelnde Tau Hyperphosphorylierung und die Entstehung eines zusätzlichen Tau Fragments**

Beruhend auf der Delokalisation des CDK5/p25-Komplexes und der damit verbundenen veränderten Substratspezifität wurden weitere mögliche Substrate wie das Cytoskelett-Protein Tau in Betracht gezogen. Die CDK5 katalysierte Phosphorylierung von Tau wurde bereits gezeigt (Dhavan and Tsai, 2001). Die Hyperphosphorylierung von Tau induziert dessen Dissoziation von den Mikrotubuli und führt schließlich zu der Bildung intrazellulärer neurofibrillärer Bündel, eines der Markenzeichen der Alzheimer Erkrankung (AD) und Kennzeichen der Tauopathien (Hardy, 2003; Lee and Tsai, 2003). Diese Ereignisse wurden bereits in vielen Arbeiten mit dem neuronalen Zelltod in Verbindung gebracht (Arriagada et al., 1992; Hamdane et al., 2003; Eckermann et al., 2007). Zudem wurde von einer gesteigerten Expression an Tau in AD berichtet (Sjogren et al., 2001).

Erwähnenswert ist überdies die physiologisch nicht schädliche Tau Hyperphosphorylierung in fötalem Gewebe und in einigen mitotischen Zellen, die darauf hindeutet, dass mitotische Signale eine Tau Hyperphosphorylierung hervorrufen können (Mandelkow and Mandelkow, 1998). Dabei ist zu bedenken, dass Cimes in Neuronen im Grunde als mitotisches Signal agiert, denn ebenso wie es in Fibroblasten Proliferation induzierte (van Echten-Deckert et al., 1998), aktivierte Cimes auch in Neuronen den Zellzyklus, allerdings mit apoptotischem und nicht proliferativem Ergebnis (Naetzker et al., 2006). Somit befürwortet das mitotische Potential von Cimes diese Hypothese.

Tatsächlich induzierte Cimes neben einem leichten Anstieg der Tau Expression auch die Hyperphosphorylierung des Tau Proteins. Die Zugabe von Cimes führte ferner zur Entstehung

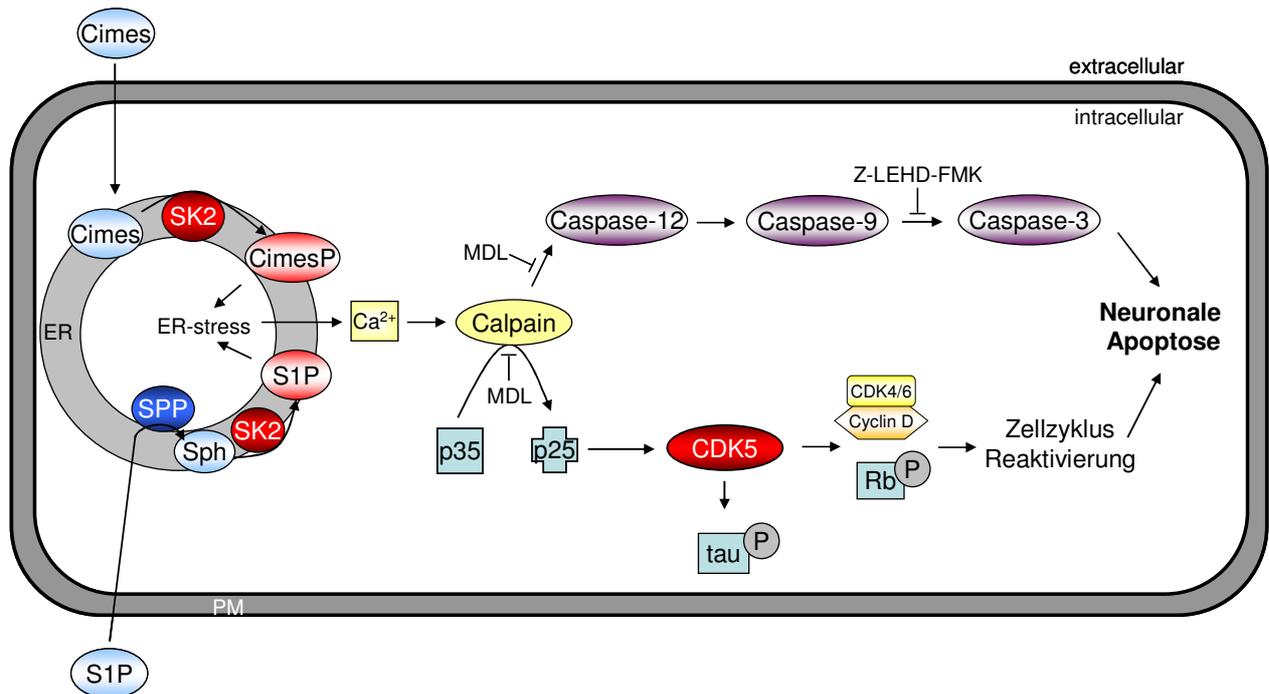
eines zusätzlichen Tau-Fragmentes mit einem Molekulargewicht von 30 kDa, welches in schwächerer Ausprägung auch in den Kontrollen erschien. Allerdings verhinderte die Inhibierung von Calpain die Entstehung des 30 kDa Fragments. Die anderen Tau-Banden blieben in ihrer Stärke erhalten und nahmen beim Erscheinen des 30 kDa Fragments nicht ab, so dass dessen Erscheinen höchstwahrscheinlich auf eine Calpain-vermittelte Spaltung von Tau zurückzuführen war. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Zugabe von A $\beta$  in Hippocampus Neuronen zu der Generierung eines zusätzlichen Tau-Fragmentes von allerdings nur 17 kDa führte, dessen Erscheinen ebenfalls mit dem Calpain-Inhibitor verhindert werden konnte, woraus geschlossen wurde, dass Calpain für die Entstehung dieses 17 kDa Fragments verantwortlich war (Park and Ferreira, 2005).

In weiteren Studien mit Sphingoidphosphaten traten zudem Veränderungen in der Phosphorylierung von Tau auf. Die Inkubation der Neuronen mit S1P bzw. Cimes resultierte in einer Hyperphosphorylierung von Tau an pathologisch relevanten Stellen, die durch eine Inhibierung von Calpain revidiert wurde. Die Hyperphosphorylierung des Tau Proteins führt zu dessen Dissoziation von den Mikrotubuli, sowie zur Bildung der so genannten gepaarten helicalen Fragmente und fördert deren Aggregation (Meraz-Rios et al., 2009). Die verstärkte Bildung dieser Tau-Fibrillen hat letztendlich Neurodegeneration und die Beeinträchtigung des Gedächtnisses zur Folge (Dickson, 2009).

Die Reduktion der Tau Hyperphosphorylierung auf ein physiologisches Niveau mittels der Calpain Inhibierung ist in Einklang mit jenem Ergebnis bei der p25 Generierung und deutet darauf hin, dass die CDK5 an der Tau Phosphorylierung beteiligt ist und diese wiederum durch Calpain vermittelt wird. Die Hyperphosphorylierung von Tau in Gegenwart von Cimes und S1P deutet auf eine funktionelle Beziehung zwischen der Neurotoxizität der Sphingoidphosphate und der pathologisch relevanten Tau Aggregation hin.

### 3.6 Zusammenfassung des Signalweges

Insgesamt deuten die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass der neurotoxische Effekt der Sphingoidphosphate durch einen Calpain vermittelten Mechanismus verursacht wird, der den CDK5/p25-Komplex sowie die ER-Stress spezifische Caspasen-Kaskade beinhaltet (Abb. 57).



**Abb. 57: Schema der vorgeschlagenen Signalkaskade der Sphingoidphosphat-induzierten Apoptose.** Calpain ist das zentrale Signalmolekül und vermittelt die Sphingoidphosphat-induzierte neuronale Apoptose durch die Aktivierung der ER-Stress spezifischen Caspasen-Kaskade und der Spaltung des CDK5 Aktivators p35 zu p25, was schließlich zu der Reaktivierung des Zellzyklus und der Tau-Hyperphosphorylierung führt. CDK5 – cyclin dependent kinase5, Cimes – cis-4-Methylsphingosin, CimesP – cis-4-Methylsphingosin Phosphat, ER – Endoplasmatisches Reticulum, PM – Plasmamembran, Rb – Retinoblastoma Protein, S1P – Sphingosin-1-phosphat, SK2 – Sphingosin-Kinase2, Sph – Sphingosin, SPP – S1P-Phosphatase.

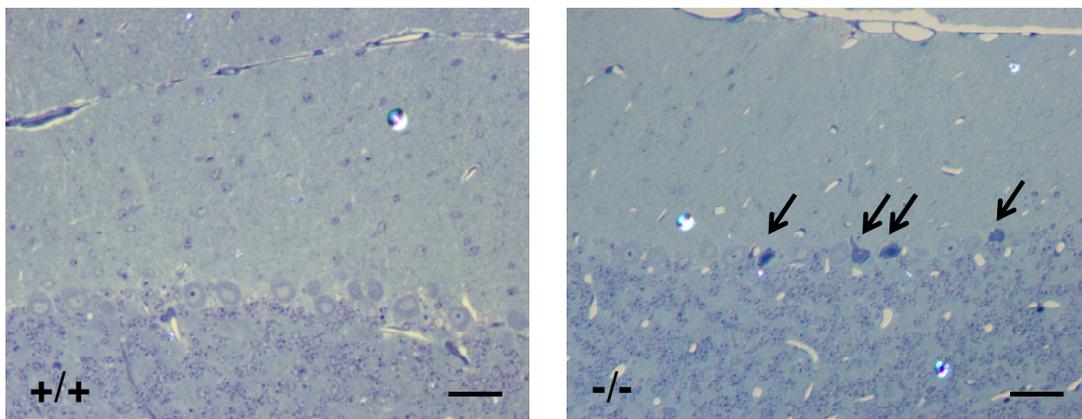
In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die S1P abhängige Neurotoxizität Parallelen zu jener von A $\beta$  aufweist. S1P induziert eine Reaktivierung des Zellzyklus und die Aktivierung der CDK5 ebenso, wie es bereits für A $\beta$  beschrieben worden ist (Varvel et al., 2008; Lopes et al., 2010). In beiden Fällen verhinderte der Calpain-Inhibitor MDL den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die durch p25 hervorgerufene CDK5 Überaktivierung.

Insbesondere Calpain wurde als ein zentrales Molekül in vielen neurologischen Krankheiten bekannt (Camins et al., 2006), dessen Aktivierung unter anderem mit dem neuronalen Zelltod bei der Ischemischen Gehirnverletzung (Saido et al., 1994), in Morbus Alzheimer (Saito et al.,

1993), Morbus Parkinson (Alvira et al., 2008) und Multipler Sklerose (Shields et al., 1998) in Verbindung gebracht wird.

### 3.7 Pathophysiologische Bedeutung von S1P

Bestätigt werden die hier vorgestellten *in vitro* Ergebnisse durch Semidünnschnitte des Kleinhirns aus SPL-defizienten und Wildtyp Mäusen, die in Kooperation mit Prof. Dr. Dieter Hartmann hergestellt wurden (**Abb. 58**). In den Schnitten des Kleinhirns aus SPL-defizienten Mäusen lassen sich degenerierte Purkinje Neuronen erkennen (**Abb. 58**, Pfeile). Zudem wurden im Hippocampus von SPL-defizienten Mäusen weitere absterbende Neuronen detektiert (Prof. Dr. Hartmann, persönliche Mitteilung).



**Abb. 58: Degenerierende Purkinje Neuronen im Cerebellum SPL-defizienter Mäuse.** Sagittalschnitt durch die Vermalregion des Cerebellum von adulten Wildtyp (+/+) und SPL-defizienten (-/-) Mäusen. Die Pfeile zeigen die degenerierten Purkinje Neuronen im cerebellaren Cortex. Die Balken entsprechen 50  $\mu$ m.

