

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

**Darstellung von Ceramid-induzierten Effekten durch reverse
Translokation einer fluoreszierenden Proteinkinase**

vorgelegt von

Apothekerin Annette Wüstholtz

aus Nördlingen

Heidelberg 2004

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apothekerin Annette Wüstholtz
aus Nördlingen
Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2004

Darstellung von Ceramid-induzierten Effekten durch reverse Translokation einer
fluoreszierenden Proteinkinase

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Wießler
Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2000 bis Januar 2004 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt. Die praktischen Arbeiten wurden von Oktober 2000 bis Oktober 2001 am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Chemie begonnen und anschließend bis Januar 2004 am Institut für Anatomie und Zellbiologie III fortgeführt.

Meinem Doktorvater,

Herrn Prof. Dr. Manfred Wießler,

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, danke ich sehr herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit und die entgegengebrachte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken. Insbesondere danke ich für seine Unterstützung, die ich bei der Betreuung und Organisation der Praktika für Studierende der Pharmazie erfahren habe, und für seine jederzeit entgegenkommende Hilfe bei jeglicher Problemstellung.

Für die Übernahme der Nebenfachprüfungen danke ich im Besonderen Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralf Kinscherf und Herrn Prof. Dr. Stefan Wöfl.

Mein erster Dank gilt nochmals Herrn Priv.-Doz. Dr. Ralf Kinscherf, Institut für Anatomie und Zellbiologie III, in dessen Labor ich den überwiegenden Teil meiner praktischen Arbeit durchgeführt habe und der mich nicht nur durch sein überaus kompetentes Fachwissen, sondern auch durch viel praktische Hilfe unterstützt und betreut hat. Herzlichen Dank für die zu jeder Zeit offene Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung und vor allem für die unproblematische zur Verfügungsstellung eines Laborplatzes und die spontane Zustimmung für die Verlegung meiner praktischen Tätigkeit vom Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie in das Institut für Anatomie und Zellbiologie. Als Doktorand, Studierender, Angestellter oder Kollege kann man sich keinen engagierteren Dozenten und Arbeitsgruppenleiter wünschen.

Nicht weniger danken möchte ich Herrn Dr. Ralf Claus, Experimentelle Anästhesie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, für seine thematische Führung und fachliche Betreuung der vorliegenden Dissertation. Im Besonderen möchte ich ihm für die Unterstützung danken, die nach seinem Wechsel von Heidelberg nach Jena vor allem durch die räumliche Trennung erschwert, aber aufgrund der stets entgegenkommenden, freundschaftlichen Kooperation möglich war. Dank auch für die wertvollen Anregungen bei der Anfertigung dieser Dissertationsschrift.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn Dr. Gabriel Bonaterra und Frau Ulrike Traut, Institut für Anatomie und Zellbiologie III, für viele praktische Hinweise und erfahrenen Rat im Labor, sowie für die kollegiale und schöne Zusammenarbeit über mehr als zwei Jahre.

Dank gilt auch Frau Viola Funk und Frau Karin Weiß, Sekretärinnen des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Chemie, für die allzeit hilfsbereite und unbürokratische Zusammenarbeit und für so manches freundlich nette Wort.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Herrn Heiko Rudy und Herrn Peter Weyrich für jede praktische Hilfeleistung und bei Bernhard Schittko für seine vom ersten Tag an angenehme und freundschaftliche Mitarbeit.

Besonders danken möchte ich meinen ehemaligen Mitdoktoranden am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie Diplom-Chemiker Dr. Hendrik Riedel, Apothekerin Dr. Nicola Lysek, Apotheker Markus Bläß und Apotheker Dr. Huu Phuoc Le für die stets gute Arbeitsatmosphäre.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Diplom-Chemikerin Dina Pavlovic Rosman für die perfekte und sehr schöne Teamarbeit als verantwortliche Assistentinnen des 6. Semesters Pharmazie über mehrere Halbjahre und ihre zu jeder Zeit uneingeschränkte Hilfe.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Apothekerin Fozia Noor für ihre bereichernde Freundschaft, besonders aber Dank für die oft gemeinsam bewältigten Problemstellungen und ihre besondere Art zur Hilfe.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Schwester Claudia und Apotheker Tobias Nohe, beide wissen wofür.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für die erfahrene Unterstützung danken, die mir diesen Weg ermöglichte.

Zusammenfassung der Dissertation

Wüstholtz, Annette, Apothekerin

Darstellung von Ceramid-induzierten Effekten durch reverse Translokation einer fluoreszierenden Proteinkinase

Referent: Prof. Dr. Manfred Wießler

Koreferent: Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung und Abschätzung der Signaltransduktionswege des Lipidmediators Ceramid ein *in-vivo* Testsystem etabliert: Unter Anwendung eines EGFP-Fusionsproteins wurde eine stabil transfizierte Leberzelllinie generiert, die eine fluoreszierende Proteinkinase, ein literaturbekanntes Targetprotein des Ceramids, dauerhaft überexprimiert und damit eine Untersuchung und Beobachtung Ceramid-vermittelter Effekte unter Echtzeitbedingungen ermöglicht. Mittels des *in-vivo* Testsystems wurden der Effekt des Ceramids auf die intrazelluläre Translokation der PKC- α , einer Proteinkinase C Isoform, näher charakterisiert und sowohl neuartige, potentielle Ceramid-analoga als auch mögliche Inhibitoren des Ceramidstoffwechsels biologisch evaluiert.