Basierend auf diesen Beobachtungen erfahren die mit Cimes durchgeführten Studien durchaus eine physiologische Bedeutung.

Störungen im Glykosphingolipid-Metabolismus könnten über das gemeinsame Abbauprodukt S1P mit der Neurodegeneration verbunden sein und somit bei der Entstehung der Demenz eine wichtige Rolle spielen.

### 3.8 Ausblick

Vieles ist im Bezug auf die Funktionen der S1P-Lyase noch weitestgehend unklar, wie die Entstehung des komplexen Phänotyps in den SPL-defizienten Mäusen zeigt. Mit Hilfe von S1P-Lyase/Sphingosin-Kinase1 bzw. 2 transgenen Mäusen könnte untersucht werden, ob die Deletion einer der beiden Kinasen den Phänotyp der SPL-Defizienz mindert. Dazu müßten *sgpl*-heterozygote Tiere mit SK1- bzw. SK2-defizienten verpaart werden.

Die komplexen Auswirkungen der SPL-Deletion betreffen verschiedene Organe und scheinen zu zahlreichen Entzündungsreaktionen in den Tieren zu führen (persönliche Mitteilung, van Veldhoven). Zudem sind viele neurodegenerative Krankheiten, unter ihnen insbesondere Morbus Alzheimer, mit lokalen Entzündungsreaktionen, welche durch die Aktivierung von Microgliazellen und die Rekrutierung von Astrocyten eingeleitet werden assoziiert (Sastre et al., 2006). Da Zellen des Immunsystems Rezeptoren für S1P besitzen (Graler and Goetzl, 2002), kann eine anhaltende S1P Erhöhung zu einer Störung in der Steuerung der Immunzellen führen und S1P-abhängige Signalwege dauerhaft aktivieren. Insbesondere Lymphocyten, deren Migration, Überleben und Cytokin-Produktion durch die S1P-Konzentration beeinflußt werden (Bandhuvula and Saba, 2007), wären von einer Störung im streng regulierten S1P Metabolismus betroffen. Ein interessanter Ansatzpunkt hierzu wäre die Untersuchung des S1P Einflusses auf die Microgliazellen und Astrocyten des Gehirns. Es wurde bereits gezeigt, dass die Sphingosin-Kinase1 stromabwärts von TNF $\alpha$  agiert und für die Expression der Cyclooxygenase2 (COX-2) und die Synthese von Prostaglandin E2 benötigt wird (Pettus et al., 2003). Interessanterweise wurde mittlerweile auch die Beteiligung der Sphingosin-Kinase2 an Entzündungsreaktionen in Betracht gezogen, während die Rolle der SPL nach wie vor ungeklärt ist (Mechtcheriakova et al., 2007). Mit Hilfe der SPL-defizienten Mäuse könnte die Beteiligung der SPL an inflammatorischen Prozessen untersucht werden.

Des Weiteren wären weitere immunhistologische Untersuchungen des Gehirns der SPL-defizienten Mäuse von Interesse. Da die S1P-Lyase S1P zu Phosphoethanolamin und Hecadecenal abbaut (Van Veldhoven, 2000), fehlen diese beiden Moleküle im Metabolismus der SPL-defizienten Mäuse. Als Folge der S1P-Lyase Deletion käme somit ein veränderter Lipidmetabolismus in Frage.

In Bezug auf den positiven Einfluss von S1P auf die Tumorgenese (Takabe et al., 2008) wurde bei der Inkubation von Neuroblastomazellen mit Cimes erstaunlicherweise von einem apoptotischen Effekt berichtet (Natzker et al., 2002). Es ist zudem bekannt, dass die

Sphingosin-Kinase1 in vielen Krebsarten überexprimiert wird und vorgeschlagen wurde, *Sphk1* (Gen der SK1) als Onkogen zu bezeichnen (Xia et al., 2000). Darauf aufbauend wären weitere Studien von Interesse, in denen der Einfluss von Cimes auf cancerogener Gene und Proteine untersucht wird.

## 4 Zusammenfassung

Kleinhirnneuronen von S1P-Lyase-defizienten Mäusen und ein synthetischen Sphingosin Analogon wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Toxizität von S1P, einem bioaktiven Sphingolipid, in terminal differenzierten Nervenzellen zu untersuchen. Beruhend auf vorherigen Arbeiten unserer AG (Naetzker et al., 2006), welche die apoptotische Wirkung des semi-synthetischen S1P Analogons CimesP (cis-4-Methylsphingosin-Phosphat) in Neuronen demonstrierten, wurde untersucht, ob S1P in S1P-Lyase-defizienten Zellen ebenfalls neurotoxisch wirkt, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig belegt werden konnte. Dabei wurde festgestellt, dass nicht nur die Menge an Sphingoidphosphaten für den neurotoxischen Effekt verantwortlich ist, sondern auch die Kinase, welche die Phosphorylierung katalysiert. Es handelt sich um die Sphingosin-Kinase2 (SK2), die bekanntlich im ER lokalisiert ist und im Gegensatz zur Sphingosin-Kinase1 (SK1), die an der PM aktiv ist, eine viel geringere Substratspezifität aufweist. Untersuchungen mit SK1 und SK2-defizienten Mäusen ergaben, dass Cimes nur in SK1-defizienten Neuronen toxisch wirkte, nicht aber in SK2-defizienten. Demnach ist die SK2 sowohl für die Cimes induzierte Apoptose in Wildtyp Neuronen wie auch für die S1P induzierte Apoptose in S1P-Lyase-defizienten Neuronen essentiell.

Tatsächlich entsprachen die Effekte von Cimes in Wildtyp Neuronen denen von S1P in S1P-Lyase-defizienten Nervenzellen.

Überdies wurde in der vorliegenden Arbeit der molekulare Mechanismus der Sphingoidphosphat induzierten Apoptose entschlüsselt.

In Übereinstimmung mit der S1P-gesteuerten Regulation der Calcium Homeostase wurde der Einfluss der Sphingoidphosphate auf die Integrität des Endoplasmatischen Reticulums (ER) mittels Aktivierung der ER-Stress spezifischen Caspasen-Kaskade nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass Caspase-9 unabhängig von den Mitochondrien von Caspase-12 aktiviert wird.

In Anbetracht des Einflusses der Sphingoidphosphate auf die Calcium-Freisetzung aus dem ER sowie der Aktivierung des ER-stress spezifischen Signalweges wurde die Beteiligung Calcium-abhängiger Enzyme in Betracht gezogen. Es konnte schließlich gezeigt werden, dass die calciumgesteuerte Protease Calpain den Mediator der Sphingoidphosphat-induzierten Neurotoxizität darstellt. Die Inhibierung von Calpain führte zu einer vollständigen Aufhebung der Cimes-induzierten Apoptose, was auf die Beteiligung von Calpain an der Reaktivierung des Zellzyklus hinwies und in dieser Arbeit auch bestätigt werden konnte.

Der nächste Schritt war nun die Identifikation Calpain gesteuerter Proteine, die eine Reaktivierung des Zellzyklus ermöglichten. Es wurde schließlich gezeigt, dass die Aktivierung der CDK5 (cyclin dependent kinase5) mittels Calpain katalysierter Generierung von p25 zur Erhöhung der Cyclin D1 Menge sowie zur Phosphorylierung von Rb (retinoblastoma protein) führte.

Schließlich konnte eine funktionelle Verbindung zwischen den Sphingoidphosphaten und der Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, dessen neurofibrilläre Bündel ein Charakteristikum von AD sowie zahlreichen weiteren neurodegenerativen Erkrankungen bilden, experimentell nachgewiesen werden.

Folglich lässt die S1P vermittelte Neurotoxizität eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit jener des Amyloid- $\beta$  Peptids ( $A\beta$ ), dem Hauptbestandteil der für Morbus Alzheimer (AD) charakteristischen Amyloid Plaques erkennen.

Möglicherweise stellt S1P somit die Schnittstelle zwischen dem Sphingolipid-Metabolismus und der Neurodegeneration dar.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
Alpha DigiDoc	Alpha Innotech	
Analysewaage	BP 210 D, Sartorius	Göttingen
Autoklav	Fedegari	Albuzzano, Italien
	Varioklav 50050, H+P Labortechnik	Oberschlesien
Blotting Aparatur	iBlot, Invitrogen	Karlsruhe
Brutschränke	Heraeus	Hanau
ELISA-Reader	Multiscan Ascent, Dynex Hybaid Labsystems	Frankfurt
Fluorometer	Digitalfluorimeter Modell 8-9; Locarte, Dynex Hybaid Labsystems	Frankfurt
Gelapparatur für Agarosegele	ComPhor Midi, Biozym	Oldendorf
Gelapparatur für Polyacrylamidgele	Multigel, Biometra	Göttingen
Geldokumentationsanlage	AlphaDigiDoc, Biozym	Oldendorf
Inkubationsroller	Renner	Darmstadt
Inkubationsschüttler	KS-250 basic, Ika-Labortechnik	Staufen
LightCycler	LightCycler 1.5, Roche	Mannheim
Mikrowelle	Privileg, Pro-Markt	Bonn
pH-Meter	PH 537; WTW,	Weilheim
Photometer	Smart Spec 3000; BioRad	München
Pipetten	Eppendorf Research 2,5, 10, 20, 100, 200, 1000	Hamburg
Reacti-Therm III	Piece Chemical Company	Rockford, USA
Reinstwasseranlage	EasypureUV/UF; Barnsted/Werner MembraPure, Millipore	Leverkusen Schwallbach
Röntgenkassette	Chronex, DuPont	De Nemour, Frankreich

Schüttelwasserbad	1083, Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Spannungsquelle	Consort, Biometra	Göttingen
	PowerPac 3000, BioRad	München
Spülmaschine	Mielabor G7783, Miele	Köln
Sterilbank	Biohazard; Gelaire	Mailand, Italien
	Heraeus	Hanau
Szintillationszähler	Packard Tricarb 1600 TR	Rodgau-Jügesheim
Thermocycler	PTC-200; MJ Research/Biozym	Oldendorf
Thermomixer	Comfort, Eppendorf	Hamburg
Tiefkühlschrank (+4°C,- 20°C)	Bosch economic, Robert Bosch GmbH	Geringen-
		Schillerhöhe
Tiefkühlschrank (-80°C)	NapCoil UF 5000, NAPCO	Winchester, USA
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf	Hamburg
Trockenschrank	Heraeus	Hanau
Ultraschallgerät	Sonifer B12 mit wassergekühltem cup- horn; Branson Sonic Power Company	Danbury, USA
Vortexer	Bender-Hohlbein	Zürich, Schweiz
Waage	Sartorius	Göttingen
Zentrifuge	Megafuge 2.0 R, Heraeus	Hanau
	Multifuge 3 S-R, Heraeus	

## **5.2 Verbrauchsmaterialien**

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
DC-Platten	Merck	Darmstadt
Filterpapier	Macherey-Nagel	Düren
Mikrotiterplatte	Falcon, Beckton-Dickinson	Heidelberg
Nitrocellulose-Membran	Invitrogen	Karlsruhe
Parafilm	AAC	Greenwich, USA
Petrischalen (8 cm <sup>2</sup> )	Falcon, Beckton-Dickinson	Heidelberg
Pipettenspitzen	Greiner	Nürtingen
Reaktionsgefäße (1,5/2ml)	Eppendorf	Hamburg
Röntgenfilme	Kodak Biomax MS-1, Sigma	Taufkirchen
Schraubkappengläser	VWR	Darmstadt

Spritzenvorsatzfilter	Millipore	Schwalbch
Szintillationsvials	Packard	Frankfurt
Vivaspin Röhrchen	Sartorius / Vivascience	Göttingen
Zellkulturschalen	6-well, Costar	Cambridge, USA
Zellschaber	Costar	Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen	Greiner	Nürtingen

### 5.3 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
Acrylamidmix 37,5:1, 40%ig	Roth	Karlsruhe
Agarose, Seakem LE	MJ Research/Biozym	Oldendorf
BAPTA-AM	Invitrogen	Karlsruhe
1-Butanol	Merck	Darmstadt
Chloroform	Calbiochem/VWR	Darmstadt
Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche	Mannheim
Coomassie-blue R260	Serca	Heidelberg
Cytosin- $\beta$ -D-Arabino-Furanosid-Hydrochlorid (AraC)	Sigma	Taufkirchen
DMSO	AppliChem	Darmstadt
EDTA	Merck	Darmstadt
EGTA	Sigma	Taufkirchen
Essigsäure	Riedel de Haen	Seelze
Ethanol	Riedel de Haen	Seelze
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Glycerol	Sigma	Taufkirchen
Glycin	Sigma	Taufkirchen
HEPES	Merck	Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
Methanol	Riedel de Haen	Seelze
NaH <sub>2</sub> <sup>32</sup> P <sub>4</sub>	Amershan	Freiburg

Natriumacetat	Merck	Darmstadt
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma	Taufkirchen
Natriumfluorid	Merck	Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck	Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Merck	Darmstadt
N,N,N'.N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biomol GmbH	Hamburg
Pferdeserum	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Poly-L-Lysin	Sigma	Taufkirchen
Roti-Block	Roth	Karlsruhe
Roti-Load	Roth	Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Riedel de Haen	Seelze
Tricin, ultra pure	ICN	Meckenheim
Tris, ultra pure	ICN	Meckenheim
Tween-20	Sigma	Taufkirchen

## 5.4 Inhibitoren

<b>Inhibitor</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
CDK-4-Inhibitor	Calbiochem / VWR	Darmstadt
Caspase-9 Inhibitor Z-LEHD-FMK	R & D Systems	Wiesbaden
Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche	Mannheim
DMS (D-erythro-N,N-Dimethylsphingosin)	Calbiochem	Darmstadt
JTE 013	Tocris Bioscience	Elisville, USA
MDL 28170, Calpain Inhibitor	Sigma	Taufkirchen
Ru 360	Calbiochem	Darmstadt
Sphingosine-kinase1 Inhibitor (SKI)	Biozol	Eching

## 5.5 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
ApoTarget Caspase-3 Colorimetic Protease Assay	Invitrogen	Karlsruhe
ApoTarget Caspase-8 Colorimetic Protease Assay	Invitrogen	Karlsruhe
ApoTarget Caspase-9 Colorimetic Protease Assay	Invitrogen	Karlsruhe
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega	Mannheim
QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	Qiagen	Hilden
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (ECL Kit)	Roche	Mannheim

## 5.6 Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller/Vertreiber</b>	<b>Standort</b>
12E8 (Phospho-tau)	Elan Pharma	Californien, USA
$\alpha$ -Tubulin IgG	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Anti-Kaninchen-IgG	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.
Anti-Maus-IgG	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.
Anti-Ziege-IgG	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.
Calpain 1 IgG1	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Calpain 2 polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Caspase-12 polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
CDK 5 IgG1	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Cyclin D1 IgG2b	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Cytochrom c IgG	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.
K9JA (pan tau)	DAKO	Carpinteria, CA, USA
p35 IgG	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
PHF-1 (Phospho-tau)	Peter Davis, College of Medicine	New York
Phospho Rb polyclonal	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.
Rb IgG2a	Cell Signaling / NEB	Frankfurt a. M.

## 5.7 Enzyme & Proteine

Artikel	Hersteller/Vertreiber	Standort
Pertussistoxin (PTX)	Sigma	Taufkirchen
Protein-Größenstandard	Invitrogen	Karlsruhe
Protease	Qiagen	Hilden
SuperScript III (200U/μl)	Invitrogen	Karlsruhe
Ribonuclease A	Qiagen	Hilden
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma	Taufkirchen
Taq Polymerase Platinum	Invitrogen	Karlsruhe

## 5.8 Lipide

Lipid	Hersteller/Vertreiber	Standort
cis-4-Methylsphingosin (Cimes) (Synthese nach (Bär et al., 1993)), SL 10 mM in Methanol	Prof. Dr. R. Schmidt	Universität Konstanz
FTY 720, SL 10 mM in Methanol	Merck	Darmstadt
Sphingosin, SL 10 mM in Methanol	Sigma	Taufkirchen
Sphingosin-1-phosphat (S1P), SL 1,3 mM in Methanol	Sigma	Taufkirchen

## 5.9 DNA

DNA	Hersteller/Vertreiber	Standort
DNA-Größenstandard	BioRad	München

## 5.10 Medien

Medium	Hersteller/Vertreiber	Standort
DMEM	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
DMEM modified (calciumarm)	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
MEM	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
MEM, phosphatfrei	Promocell	Heidelberg
OptiMEM	Invitrogen	Karlsruhe

## 5.11 Versuchstiere

Zur Analyse der intrazellulären Wirkung von S1P an neuronalen Zellkulturen wurden folgende Mäuse verwendet: S1P-Lyase (SPL) defiziente Mäuse, die von Prof. Paul P. Van Veldhoven (Katholieke Universiteit Leuven, Campus Gasthuisberg, Department Molecular Cell Biology, LIPIT, Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt wurden, Sphingosine-Kinase 1 (SK1) und Sphingosin-Kinase 2 (SK2) defiziente Mäuse aus dem Labor von Richard L. Proia (Genetics of Development and Disease Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda MD 20892, USA) sowie Wildtyp Mäuse (Swiss Webster, C57Bl/6) aus dem Tierhaus der Universität Bonn. Nach Überführung der Tiere wurden diese in der Tierhaltungseinrichtung Nußallee der Universität Bonn gehalten.

## 5.12 Genotypisierung transgener Mäuse

**Lysispuffer:** NaOH 25 mM, EDTA, pH 12 0,2 mM

**MOPS:** 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure 50 mM

Zuerst wurden den Mäusen mit einer sterilen Schere ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 70 µl Lysispuffer und einer Stahlkugel (5 mm Durchmesser) wurden die Schwanzproben 2x bei 20 Hz für 20 sec in einer MixerMil zerkleinert. Nach Entfernen der Stahlkugel wurden die Proben 1 h bei 95°C und 300 rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde der Lysispuffer mit 70 µl MOPS neutralisiert und die Proben für 10 min bei 10000 x g (4°C) zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden direkt 5 µl für die PCR entnommen.

### 5.12.1 Genotypisierungs-PCR (Polymerase chain reaction)

**Primer:** nach Herstellerangaben verdünnt

**Oligonukleotide (dNTP):** fertiger Mix aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP (Invitrogen)

**Taq-Polymerase:** Platinum Taq (Invitrogen)

**ddH<sub>2</sub>O:** Reinstwasser

Für die Genotypisierung der S1P-Lyase defizienten Tiere wurden die Primer SPL-Trap und Gal verwendet. Die PCR für die Sphingosin-Kinase 1 bzw. 2 defizienten Mäuse benötigte die Primer SK1 P1, P2, P3 bzw. SK2 P3, P4, P5.

Folgende Primer wurden verwendet:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
Gal-2s	CGA ATA CCT GTT CCG TCA TAG C
Gal-2r	ACC ACT ACC ATC ATC AAT CCG GTA G
SPL-Trap-s	TGA TAG GGC TGA AAA CCA CTG
SPL-Trap-r	TCA GAA GCA AAA CTG CCT TG
SK1 P1:	TGT CAC CCA TGA ACC TGC TGT CCC TGC ACA
SK1 P2:	AGA AGG CAC TGG CTC CTC CAA GAG GAA CAA G
SK1 P3:	TCG TGC TTT ACG GTA TCG CCG CTC CCG ATT
SK2 P3:	GCA CCC AGT GTG AAT CGA GC
SK2 P4:	TCT GGA GAG GGG CTG CTT TA
SK2 P5:	CGC TAT CAG GAC ATA GCG TT

Die Reaktionsansätze für die Genotypisierungs-PCRs waren wie folgt:

#### **Reaktionsansatz für S1P-Lyase PCR**

<b>Komponente</b>	<b>1x [µl]</b>
10 x Puffer advanced	5,0
10 mM dNTP-Mix	1,0
10 µM Gal-Primer	2,0
10 µM SPL-Primer	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0
Taq-Polymerase	0,3
ddH <sub>2</sub> O	33,7
Summe	50

**Reaktionsansatz für Sphingosin-Kinase 1 PCR**

<b>Komponente</b>	<b>1x [<math>\mu</math>l]</b>
10 x Puffer advanced	5,0
10 mM dNTP-Mix	1,0
100 $\mu$ M Primer 1	1,0
100 $\mu$ M Primer 2	1,0
100 $\mu$ M Primer 3	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
Taq-Polymerase	0,5
ddH <sub>2</sub> O	34
Summe	50

**Reaktionsansatz für Sphingosin-Kinase 2 PCR**

<b>Komponente</b>	<b>1x [<math>\mu</math>l]</b>
10 x Puffer advanced	5,0
10 mM dNTP-Mix	1,0
100 $\mu$ M Primer 3	1,0
100 $\mu$ M Primer 4	1,0
100 $\mu$ M Primer 5	1,0
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
Taq-Polymerase	0,5
ddH <sub>2</sub> O	34
Summe	50

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermocycler (Eppendorf) gegeben. Die PCR verfuhr immer nach den Schritten

- 1) Denaturierung (94°C)
- 2) Annealing (Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA Matrize, 55 – 65°C)
- 3) Extension (Verlängerung bzw. Synthese der DNA, 72°C).

Die angegebenen Temperaturen und Zeiten richten sich nach den zu amplifizierenden DNA Sequenzen.

Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

**PCR S1P-Lyase**

2 min	94°C
30 sec	94°C
30 sec	60°C
1 min	72°C
35 Zyklen	Goto Step 2
7 min	72°C

**PCR Sphingosin-Kinase 1**

5 min	94°C
1 min	94°C
1 min	65°C
1 min	72°C
39 Zyklen	Goto Step 2
5 min	72°C

**PCR Sphingosin-Kinase 2**

5 min	94°C
30 sec	94°C
30 sec	55°C
2 min	72°C
39 Zyklen	Goto Step 2
5 min	72°C

### 5.12.2 Visualisierung der DNA Fragmente

**TAE Puffer:** Tris / Acetat 40 mM, EDTA 1 mM

**Ladepuffer 10x:** Bromphenolblau 0,25%, SDS 1%, Glycerin 30%, ddH<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid-Lösung:** 5mg/ml, dH<sub>2</sub>O

Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden in einem 1,5%-igen Agarosegel mit 0,003% Ethidiumbromid durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Identifizierung der Banden erfolgte mittels UV-Licht in der DigiDoc.

<b>S1P-Lyase</b>	Bandengröße
+/+ (S1P-Lyase)	499bp
-/- (Galaktosidase)	667bp
<b>Sphingosin-Kinase 1</b>	Bandengröße
+/+	300bp
-/-	350bp
<b>Sphingosin-Kinase 2</b>	Bandengröße
+/+	680bp
-/-	310bp

## 5.13 Primärkultur von Kleinhirnneuronen der Maus

### 5.13.1 Vorbereitung von Zellkulturschalen für die Primärkultur

**Poly-L-Lysin-Lösung:** Borsäure pH 8,4 100 mM, Poly-L-Lysin 0,001%

**DMEM:** DMEM mit Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 mg/l, 10% Pferdeserum

8 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen wurden eine Stunde vor der Präparation mit Poly-L-Lysin beschichtet und kurz vor der Aussaat der Zellen zweimal mit DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) und anschließend einmal mit DMEM + 10% Pferdeserum gewaschen.