Die Untersuchung der Wirkung des Ceramids auf sein Targetprotein PKC- α ergab folgendes Ergebnis: Ceramid führt zu einer reversen Translokation der durch Phorbolester aktivierten und an die Membran translozierten PKC- α . Es induziert eine Rückkehr der membrangebundenen PKC- α ins Zytosol. Diese Beobachtung war sowohl fluoreszenzmikroskopisch durch die Lokalisationsänderung des PKC- α -EGFP Fusionsproteins als auch mittels Western-Blot-Analyse der in Zytosol- und Membranextrakt fraktionierten Zellysate nachweisbar.

Durch die Bewertung potentieller Ceramidanaloga im entwickelten *in-vivo* Testmodell konnten zwei konformationsdefinierte Verbindungen identifiziert werden, die den Wirkungen des Ceramids hinsichtlich seines Effekts auf die reverse Translokation der PKC- α entsprachen. Dies sind (RS)-(E)-1-(2-Methyl-oxazol-4-yl)-hexadec-2-en-1-ol und (2RS,4S)-4-((E)-(RS)-1-Hydroxy-3-phenyl-allyl)-2-phenyl-thiazolidin-3-carbonsäure-*tert*-butylester. Die Ceramid-analogen Effekte der beiden Substanzen konnten mittels unabhängiger Methodik auch in Bezug auf die Apoptose-induzierende Wirkung in etablierten Zelltod-Modellen an Makrophagen bestätigt werden.

Die biologische Evaluierung eines niedermolekularen potentiellen Inhibitors der intrazellulären Ceramidgenerierung wurde sowohl unter Anwendung des *in-vivo* Zellmodells an transfizierten Leberzellen als auch unter Anwendung von *in-vivo* und *in-vitro* Experimenten an humanen Makrophagen durchgeführt. Es konnte ein Analogon des Scyphostatins, eines aus einem Pilzextrakt isolierten Naturstoffs, als potenter, reversibler Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase beschrieben werden.

Insgesamt wurde anhand der reversen Translokation ein neuer molekularer Mechanismus einer Ceramid-vermittelten Wirkung charakterisiert. Die Untersuchungen zeigen, dass das Testsystem zur Darstellung intrazellulärer Effekte des Lipidmediators Ceramid, ausgewählter Ceramidanaloga oder Enzyminhibitoren geeignet ist und einen neuen Ansatz zur Testung derartiger Verbindungen in lebenden Zellen gewährleistet.

Abstract

Wüstholtz, Annette

Demonstration of ceramide induced effects by reverse translocation of a fluorescent protein kinase

Supervisor: Prof. Dr. Manfred Wießler

Examiner: Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

In this study an *in-vivo* cell model has been established to characterize the signalling pathway of the lipid mediator ceramide. For this purpose, a liver cell line has been transfected using an EGFP fusion protein to generate a fluorescent protein kinase which is stably expressed in this cell line. This fluorescent protein kinase is a well known target of ceramide and gave us the possibility to investigate ceramide mediated effects *in real time*. Using this cell model we characterized the intracellular movement of EGFP-tagged PKC- α after treatment with various stimuli, such as ceramide and IFN- γ (interferon gamma), and evaluated new ceramide analogues and potent inhibitors of endogenous ceramide generation.

The investigation of ceramide effects on its target PKC- α gave us the following result: Ceramide mediates a reverse translocation of phorbol ester activated and membrane bound PKC- α . It induces the return of PKC- α from its activated state at the membrane back into the cytosol. This phenomenon has been observed by fluorescence microscopy and verified by western blot experiments showing cell protein content in the cytosolic and membrane fractions.

By using this established *in-vivo* cell model two conformationally defined compounds could be identified as ceramide analogues: These are (RS)-(E)-1-(2-Methyl-oxazol-4-yl)-hexdeca-2-en-1-ol and (2RS,4S)-4-((E)-(RS)-1-Hydroxy-3-phenyl-allyl)-2-phenyl-thiazolidine-3-*tert*-butyl ester. The ceramide analogous effects could also be confirmed using established programmed cell death models on macrophages to investigate the ability of ceramide and its analogues to induce apoptosis.

The biological evaluation of a novel inhibitor of endogenous ceramide generation showed that a new synthesized Scyphostatin analogue revealed a potent inhibition of neutral membrane bound sphingomyelinase (nSMase). Scyphostatin is an active inhibitor of nSMase and was isolated from a mycelial extract some years ago. The inhibitory effects of the Scyphostatin analogue were obtained using *in-vivo* and *in-vitro* experiments on human macrophages as well as by investigation of the analogue in our newly established *in-vivo* liver cell model.