### 5.13.2 Herstellung der Primärkultur

**CMF:** Tyrodelösung I 50 ml, Tyrodelösung II 49,5 ml, NaHCO<sub>3</sub> (5%) 0,2 ml, Phenolrot 0,3 ml

**Tyrodelösung I:** Glucose 0,4%, KCl 0,06%, NaCl 1,6%, NaCl 1,6%

**Tyrodelösung II:** KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,005%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01%

**CMF/Mg:** CMF 27,6 ml, MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O 45 mg

**Trypsin/DNAse:** DNAse I 0,1%, Trypsin 0,015%, in CMF/Mg

**DNAse:** DNAse I 0,05%, in DMEM

**AraC:** Cytosin-β-D-Arabino-Furanosid-Hydrochlorid 4 mM, in PBS

**PBS:** KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM

Die primären Neuronen wurden aus dem Kleinhirn von 6 Tage alten Mäusen präpariert, die in dem Tierhaus der Universität Bonn geboren wurden. Nach der Dekapitierung der Mäuse

wurde das Gehirn der Hirnschale entnommen und von der Hirnhaut befreit. Das zerkleinerte Kleinhirn wurde in CMF ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freier Tyrodepuffer) überführt und dreimal darin gewaschen. Um die Zellverbände zu lösen erfolgte nach dem dritten Waschen eine 14minütige Inkubation mit Trypsin/DNase I bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Kleinhirnstücke dreimal mit DMEM + 10% Pferdeserum gewaschen, um das Trypsin zu entfernen. Nach einer erneuten Inkubation für 2 min mit DMEM + 10% Pferdeserum (PS) + 0,05% DNase I begann die mechanische Zerkleinerung der Gewebestücke mit an der Spitze schmaler werdenden Pasteurpipetten. Die Zellsuspension wurde anschließend für 7 min mit 1000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM + 10% Pferdeserum aufgenommen und in die vorbereiteten Zellkulturschalen gegeben. Pferdeserum fördert die Regeneration der Zellen nach dem Stress der Isolation. In jede Schale wurden  $6 \times 10^6$  Zellen ausgesät, die mit DMEM + 10% Pferdeserum auf 2475  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurden. Am folgenden Tag, nach 24 Stunden, wurden pro Schale 25  $\mu\text{l}$  des Mitosehemmers AraC (Cytosin- $\beta$ -D-Arabino-Furanosid-Hydrochlorid, Stammlösung 4 mM, Endkonzentration auf den Zellen 0,04 mM) auf die Zellen gegeben, um das Wachstum teilungsfähiger Zellen, z.B. Fibroblasten aus der Hirnhaut, zu verhindern. Dies ist notwendig, da sich die Kleinhirnzellen im postmitotischen Stadium befinden und sonst von teilenden Zellen überwachsen würden. Die so vorbereitete Primärkultur wurde nach 5 Tagen zu weiteren Versuchen verwendet.

### 5.13.3 Vorbereitung primärer Nervenzellen für die Versuche

**MEM:** MEM mit Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 mg/l, Pferdeserum 0,3%, AraC 1%

**AraC:** Cytosin- $\beta$ -D-Arabino-Furanosid-Hydrochlorid 4 mM, in PBS

**PBS:** KCl 3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM, NaCl 140 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  16 mM

Bevor die Zellen für die Versuche verwendet wurden, erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellschalen mit serumarmen Medium (MEM (Minimum essential medium) + 1% Penicillin/Streptomycin + 0,3% PS + 1% AraC). Anschließend wurde das Inkubationsmedium hinzu gegeben. Die Lipide (cis-4-Methylsphingosin, Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat) wurden den Zellen als BSA (Bovine Serum Albumin)- Komplex verabreicht, da die Komplexbildung die Aufnahme in die Zellen erleichtert und den natürlichen Zustand der Lipide im Serum simuliert. Des Weiteren senkt es die Toxizität von Sphingolipiden, da diese als Detergenzien wirken können. Das BSA wurde in MEM + 0,3% PS + 1% AraC gelöst (4 mg BSA pro ml Medium) und nach der Zugabe von cis-4-Methylsphingosin bzw.

Lösungsmittel als Kontrolle für 30 min bei 37°C im Wasserbad geschüttelt, um die Bildung der BSA-Komplexe zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde zusätzlich zu den 100 µl BSA-Medium noch 900 µl MEM + 0,3% PS + 1% AraC hinzugegeben und durch Ultraschall (1 min) vermischt.

In einigen Fällen wurden die Nervenzellen zuerst mit den eingesetzten Inhibitoren vorbehandelt. Hierzu wurden die verwendeten Reagenzien in 900 µl MEM + 0,3% PS + 1% AraC gelöst und die Zellen vor Zugabe der BSA-Medien mit dem Inhibitor-Medium vorinkubiert. Als Kontrollen dienten auch hier die entsprechenden Mengen an Lösungsmittel. Bei den Versuchen mit  $^{32}\text{P}$  wurde anstatt MEM phosphatfreies Medium verwendet.

#### **5.13.4 Herstellung des calciumfreien Mediums (100 nM Calcium)**

**DMEM:** DMEM mit Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 mg/l, PS 0,3%, AraC 1%

**EGTA:** EGTA 0,29 M in NaOH

**Calciumfreies Medium:** DMEM, 2,9 mM EGTA (30 min rühren), pH auf 7,3 einstellen

Das calciumfreie Medium zur Untersuchung des Calcium-Einflusses auf den Zellzyklus wurde aus DMEM und EGTA hergestellt. DMEM wurde unter ständigen Rühren mit EGTA versetzt, so dass die Endkonzentration von EGTA 2,9 mM betrug. Dies war die von dem berechnete Menge EGTA, die benötigt wurde, um das Calcium bis zu einer Endkonzentration von 100 nM zu komplexieren. Die Berechnung der Chelatoren wird unter 5.13.4.1 aufgeführt. Zuletzt erfolgte die Einstellung des pH mit HCl (Salzsäure) auf den physiologischen Wert 7,3.

##### **5.13.4.1 Berechnung der benötigten Chelator Konzentration**

Es wurde mit Hilfe des „Chelator Calculator“ (von Dr. Michael Hans) berechnet, wie viel EGTA (Gesamt EGTA) in das Medium gegeben werden muß, damit die Endkonzentration des Calciums (Freies Ca) bei einem pH Wert von 7,3 100 nM beträgt. Dabei wurden die im Medium befindlichen Magnesiumionen, die zu einem gewissen Grad ebenfalls von EGTA komplexiert werden berücksichtigt. Zur Berechnung mußten die Konzentrationen von im Medium vorhandenem Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) angegeben werden (Gesamt Ca, Gesamt Mg).

Gesamt Ca [M]	Gesamt Mg [M]	EGTA [M]	pH	Freies Ca [M]	Freies Mg [M]
0,0013	0,0008	0,0029	7,3	$9,9556 \times 10^{-8}$	0,0007

Ca-EGTA und Mg-EGTA geben die Konzentration an Calcium- bzw. Magnesium-EGTA Komplexen an.

Ca-EGTA [M]	Mg-EGTA [M]
0,0018	$6,7639 \times 10^{-5}$

## 5.14 Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs)

**DMEM:** DMEM mit Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 mg/l, FKS 20%, Glutamin 2 mM

Die MEFs wurden in DMEM (1% Penicillin/Streptomycin) + 2 mM Glutamin + 20 % hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS) kultiviert. Für die Experimente wurden die Zellen in 8 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen überführt und neues Medium zugegeben.

## 5.15 Zellernte

**PBS:** KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber im Medium geerntet und die Lösung anschließend für 10 min mit 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 500 µl kaltem PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen und wieder für 10 min mit 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Eine Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -80°C.

## 5.16 Bestimmung des Zelltods

### 5.16.1 Viabilitäts Test

**CellTiter-Blue Viability Assay (Promega):** CellTiter-Blue Reagenz

Der Viabilitäts Test wurde mit Hilfe des Promega CellTiter-Blue Viability Assays durchgeführt. Die Viabilität ist die Lebensfähigkeit der Zellen und gibt den Anteil lebender

Zellen wieder. Lebende Zellen reduzieren den Farbstoff Resazurin zu dem fluoreszierenden Resorufin, was sich in einer rötliche Färbung des Mediums zeigt. 24 Stunden nach Zugabe der Inkubationsmedien wurde 100 µl CellTiter-Blue Reagenz auf die Zellen in den Kulturschalen gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Menge an umgesetztem Farbstoff im Fluorimeter bestimmt. Resorufin wurde bei 544 nm angeregt und dessen Emission bei 590 nm gemessen. Der Anteil an umgesetzten Farbstoff spiegelt den Anteil an lebensfähigen Zellen wieder. Der gemessene Wert wird auf die Kontrolle bezogen, deren Anteil lebender Zellen auf 100% gesetzt wird.

### 5.16.2 Caspase – Assay

**Caspase Assay Kit (Invitrogen):** Lysispuffer, Reaktionspuffer, DTT, Substrat-pNA

Die Bestimmung der relativen Caspase-3, -8 oder -9 Aktivität erfolgte mit den entsprechenden Caspase Colorimetic Assay Kits von Invitrogen. Die gefrorenen Zellpellets wurden gemäß dem Hersteller in 50 µl Lysispuffer (Bestandteil des Kits) im Eis aufgetaut und anschließend mit 18000 xg für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurde der Mastermix vorbereitet, der aus folgenden Komponenten bestand:

N x 50 µl 2x Reaktionspuffer

N x 0,5 µl DTT

N x 5 µl 1 mM Substrat-pNA

N = Anzahl der Proben, einschließlich Referenz

Die Endkonzentration von DTT beträgt 10 mM, die des Substrats-pNA 50 µM.

Die Substrate unterscheiden sich zwischen den einzelnen Caspasen: Caspase-3 spaltet die Aminosäuresequenz DEVD (Aspartat, Glutamat, Valin, Aspartat), während Caspase-8 die Aminosäuresequenz IEVT (Isoleucin, Glutamat, Valin, Threonin) und Caspase-9 die Sequenz LEHD (Leucin, Glutamat, Histidin, Aspartat) erkennt. Der daran gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Nitroanilin (pNA) wird durch die Caspasen abgespalten und absorbiert Licht als freies Molekül bei 405 nm. Dithiotreithol (DTT) sorgt für ein reduzierendes Milieu, in dem die Caspasen aktiv sind.

50 µl des Mastermixes wurden zu jeder Probe hinzu gegeben. Die Referenz bestand aus 50 µl Mastermix und 50 µl Lysispuffer. Nun erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C im Wasserbad unter Ausschluss von Licht, da sonst die Gefahr bestand, dass sich der lichtempfindliche Farbstoff zersetzte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben und der Referenzwert auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung der Absorption erfolgte im MultiscanReader bei 405 nm. Die relative Aktivität der Caspasen wurde in Relation zu der Kontrolle bestimmt:

$$\text{Relative Caspase Aktivität} = (\text{Wert} - \text{Referenz}) / (\text{Kontrolle} - \text{Referenz})$$

### 5.16.3 Fluoreszenzanalyse (Vybrant Assay)

**Component A:** YO-PRO-1 dye 100 µM in DMSO

**Component B:** Propidium Iodid (PI) 1 mM in H<sub>2</sub>O

Während der Apoptose wird die Zellmembran durchlässiger. Einige Farbstoffe, wie der grün fluoreszierende YO-PRO-1 können somit in die Zelle gelangen, wohingegen der rot fluoreszierende Farbstoff PI (Propidium Iodid) dies nicht vermag. Die beiden Farbstoffe sind Teil des Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen). In jede Schale, die 1 ml Inkubationsmedium enthielt, wurden 1 µl YO-PRO-1 sowie 1 µl PI gegeben. Nach 20 min wurde die Fluoreszenz bestimmt.

### 5.16.4 DNA-Fragmentanalyse

#### 5.16.4.1 Isolierung genomischer DNA

**DNA Blood Mini Kit (QIAamp):** Puffer 1 und 2 werden mit abs. Ethanol versetzt

**ddH<sub>2</sub>O:** DNase freies Wasser

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (50). Die einzelnen Schritte richteten sich nach dem zum Kit gehörenden Protokoll.

Die Zellpellets wurden in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl QIA Protease, 5 µl RNase A und 200 µl Lysispuffer AL zur Lyse der Zellen sowie dem Abbau von RNA und Enzymen. Die Proben wurden gevortext und für 1 h bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl Ethanol wurden die Proben auf die QIAamp Säulen gegeben und 1 min mit 6800 xg bei 24°C zentrifugiert, wobei die DNA aus

den gelösten Zellpellets an die Säule bindet. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß gestellt und zuerst mit 500 µl Puffer AW1 und anschließend mit 500 µl Puffer AW2, jeweils bei 24°C für 1 min mit 6800 xg zentrifugiert. Danach erfolgte eine 3minütige Zentrifugation bei 24°C mit 18.000 xg zum Trocknen der Säule. Zum Eluieren der DNA wurden 50 µl Eluationspuffer direkt auf die Membran der Säule gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (1 min, 6800 xg, 4°C) wurde das Eluat wieder auf die Säule gegeben, um die Konzentration an DNA zu erhöhen. Nach weiteren 5 min wurde der obige Schritt wiederholt.

#### **5.16.4.2 DNA Quantifizierung**

**DNA Blood Mini Kit (QIAmp):** Puffer AE, ddH<sub>2</sub>O

Die Quantifizierung fand am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm statt, da Nukleinsuren hier ihr Absorptionsmaximum besitzen. Die DNA-Lösung wurde 1:37,5 mit Puffer AE aus dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (50) verdünnt und in einer Kunststoffküvette gemessen. Das Gesamtvolumen betrug 75 µl. Die Konzentration der DNA wurde vom Photometer mit Hilfe des Verdünnungsfaktors und des Absorptionskoeffizienten berechnet.

#### **5.16.4.3 Agarosegelelektrophorese**

**TAE Puffer:** Tris / Acetat 40 mM, EDTA 1 mM

**Ladepuffer 10x:** Bromphenolblau 0,25%, SDS 1%, Glycerin 30%, ddH<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid-Lösung:** 5mg/ml, dH<sub>2</sub>O

Die DNA wurde auf einem 1,9%igen Agarosegel aufgetragen. Zu 130 ml TAE Puffer wurden 2,5 g Agarose Seakem LE und 8 µl Ethidiumbromid gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV Licht mit Hilfe des AlphaDigiDoc betrachtet.

## 5.17 RNA Interferenz

### 5.17.1 siRNA Foreward Transfektion

**OptiMEM:** OptiMEM + 0,36% PS (kein Antibiotika)

**Lipofectamin:** in OptiMEM ohne Zusätze aufnehmen (kein Antibiotika, kein PS)

**RNAi Duplexe:** RNAi 50 nM, Lipofectamin nach Angaben des Herstellers in OptiMEM ohne Zusätze

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) wird doppelsträngige RNA (dsRNA) in die Zelle eingeschleust und führt so intrazellulär zum sequenzspezifischen Abbau der komplementären messenger RNA (mRNA). Das Einführen von dsRNA mit mehr als 30 Nucleotiden in Säugerzellen induziert allerdings eine starke antivirale Antwort, die unspezifische Effekte bis hin zu Apoptose der Zelle mit sich bringen kann. So müssen zur spezifischen Reduktion der Expression eines Gens (*knock down*) kleinere dsRNA Moleküle verwendet werden. Alleine das Einschleusen von 19-ner bis 21-iger siRNA bewirkt schon den Abbau der komplementären mRNA ohne die Induktion einer antiviralen Reaktion. Dieser Abbau der komplementären mRNA und damit die spezifische Reduktion der Genexpression ist jedoch transient. Die Transfektion erfolgte mittels lipidbasierenden Reagenzien (Lipofactamin) der Firma Invitrogen.

Die folgenden RNAi Duplexe wurden zum knock down der S1P Rezeptoren verwendet:

S1P1 (5'-GGAAUUUAGCCGCAGCAAA [dT] [dT]),

S1P2 (5'-CGACAUUUCUGGAGGGUAA [dT] [dT]),

S1P3 (5'-GUAAGUCAAGCUCCAGUAA [dT] [dT]),

S1P4 (5'-CUGCUGAACAUCACACUGA [dT] [dT])

S1P5 (5'-CAUAGAGAAUUCUAAACAA [dT] [dT]).

Die Transfektion der primären Neuronen mit siRNA Molekülen wurde mittels Lipofectamin RNAiMAX in OptiMEM (Invitrogen) durchgeführt. Die einzelnen Schritte richteten sich nach dem Protokoll des Herstellers.

Die eingesetzte Menge siRNA betrug 50 nM (50 pmol). Zuerst wurden die siRNA Komplexe mit Lipofectamin gebildet, indem die entsprechenden Mengen an siRNA und Lipofectamin zusammengegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. 24 h nach der Zugabe

der siRNA Komplexe zu den Neuronen, erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen für weitere 24 h.

### 5.17.2 RNA Isolation

**RNA-Kit (QIAmp):** enthält alle Puffer

**RLT-Puffer (aus dem Kit):** 1ml RLT-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol

**ddH<sub>2</sub>O:** RNase freies Wasser

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem QIAamp RNA Kit (50). Die einzelnen Schritte richteten sich nach dem zum Kit gehörenden Protokoll.

Die Zellen wurden in zum Kit gehörenden RLT Puffer (enthält β-Mercaptoethanol) mittels eines Zellschabers geerntet, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Homogenisieren der Pellets mit Stahlkugeln in der MixerMil für 2x 2 min mit 20 Hz. Nach der Zugabe von 70%igem Ethanol wurden die resuspendierten Zellen auf eine QIAamp Säule gegeben und 30 s mit 10.600 xg bei 24°C zentrifugiert, wodurch die RNA an die Säulen gebunden wird; der Durchlauf wird verworfen. Die Säule wurde in ein neues Auffanggefäß gestellt und mit 350 µl Puffer RW1 gewaschen (30sec 10.600 xg). Im Anschluß erfolgte der 15 minütige DNase Verdau, gefolgt von erneutem Waschen mit 350 µl RW1 (30sec 10.600 xg) und 2x 500 µl RPE (30sec 10.600 xg). Zum Trocknen der Säule wurde 1 min mit 18.000 xg zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 35 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und 1 min bei 10.600 xg zentrifugiert. Das Eluat wurde anschließend erneut aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt, um die Menge an RNA zu erhöhen.

### 5.17.3 RNA Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte wie die der DNA am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die RNA Lösung wurde 1:35 mit RNase freiem Wasser verdünnt und in einer Kunststoffküvette gemessen. Die Konzentration der RNA wurde vom Photometer mit Hilfe des Verdünnungsfaktors und des Absorptionskoeffizienten berechnet.

### 5.17.4 Agarosegelelektrophorese

**TAE Puffer:** Tris / Acetat 40 mM, EDTA 1 mM

**Ladepuffer 10x:** Bromphenolblau 0,25%, SDS 1%, Glycerin 30%, ddH<sub>2</sub>O

**Ethidiumbromid-Lösung:** 5mg/ml, dH<sub>2</sub>O

Um die Qualität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde diese auf ein 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Zu 120 ml TAE Puffer wurden 1,8 g Agarose (Seakem LE) und 7 µl Ethidiumbromid gegeben. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV Licht mit Hilfe der AlphaDigiDoc betrachtet.

### 5.17.5 Reverse Transkription

**Primer:** Random Hexamere

**Oligonukleotide (dNTP):** fertiger Mix aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP (Invitrogen)

**Reverse Transkriptase:** Super Script III 200 U/µl (Invitrogen)

**Master Mix:** RT-Puffer, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, DTT 0,1 mM, RNase Out 40 U/µl

**RNA-Verdau:** RNase H 2 U/µl

Für die Reverse Transkription wurde das „Super Script III First-Strand Synthesis System for reverse Transcription“ (Invitrogen) mit Random Primern (Invitrogen) verwendet. Das Protokoll der Reversen Transkription wird im Folgenden aufgeführt:

#### Komponenten der Primer:

Komponente	1x [µl]
RNA (100ng/µl)	10
Random Hexamers	2
dNTP Mix (10mM)	2
Wasser	6
	20

Denaturierung: 5 min 65°C  
2 min 0°C

**Komponenten des Master Mixes:**

Komponente	1x [ $\mu$ l]
10x RT Puffer	4
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	8
DTT (0,1mM)	4
RNAse Out (40U/ $\mu$ l)	2
SuperScript III (200U/ $\mu$ l)	2
	20

Reverse Transkription:	10 min	25°C
	50 min	50°C
	5 min	85°C
	1 min	0°C

Zu jeder Probe wurden anschließend noch 2  $\mu$ l RNAse H (2U/ $\mu$ l) gegeben.

RNA Verdau:	20min	37°C
-------------	-------	------

**5.17.6 Real Time PCR**

**Primer:** nach Herstellerangaben verdünnt

**Sonden:** Universal Probe Library Probes (Roche)

**Oligonukleotide (dNTP):** fertiger Mix aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP (Invitrogen)

**Taq-Polymerase:** Hot-Start Platinum Taq (Invitrogen)

Die mittels Reverser Transkription gewonnene cDNA wurde in einer Real Time PCR verwendet, um die Menge an mRNA zu messen. 18S rRNA wurde als interne Kontrolle verwendet. Die folgenden Sonden (Universal ProbeLibrary probes, Roche) wurden für die Real Time Amplifikation verwendet:

- S1P1: 5'-ctacacaacgggagcaacag (for), 5'-ccccaggatgaggagat (rev), probe#3
- S1P2: 5'-caggatctactccttggtcagg (for), 5'-gagatgttcttgcggaaggt (rev), probe#78
- S1P3: 5'-cccaactccgggacataga (for, 5'-acagccagtgggtggtttg (rev), probe#17
- S1P4: 5'-ttccatatgatggactcc (for, 5'-tggacaaatgaacgcaggt (rev), probe#3
- S1P5: 5'-gctttctgtgtacagttgacaaatact (for, 5'-ccaactgtccaactgtatgct (rev), probe#33.

Die Reaktionen der Real Time PCR waren wie folgt:

Hot Start:	10 min	95°C
Denaturieren:	10 sec	95°C
Annealing:	30 sec	60°C
Extension:	1 sec	72°C

Die Auswertung erfolgte über das Programm der LightCycler Software und MS Excel.

## 5.18 Bestimmung der Proteinexpression

### 5.18.1 Proteinextraktion

**RIPA-Puffer:** Lysispuffer von NEB, 1 Tablette Complete Mini EDTA free Protease Inhibitor auf 10 ml, PMSF 1 mM

**PBS:** KCl 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 mM

Die Zellen wurden im Medium geerntet, um auch die apoptotischen Zellen zu erhalten und anschließend für 10 min mit 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 500 µl kaltem PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen und wieder für 10 min mit 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Den Zellpellets wurde 100 - 250 µl kalter Lysispuffer (Cell Signaling / NEB, Frankfurt a. M.) zugegeben und 10 min auf Eis lysiert. Danach wurden die Zellpellets für 4 mal 5 sec mit 60-80 Watt Ultraschall behandelt und bei 18000 xg für 3 min bei 4°C zentrifugiert, damit sich unlösliche Zellbestandteile absetzen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### 5.18.2 Proteinbestimmung nach Bradford

**BSA-Lösung:** 0,25 mg / ml

**Coomassie-Lösung:** Coomassie-blue R260 0,05%, Ethanol 25%

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford reagiert das Coomassie-Blue mit den Seitenketten von kationischen, nichtpolaren und hydrophoben Aminosäuren, was eine Verschiebung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm zur Folge hat (Bradford, 1976).

Die Proteinbestimmung erfolgte in einer Mikrotiterplatte, in die zuerst eine BSA-Eichreihe (mit 0,25 mg BSA pro ml) pipettiert wurde. Anschließend wurden 2 µl Proteinprobe zu 18 µl Millipore H<sub>2</sub>O in die Wells der Platte gegeben. Für die Farbreaktion wurde die Coomassie Stammlösung 1:5 verdünnt, filtriert, um kolloidales Coomassie zu entfernen und 200 µl der verdünnten Coomassielösung zu den Proben und der Eichreihe gegeben. Nach einer 10minütigen Inkubation der Platte im Dunklen erfolgte die Proteinbestimmung bei 595 nm im ELISA mit Hilfe der zum Multiscan Ascent-Reader gehörenden Software.

### 5.18.3 Aufkonzentrierung der Proteine

Falls notwendig wurden die Proteinproben mit Hilfe von Vivaspin 500 Röhrchen (Vivascience, Sartorius) aufkonzentriert. Um eine Auftragung von 10 – 50 µg Protein bei der SDS PAGE zu erreichen wurde, wenn nötig mehrmals, 10 min bei 4°C und 2500 xg zentrifugiert. Das Volumen der Probenlösung wurde durch aufeinander folgende Zentrifugationsschritte reduziert, bis die gewünschte Konzentration an Protein erreicht war.

### 5.18.4 SDS PAGE (Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelectrophoresis)

**APS:** Ammoniumperoxodisulfat 10%

**SDS:** Sodiumdodecylsulfat 10%

**TEMED:** N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (Roth)

**Ladepuffer:** RotiLoad (Roth) 5fach

**Laemmli:**       **Gelpuffer:** Tris/HCl pH 8,8 1 M

**Elektrodenpuffer:** Glycin 200 mM, Tris 25 mM, SDS 0,1%

**Schägger:**     **Gelpuffer:** Tris/HCl pH 8,45 3 M

**Anodenpuffer:** Tris/HCl pH 8,9 0,2 M

**Kathodenpuffer:** Tris 100 mM, Tricin 100 mM, SDS 0,1%

Bei der SDS-PAGE erhält man eine nahezu lineare Beziehung zwischen dem Molekulargewicht der Proteine und deren Wanderungstrecke im Gel (Laemmli, 1970).

Das Gießen der Polyacrylamidgele erfolgte mit dem MultiGel-System von Biometra.

Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurde die Methode nach Laemmli oder Schägger verwendet.

Optimaler Bereich kDa	Geltyp	Trennsystem
50 – 100	8 %	Laemmli
20 – 60	13 %	Laemmli
5 – 50	10 %	Schägger
2 – 30	16,5 %	Schägger
1 – 20	16,5 %	Schägger

### Laemmli

	TG 10%	SG 5%
	µl	µl
Wasser	5343	3670
Acrylamid 40%	3750	625
TrisHCl 1M	5625	625
SDS 10%	150	50
APS 10%	120	25
TEMED	12	5
Gesamtvolumen	15 ml	5 ml

### Schägger (Tris-Tricin Puffersystem)

	TG 10%	SG 4%
	µl	µl
Wasser	4485	4010
Acrylamid 40%	3750	625
TrisHCl 3M	5000	1550
SDS 10%	150	50
Glycerin	1585	-
APS 10%	25	12,5
TEMED	5	2,5
Gesamtvolumen	15 ml	6,25 ml

Die für 10 - 50 µg Protein ausreichende Menge Probe wurde mit dem reduzierenden Auftragspuffer RotiLoad so versetzt, so dass dieser 1:5 verdünnt wird und anschließend für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Gele wurden in die Apparatur eingesetzt (MultiGel-System von Biometra) und beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 V für das Sammelgel und 120 V für das Trenngel durchgeführt.

### 5.18.5 Western Blotting

**TBST:** NaCl 150 mM, Tris/HCl pH 7,5 10 mM, Tween-20 0,05 – 0,1%

**Antikörperlösung:** TBST-Milch oder RotiBlock, siehe Tabelle

**Stripping-Lösung:** NaOH 0,2 M, 5 – 7 min

**Blockierlösungen:** **TBST-Milch:** Milchpulver 5%, TBST

**TBST-BSA:** BSA 5%, TBST

**RotiBlock:** RotiBlock 1:10, ddH<sub>2</sub>O

Beim Western Blotting werden die zuvor mittels SDS PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dabei erfolgt der Transfer wegen der negativen Ladung des SDS in Richtung Anode (+). Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte hier mittels des iBlot (SemiDryBlot) von Invitrogen in 6 min. Nach dem Blotten wurden die Markerbanden auf der Nitrocellulosemembran mit einem Kugelschreiber markiert und die Membran für 1 h in RotiBlock (5 ml RotiBlock + 45 ml ddWasser, 1:10) oder TBST Milch (5 % Milchpulver in TBST) oder TBST mit 5% BSA inkubiert, damit freie Bindungsstellen abgedeckt werden. Danach wurde der Antikörper zugegeben und der in Folie eingeschweißte Blot inkubiert über Nacht bei 4°C oder 1 – 2 h bei Raumtemperatur. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3x 10 min mit TBST gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen und anschließend mit dem Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte wieder dreimaliges Waschen mit TBST. Für die Entwicklung wurde der Blot für 90 s mit HRP-Substratlösung bedeckt und anschließend in der Dunkelkammer entwickelt. Um die gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde der Blot folgendermaßen gestrippt: 5 min in TBST, 5 min mit Bidest waschen und abspülen, 7 min in 0,2 M NaOH inkubieren, erneut abspülen und 5 min mit Bidest waschen, zuletzt 10 min in TBST. Für die Auftragskontrolle wurden die oben genannten Schritte mit einem Kontrollantikörper wiederholt.

Folgende **Primärantikörper** wurden verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Blockreagenz</b>
12E8 (Phospho-tau)	1:5000	TBST Milch
$\alpha$ -Tubulin	1:500	TBST Milch
Calpain 1	1:1000	TBST Milch
Calpain 2	1:1000	TBST Milch
Caspase 12	1:200	RotiBlock
CDK 5	1:1000	TBST Milch
Cyclin D1	1:200	TBST Milch
Cyclin E	1:200	TBST Milch
Cytochrom c	1:1000	TBST Milch
K9JA (pan tau)	1:10.000	TBST Milch
p35/p25	1:200	TBST Milch
PHF-1 (Phospho-tau)	1:1000	TBST Milch
Phospho Rb	1:1000	TBST 5% BSA
Rb	1:1000	TBST 5% BSA

**Sekundärantikörper** (HRP konjugiert):

Anti-Rabbit 1:10.000 – 1:40.000 in TBST

Anti-Maus 1:10.000 – 1:40.000 in TBST

Anti-Ziege 1:10.000 in TBST

## 5.19 Lipide

### 5.19.1 Extraktion der Lipide

**ExMi:** Chloroform / Methanol / H<sub>2</sub>O (2 : 1 : 0,2)

Die Zellpellets wurden in 400  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und resuspendiert. Nachdem für die Proteinbestimmung 10  $\mu$ l abgenommen wurden, erfolgte die Zugabe von 5,85 ml Chloroform/Methanol 2:1 zu den verbliebenen 390  $\mu$ l. Die Proben extrahierten anschließend für 24 h bei 48°C im Wasserbad. Am nächsten Tag wurden die abgekühlten Proben mittels

einer Pasteurpipette, die mit etwas Watte gefüllt war, gefiltert. Das Probenglas wurde nach dem Filtern mit insgesamt 1,5 ml ExMi (Chloroform, Methanol, Wasser (10:2:1)) gespült, welches ebenfalls filtriert wurde. Das Filtrat wurde in frischen Schraubkappengläsern gesammelt und anschließend unter N<sub>2</sub> eingedampft. Nach dem Eindampfen erfolgte die Alkalische Hydrolyse, bei der das Pellet in 2,5 ml Methanol aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad behandelt wurde. Danach wurden 62,5 µl 4 M NaOH zugegeben und die Proben für 24 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Neutralisation erfolgte mit 10 µl Eisessig. Nach dem Eindampfen fand die Entsalzung der Proben mittels RP 18 statt. Als Vorbereitung wurden lange Pasteurpipetten mit etwas Glaswolle und 2x 1 ml RP 18- Lösung gefüllt. Danach wurden die Säulchen 2x mit je 1ml theoretischer Oberphase Chloroform, Methanol, 0,1 M KCl (6:96:94) gespült. Die Proben wurden in 1 ml Methanol aufgenommen und ultraschallt. Nach der Zugabe von 1 ml NH<sub>4</sub>Ac 300 mM in H<sub>2</sub>O wurden die Proben auf die Säulen aufgetragen und 2x mit je 0,5 ml NH<sub>4</sub>Ac 200 mM (in Methanol/H<sub>2</sub>O) nach gewaschen. Dann wurde 6x mit 1ml Bidest nachgespült. Die Probe wurde mit 1 ml Methanol und 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 (8x) eluiert. Anschließend dampften die Proben unter N<sub>2</sub> ein und wurden in 400 µl Methanol gelöst, wovon 20 µl im Szintillationszähler gezählt wurden.

### 5.19.2 Dünnschichtchromatographie

Die Proben wurden in Eppendorf Caps überführt und eindampft. Das Pellet wurde in 25 µl ExMi gelöst und auf eine Kieselgelplatte auftragen, die über Nacht trocknete. Nachdem die Platte getrocknet war, wurde sie mittels eines Imagers visualisiert und mit dem Programm TINA ausgewertet.

**Laufmittel:** 190:9:1 Chloroform / Methanol / Eisessig (Ceramid, Cholesterol)  
60:35:8 Chloroform / Methanol / 0,22%CaCl<sub>2</sub> (Sphingolipide)  
80:20:10:20 1-Butanol, Methanol, Eisessig, H<sub>2</sub>O (S1P)

### 5.19.3 Radioaktive Markierung mittels [<sup>14</sup>C]-Serin und D[1-<sup>14</sup>C]-Galaktose

Die Schalen mit den Neuronen wurden wie in Kapitel 5.13.3 beschrieben vorbereitet und mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Nach 4 h wurden die Schalen mit MEM (+1% Pen/Strep + 0,3% PS + 1% AraC) gewaschen und 1 ml neues Inkubationsmedium zugegeben. In dieses erfolgte die Zugabe von 20 µl radioaktivem Serin (<sup>14</sup>C) pro ml Medium (2 µCi Serin

/ 1ml Medium) oder von 10µl radioaktiver D[1-<sup>14</sup>C] Galaktose (2 µCi Galaktose / 1ml Medium) direkt in das Inkubationsmedium der Schalen. Da die Synthese der Sphingolipide mit der Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA beginnt, werden durch das radiaktive Serin alle neu synthetisierten Sphingolipide markiert. Die Markierung mit Galaktose ermöglicht einen Hinweis auf den Recyclingweg der Sphingolipide, ausgehend von der Glucosylierung des Ceramids.

#### 5.19.4 Nachweis von S1P mittels [<sup>32</sup>P] Markierung

**Extraktionspuffer nach Yatomi et al:** HEPES 20 mM, NaCl 138 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,3 mM, KCl 2,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Glucose 1 mg/ml

**Phosphatfreies MEM:** mit Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 mg/l, 10% Pferdeserum

Die Extraktion von S1P erfolgte nach der Methode von Yatomi et. al. (Yatomi et al., 1995). Die Zellschalen wurden zuerst mit phosphatfreiem Medium (MEM) gewaschen, um alle Phosphate zu entfernen. Anschließend wurde das zelluläre ATP mit anorganischem Phosphat, NaH<sub>2</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub>, radioaktiv markiert. Hierfür wurden die Schalen für 2 h mit 900 µl phosphatfreiem Medium + 0,3 % PS oder FKS + 40 µCi/ml NaH<sub>2</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> inkubiert. Die Sphingolipide wurden den Zellen als BSA-Komplex zugegeben und für die entsprechenden Zeiten inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch deren Abschaben nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS. Die Proben wurden für 10 min mit 2000 xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in 500 µl Extraktionspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol (1:2) für 30 min in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden 2 ml Chloroform, 2 ml 1N KCl und 100 µl 7N NH<sub>4</sub>OH zugegeben. Das alkalische Milieu deprotoniert das S1P, welches eine negative Ladung erhält und in die wässrige Phase übergeht. Eine bessere Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurde durch eine kurze Zentrifugation (5 min bei 2000 xg) erreicht. Die wässrige Phase wurde dann in ein neues SKG überführt und mit 3 ml Chloroform und 200 µl konzentrierter HCl angesäuert. S1P wird durch die von der Salzsäure abgegebenen Protonen protoniert, verliert seine Ladung und löst sich nun in der organischen Phase. Durch vortexen und Zentrifugieren wurde eine bessere Trennung erreicht. Direkt aus der unteren, organischen Phase wurden 500 µl entnommen. Nach dem Eindampfen unter N<sub>2</sub> wurde das Pellet in 30 µl Chloroform/Methanol (2:1) resuspendiert und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Als Laufmittel diente 1-Butanol, Methanol, Eisessig, H<sub>2</sub>O (80:20:10:20).

Die Auswertung erfolgte mittels eines Imagers und dem Programm TINA.

## **5.20 Statistische Auswertung der Versuche**

Falls nicht anders angegeben sind die Quantifizierungen von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung gezeigt. Standardabweichung und Mittelwert wurden berechnet und die Signifikanz mittels *Student's t-test* bestimmt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ackermann H (2008) Cerebellar contributions to speech production and speech perception: psycholinguistic and neurobiological perspectives. *Trends Neurosci* 31:265-272.
- Albers DS, Beal MF (2000) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J Neural Transm Suppl* 59:133-154.
- Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, Hajdu R, Rosenbach M, Keohane CA, Mandala S, Spiegel S, Proia RL (2004) Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 279:52487-52492.
- Alvira D, Ferrer I, Gutierrez-Cuesta J, Garcia-Castro B, Pallas M, Camins A (2008) Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the gyrus cinguli in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14:309-313.
- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 128:126-128.
- Anelli V, Bassi R, Tettamanti G, Viani P, Riboni L (2005) Extracellular release of newly synthesized sphingosine-1-phosphate by cerebellar granule cells and astrocytes. *J Neurochem* 92:1204-1215.
- Aoki K, Imajoh S, Ohno S, Emori Y, Koike M, Kosaki G, Suzuki K (1986) Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca<sup>2+</sup>-requiring form of human Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett* 205:313-317.
- Arendt T (2000) Alzheimer's disease as a loss of differentiation control in a subset of neurons that retain immature features in the adult brain. *Neurobiol Aging* 21:783-796.
- Armstrong RA (2006) Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 44:1-11.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 7:812-821.
- Bandhuvula P, Saba JD (2007) Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* 13:210-217.
- Bär T, Kratzer B, Wild R, Sandhoff K, Schmidt RR (1993) Synthesis of methyl-branched sphingosines. In: *Liebigs Ann. Chem*, pp 419-426.
- Baumann O, Walz B (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205:149-214.
- Bektas M, Allende ML, Lee BG, Chen W, Amar MJ, Remaley AT, Saba JD, Proia RL (2010) S1P lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. *J Biol Chem*.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T (2003) Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem* 278:47408-47415.
- Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW (2005) Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739:216-223.
- Bojarski L, Herms J, Kuznicki J (2008) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 52:621-633.

- Brachtendorf S (2005) Untersuchung zum Knock-down des Sphingosine-1-phosphat Lyase Transkripts. In: University, Bonn.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22:8608-8618.
- Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR (2002) The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277:21453-21457.
- Buccoliero R, Futerman AH (2003) The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacol Res* 47:409-419.
- Busser J, Geldmacher DS, Herrup K (1998) Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 18:2801-2807.
- Camins A, Verdaguer E, Folch J, Pallas M (2006) Involvement of calpain activation in neurodegenerative processes. *CNS Drug Rev* 12:135-148.
- Chau BN, Wang JY (2003) Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* 3:130-138.
- Chen MJ, Yap YW, Choy MS, Koh CH, Seet SJ, Duan W, Whiteman M, Cheung NS (2006) Early induction of calpains in rotenone-mediated neuronal apoptosis. *Neurosci Lett* 397:69-73.
- Cho SG, Choi EJ (2002) Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol* 35:24-27.
- Comi G, O'Connor P, Montalban X, Antel J, Radue EW, Karlsson G, Pohlmann H, Aradhye S, Kappos L (2010) Phase II study of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: 3-year results. *Mult Scler* 16:197-207.
- Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-483.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381:800-803.
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
- Deveraux QL, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19:388-398.
- Dhavan R, Tsai LH (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:749-759.
- Dickson DW (2009) Neuropathology of non-Alzheimer degenerative disorders. *Int J Clin Exp Pathol* 3:1-23.
- Dieter P, Fitzke E, Duyster J (1993) BAPTA induces a decrease of intracellular free calcium and a translocation and inactivation of protein kinase C in macrophages. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374:171-174.
- Don AS, Martinez-Lamenca C, Webb WR, Proia RL, Roberts E, Rosen H (2007) Essential requirement for sphingosine kinase 2 in a sphingolipid apoptosis pathway activated by FTY720 analogues. *J Biol Chem* 282:15833-15842.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.

- Eckermann K, Mocanu MM, Khlistunova I, Biernat J, Nissen A, Hofmann A, Schonig K, Bujard H, Haemisch A, Mandelkow E, Zhou L, Rune G, Mandelkow EM (2007) The beta-propensity of Tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J Biol Chem* 282:31755-31765.
- Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-1672.
- Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7:663-698.
- Fields TA, Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321 ( Pt 3):561-571.
- Freeman RS, Estus S, Johnson EM, Jr. (1994) Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 12:343-355.
- Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T (1994) Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* 47:208-215.
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:507-534.
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML (2003) Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 278:34268-34276.
- Ghosh TK, Bian J, Gill DL (1994) Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J Biol Chem* 269:22628-22635.
- Gillard BK, Clement RG, Marcus DM (1998) Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* 8:885-890.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Graler MH, Goetzl EJ (2002) Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* 1582:168-174.
- Greis C, Rosner H (1990) c-pathway polysialogangliosides in the nervous tissue of vertebrates, reacting with the monoclonal antibody Q211. *Brain Res* 517:105-110.
- Haass C, Selkoe DJ (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75:1039-1042.
- Hagen N, Van Veldhoven PP, Proia RL, Park H, Merrill AH, Jr., van Echten-Deckert G (2009) Subcellular Origin of Sphingosine 1-Phosphate Is Essential for Its Toxic Effect in Lyase-deficient Neurons. *J Biol Chem* 284:11346-11353.
- Hamdane M, Delobel P, Sambo AV, Smet C, Begard S, Violleau A, Landrieu I, Delacourte A, Lippens G, Flament S, Buee L (2003) Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochem Pharmacol* 66:1619-1625.
- Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* 11:227-238.
- Han X (2005) Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2:65-77.
- Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10:73-80.
- Hannun YA, Obeid LM (2002) The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277:25847-25850.

- Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150.
- Hannun YA, Luberto C, Argraves KM (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* 40:4893-4903.
- Harada J, Foley M, Moskowitz MA, Waeber C (2004) Sphingosine-1-phosphate induces proliferation and morphological changes of neural progenitor cells. *J Neurochem* 88:1026-1039.
- Hardy J (2003) The relationship between amyloid and tau. *J Mol Neurosci* 20:203-206.
- Hassler DF, Bell RM (1993) Ceramidases: enzymology and metabolic roles. *Adv Lipid Res* 26:49-57.
- Heintz N (1993) Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 18:157-159.
- Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF (1992) Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10867-10871.
- Herget T, Esdar C, Oehrlein SA, Heinrich M, Schutze S, Maelicke A, van Echten-Deckert G (2000) Production of ceramides causes apoptosis during early neural differentiation in vitro. *J Biol Chem* 275:30344-30354.
- Hernandez-Ortega K, Ferrera P, Arias C (2007) Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *J Neurosci Res* 85:1744-1751.
- Hinkovska-Galcheva VT, Boxer LA, Mansfield PJ, Harsh D, Blackwood A, Shayman JA (1998) The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J Biol Chem* 273:33203-33209.
- Hirschberg K, Zisling R, van Echten-Deckert G, Futerman AH (1996) Ganglioside synthesis during the development of neuronal polarity. Major changes occur during axonogenesis and axon elongation, but not during dendrite growth or synaptogenesis. *J Biol Chem* 271:14876-14882.
- Holtzman DM (2002) Abeta conformational change is central to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23:1085-1088.
- Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, Jahangeer S, Nakamura S (2003) Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *J Biol Chem* 278:46832-46839.
- Im DS, Tomura H, Tobo M, Sato K, Okajima F (2004) Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced phospholipase C activation during G(0)-G(1) transition in rat hepatocytes. *J Pharmacol Sci* 95:284-290.
- Imajoh S, Aoki K, Ohno S, Emori Y, Kawasaki H, Sugihara H, Suzuki K (1988) Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca<sup>2+</sup>-requiring form of human Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease. *Biochemistry* 27:8122-8128.
- Jeyakumar M, Dwek RA, Butters TD, Platt FM (2005) Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nat Rev Neurosci* 6:713-725.
- Kaufmann SH, Hengartner MO (2001) Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-534.
- Khachaturian ZS (1989) The role of calcium regulation in brain aging: reexamination of a hypothesis. *Aging (Milano)* 1:17-34.
- Kharel Y, Lee S, Snyder AH, Sheasley-O'Neill S L, Morris MA, Setiady Y, Zhu R, Zigler MA, Burcin TL, Ley K, Tung KS, Engelhard VH, Macdonald TL, Pearson-White S, Lynch KR (2005) Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720. *J Biol Chem* 280:36865-36872.
- Kitazawa M, Oddo S, Yamasaki TR, Green KN, LaFerla FM (2005) Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-

- mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:8843-8853.
- Kluk MJ, Hla T (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582:72-80.
- Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem* 273:23722-23728.
- Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Vukelic Z, Cosovic C, Trbojevic-Cepe M, Kubat M (1992) Gangliosides in the human brain development and aging. *Neurochem Int* 20:421-431.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862-872.
- Le Stunff H, Giussani P, Maceyka M, Lepine S, Milstien S, Spiegel S (2007) Recycling of sphingosine is regulated by the concerted actions of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 and sphingosine kinase 2. *J Biol Chem* 282:34372-34380.
- Lee KY, Helbing CC, Choi KS, Johnston RN, Wang JH (1997) Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 272:5622-5626.
- Lee MS, Tsai LH (2003) Cdk5: one of the links between senile plaques and neurofibrillary tangles? *J Alzheimers Dis* 5:127-137.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Leist M, Nicotera P (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239:183-201.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Li PA, Howlett W, He QP, Miyashita H, Siddiqui M, Shuaib A (1998) Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL 28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia. *Neurosci Lett* 247:17-20.
- Lin CF, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Tang MJ, Chang WC, Lin YS (2004) Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:40755-40761.
- Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, Milstien S, Kohama T, Spiegel S (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J Biol Chem* 275:19513-19520.
- Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S (2003) Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem* 278:40330-40336.
- Long JS, Pyne NJ, Pyne S (2008) Lipid phosphate phosphatases form homo- and hetero-oligomers: catalytic competency, subcellular distribution and function. *Biochem J* 411:371-377.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2007) Role of cyclin-dependent kinase 5 in the neurodegenerative process triggered by amyloid-Beta and prion peptides: implications for Alzheimer's disease and prion-related encephalopathies. *Cell Mol Neurobiol* 27:943-957.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2009a) Cdk5 acts as a mediator of neuronal cell cycle re-entry triggered by amyloid-beta and prion peptides. *Cell Cycle* 8:97-104.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2009b) Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? *Curr Alzheimer Res* 6:205-212.

- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2010) Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell* 9:64-77.
- Luberto C, Kravetska JM, Hannun YA (2002) Ceramide regulation of apoptosis versus differentiation: a walk on a fine line. Lessons from neurobiology. *Neurochem Res* 27:609-617.
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Jr., Milstien S, Spiegel S (2005) SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J Biol Chem* 280:37118-37129.
- MacLennan AJ, Marks L, Gaskin AA, Lee N (1997) Embryonic expression pattern of H218, a G-protein coupled receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervous system development. *Neuroscience* 79:217-224.
- Majd S, Zarifkar A, Rastegar K, Takhshid MA (2008) Different fibrillar Abeta 1-42 concentrations induce adult hippocampal neurons to reenter various phases of the cell cycle. *Brain Res* 1218:224-229.
- Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1:222-231.
- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H (2002) Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296:346-349.
- Mandala SM (2001) Sphingosine-1-phosphate phosphatases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64:143-156.
- Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM (2007) Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 17:83-90.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:425-427.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol Aging* 16:355-362; discussion 362-353.
- Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K (1992) Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* 267:11144-11148.
- Marconi S, De Toni L, Lovato L, Tedeschi E, Gaetti L, Acler M, Bonetti B (2005) Expression of gangliosides on glial and neuronal cells in normal and pathological adult human brain. *J Neuroimmunol* 170:115-121.
- Mattson MP, Chan SL (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:1041-1043.
- Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD (2000) Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 23:222-229.
- McGeer EG, McGeer PL (2003) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:741-749.
- Mechtcheriakova D, Wlachos A, Sobanov J, Kopp T, Reuschel R, Bornancin F, Cai R, Zemann B, Urtz N, Stingl G, Zlabinger G, Woisetschlager M, Baumruker T, Billich A (2007) Sphingosine 1-phosphate phosphatase 2 is induced during inflammatory responses. *Cell Signal* 19:748-760.
- Mehdi S, Angelastro MR, Wiseman JS, Bey P (1988) Inhibition of the proteolysis of rat erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1117-1123.
- Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, Mena-Lopez R (2009) Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*.

- Merrill AH, Jr. and Sweeley, CC (1996) Sphingolipids: metabolism and cell signalling. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* J.E. VDEaV::303-339.
- Meyer Zu Heringdorf D (2004) Lysophospholipid receptor-dependent and -independent calcium signaling. *J Cell Biochem* 92:937-948.
- Meyer zu Heringdorf D, Liliom K, Schaefer M, Danneberg K, Jaggar JH, Tigyi G, Jakobs KH (2003) Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca<sup>2+</sup> mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 554:443-449.
- Michel C, van Echten-Deckert G, Rother J, Sandhoff K, Wang E, Merrill AH, 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* 272:22432-22437.
- Milstien S, Gude D, Spiegel S (2007) Sphingosine 1-phosphate in neural signalling and function. *Acta Paediatr Suppl* 96:40-43.
- Mitsutake S, Kim TJ, Inagaki Y, Kato M, Yamashita T, Igarashi Y (2004) Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *J Biol Chem* 279:17570-17577.
- Moore AN, Kampfl AW, Zhao X, Hayes RL, Dash PK (1999) Sphingosine-1-phosphate induces apoptosis of cultured hippocampal neurons that requires protein phosphatases and activator protein-1 complexes. *Neuroscience* 94:405-415.
- Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-291.
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-34294.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70:392-401.
- Naetzker S, Hagen N, Echten-Deckert G (2006) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and partial reactivation of the cell cycle by cis-4-methylsphingosine direct postmitotic neurons towards apoptosis. *Genes Cells* 11:269-279.
- Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103.
- Natzker S, Heinemann T, Figueroa-Perez S, Schnieders B, Schmidt RR, Sandhoff K, van Echten-Deckert G (2002) Cis-4-methylsphingosine phosphate induces apoptosis in neuroblastoma cells by opposite effects on p38 and ERK mitogen-activated protein kinases. *Biol Chem* 383:1885-1894.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861-872.
- Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttmann RP, Siman R (2003) Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 278:14162-14167.
- Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407:810-816.
- Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, Swisher SG (2002) Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol Chem* 277:9219-9225.
- Ogretmen B, Hannun YA (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 4:604-616.

- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S (1999) Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 147:545-558.
- Park SY, Ferreira A (2005) The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 25:5365-5375.
- Parrill AL, Sardar VM, Yuan H (2004) Sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors: agonist and antagonist binding and progress toward development of receptor-specific ligands. *Semin Cell Dev Biol* 15:467-476.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH (1999) Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402:615-622.
- Peest U, Sensken SC, Andreani P, Hanel P, Van Veldhoven PP, Graler MH (2008) S1P-lyase independent clearance of extracellular sphingosine 1-phosphate after dephosphorylation and cellular uptake. *J Cell Biochem*.
- Pettus BJ, Bielawski J, Porcelli AM, Reames DL, Johnson KR, Morrow J, Chalfant CE, Obeid LM, Hannun YA (2003) The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha. *Faseb J* 17:1411-1421.
- Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM (2000) FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J Immunol* 164:5761-5770.
- Pyne S, Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J* 349:385-402.
- Rammohan KW, Shoemaker J (2010) Emerging multiple sclerosis oral therapies. *Neurology* 74 Suppl 1:S47-53.
- Ramstedt B, Slotte JP (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* 531:33-37.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372-380.
- Raynaud F, Marcilhac A (2006) Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *Febs J* 273:3437-3443.
- Riboni L, Bassi R, Prinetti A, Viani P, Tettamanti G (1999) Predominance of the acylation route in the metabolic processing of exogenous sphingosine in neural and extraneural cells in culture. *Biochem J* 338 ( Pt 1):147-151.
- 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.
- Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47:383-392.
- Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *Faseb J* 8:814-822.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2628-2632.
- Sakai K, Suzuki K, Tanaka S, Koike T (1999) Up-regulation of cyclin D1 occurs in apoptosis of immature but not mature cerebellar granule neurons in culture. *J Neurosci Res* 58:396-406.
- Salvesen GS (2002) Caspases and apoptosis. *Essays Biochem* 38:9-19.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.

- Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45:528-537.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 24:167-176.
- Schmahl J, Raymond CS, Soriano P (2007) PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. *Nat Genet* 39:52-60.
- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989) The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3:689-694.
- Selkoe DJ (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275:630-631.
- Sherr CJ (2000) The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60:3689-3695.
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- Shields DC, Tyor WR, Deibler GE, Hogan EL, Banik NL (1998) Increased calpain expression in activated glial and inflammatory cells in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5768-5772.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Sjogren M, Davidsson P, Tullberg M, Minthon L, Wallin A, Wikkelso C, Granerus AK, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K (2001) Both total and phosphorylated tau are increased in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:624-630.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6:1067-1074.
- Spiegel S, Milstien S (2000) Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 476:55-57.
- Spiegel S, Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397-407.
- Svennerholm L (1994) Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. *Prog Brain Res* 101:XI-XIV.
- Taha TA, Mullen TD, Obeid LM (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1758:2027-2036.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S (2008) "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60:181-195.
- Tannoch VJ, Hinds PW, Tsai LH (2000) Cell cycle control. *Adv Exp Med Biol* 465:127-140.
- Terai K, Soga T, Takahashi M, Kamohara M, Ohno K, Yatsugi S, Okada M, Yamaguchi T (2003) Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience* 116:1053-1062.
- Tessema M, Lehmann U, Kreipe H (2004) Cell cycle and no end. *Virchows Arch* 444:313-323.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Trojanowski JQ, Lee VM (1995) Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *Faseb J* 9:1570-1576.
- Tsai LH, Lee MS, Cruz J (2004) Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta* 1697:137-142.
- Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Jr., Chae T, Harlow E (1994) p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371:419-423.

- van den Heuvel S, Harlow E (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262:2050-2054.
- van Echten G, Birk R, Brenner-Weiss G, Schmidt RR, Sandhoff K (1990) Modulation of sphingolipid biosynthesis in primary cultured neurons by long chain bases. *J Biol Chem* 265:9333-9339.
- van Echten-Deckert G, Herget T (2006) Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta*.
- van Echten-Deckert G, Schick A, Heinemann T, Schnieders B (1998) Phosphorylated cis-4-methylsphingosine mimics the mitogenic effect of sphingosine-1-phosphate in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 273:23585-23589.
- van Echten-Deckert G, Zschoche A, Bar T, Schmidt RR, Raths A, Heinemann T, Sandhoff K (1997) cis-4-Methylsphingosine decreases sphingolipid biosynthesis by specifically interfering with serine palmitoyltransferase activity in primary cultured neurons. *J Biol Chem* 272:15825-15833.
- Van Veldhoven PP (2000) Sphingosine-1-phosphate lyase. *Methods Enzymol* 311:244-254.
- Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, Brys V (2000) Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). *Biochim Biophys Acta* 1487:128-134.
- VanVeldhoven PP (2005) Sphingosine 1-phosphate lyase deficient mice. *Chem Phys Lipids* 136:164-165.
- Varvel NH, Bhaskar K, Patil AR, Pimplikar SW, Herrup K, Lamb BT (2008) Abeta oligomers induce neuronal cell cycle events in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:10786-10793.
- Verkhatsky A, Anderova M, Chvatal A (2009) Differential calcium signalling in neuronal-glial networks. *Front Biosci* 14:2004-2016.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36:131-149.
- Vogel P, Donoviel MS, Read R, Hansen GM, Hazlewood J, Anderson SJ, Sun W, Swaffield J, Oravec T (2009) Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS One* 4:e4112.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57:115-126.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- Weiner HL, Frenkel D (2006) Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol* 6:404-416.
- Wen Y, Yang SH, Liu R, Perez EJ, Brun-Zinkernagel AM, Koulen P, Simpkins JW (2007) Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochim Biophys Acta* 1772:473-483.
- Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, D'Andrea RJ, Vadas MA (2000) An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 10:1527-1530.
- Xia P, Wang L, Moretti PA, Albanese N, Chai F, Pitson SM, D'Andrea RJ, Gamble JR, Vadas MA (2002) Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J Biol Chem* 277:7996-8003.
- Yang Y, Herrup K (2007) Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta* 1772:457-466.
- Yang Y, Varvel NH, Lamb BT, Herrup K (2006) Ectopic cell cycle events link human Alzheimer's disease and amyloid precursor protein transgenic mouse models. *J Neurosci* 26:775-784.

- Yatomi Y, Ruan F, Ohta J, Welch RJ, Hakomori S, Igarashi Y (1995) Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride. *Anal Biochem* 230:315-320.
- Yu N, Lariosa-Willingham KD, Lin FF, Webb M, Rao TS (2004) Characterization of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate-mediated signal transduction in rat cortical oligodendrocytes. *Glia* 45:17-27.
- Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S (1991) Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* 114:155-167.
- Zhang X, Skrzypek MS, Lester RL, Dickson RC (2001) Elevation of endogenous sphingolipid long-chain base phosphates kills *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Curr Genet* 40:221-233.
- Zheng M, Leung CL, Liem RK (1998) Region-specific expression of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) and its activators, p35 and p39, in the developing and adult rat central nervous system. *J Neurobiol* 35:141-159.
- Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G (2001) Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551:F1-37.