To summarize, in this study we could set up a new *in-vivo* cell model which enables us to investigate ceramide induced effects by reverse translocation of fluorescent PKC- α and gives us the possibility to test potent ceramide analogues and inhibitors of the ceramide mediated signal pathway in living cells.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ceramide	1
1.1.1	Freisetzung und Wirkung	1
1.1.2	Sphingomyelinasen (SMasen)	3
1.1.2.1	Neutrale Sphingomyelinase (nSMase)	5
1.1.3	Aktivierung des SM-Signalwegs	6
1.1.4	Targetproteine des Ceramids	6
1.1.5	Apoptose als Ceramid-induzierte Zellantwort	7
1.2	Proteinkinase C	9
1.2.1	Proteinkinase C Familie	9
1.2.2	Aktivierung der PKC-Isoformen	10
1.2.3	Grün fluoreszierendes Protein (GFP)	11
2	Zielsetzung	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Generierung einer stabilen Zelllinie mit PKC-α-EGFP Fusionsprotein	16
3.2	Optimierung der Testbedingungen zur Darstellung der Translokation des Targetproteins (PKC-α) an die Zellmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot	18
3.2.1	Welche Wirkung hat Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) auf das PKC- α -EGFP Fusionsprotein in HepG22aI Zellen?	18
3.2.2	Welche Wirkung hat C ₆ -Ceramid bzw. C ₁₆ -Ceramid auf das PKC- α -EGFP Fusionsprotein in HepG22aI Zellen?	22
3.3	Ausarbeitung eines Assaysystems zur Charakterisierung von Ceramid-effekten auf die PKC-α Translokation	25
3.4	Charakterisierung von potentiellen Ceramidanaloga	30
3.4.1	Untersuchung potentieller Ceramidanaloga im <i>in-vivo</i> Testsystem sowie mittels Western Blots	31
3.4.2	Untersuchung potentieller Ceramidanaloga auf Apoptoseinduktion	34
3.5	Charakterisierung von Inhibitoren der intrazellulären Ceramidgenerierung	36

3.5.1	Wirkt das Scyphostatin-Analogon zytotoxisch auf humane Zellen?	37
3.5.2	Welchen Einfluss hat das Scyphostatin-Analogon auf den intrazellulären Sphingomyelin-Metabolismus und damit auf die endogene Ceramidgenerierung?	38
3.5.3	Wirkt das Scyphostatin-Analogon durch Erniedrigung des Ceramidlevels antiapoptotisch?	39
3.5.4	Lässt sich für das Analogon eine inhibitorische Wirkung auf die nSMase <i>in-vivo</i> nachweisen?	41
3.5.5	Ist die inhibitorische Wirkung spezifisch für die eukaryontische nSMase?	43
3.5.6	Über welchen Hemmmechanismus wirkt das Scyphostatin-Analogon auf die nSMase?	44
3.5.7	Ist der <i>in-vivo</i> Effekt des Scyphostatin-Analogons auf die nSMase in dem in dieser Arbeit entwickelten Testmodell durch das PKC- α -EGFP Fusionsprotein sichtbar und kann dies mittels Western Blots verifiziert werden?	45
4	Methoden und Material	51
4.1	Methoden	51
4.1.1	Zellkultur	51
4.1.1.1	Zellkulturmedien	51
4.1.1.2	Kultivieren und Passagieren	51
4.1.1.3	Isolierung humaner Monozyten aus Frischblut (Buffy Coats)	52
4.1.1.4	Bestimmung der Zellzahl	52
4.1.2	Stabile Transfektion	53
4.1.3	Western Blot	53
4.1.3.1	Gewinnung der Zytosol- und Membranfraktion aus HepG2 bzw. HepG22aI Zellen	53
4.1.3.2	Gewinnung der Zytosolfraktion aus Makrophagen	54
4.1.3.3	Proteinbestimmung von Zelllysatproben mittels Bradford-Reagenz	55
4.1.3.4	Immunoblot	55
4.1.4	Mikroskopie und Immunozytochemie	57
4.1.5	Apoptosemessung für Makrophagen	58

4.1.6	Präparation, Reinheitsprüfung und Modifikation von humanem Low-Density Lipoprotein (LDL)	59
4.1.6.1	LDL-Präparation	59
4.1.6.2	Reinheitsprüfung	59
4.1.6.3	Minimale Modifikation von humanem Low-Density Lipoprotein	60
4.1.6.4	Bestimmung des Oxidationsgrades von mmLDL	60
4.1.6.5	Proteinbestimmung von mmLDL mittels BCA-Reagenz	61
4.1.7	Messung des intrazellulären Sphingomyelin-Umsatzes	61
4.1.8	Aktivitätsmessung für nSMase nach <i>in-vivo</i> Stimulation	62
4.1.9	Aktivitätsmessung für nSMase nach <i>in-vitro</i> Stimulation zur Festlegung des Hemmmechanismus	63
4.1.10	Aktivitätsmessung für bakterielle SMase nach <i>in-vitro</i> Stimulation	63
4.1.11	Zytotoxizitätstest	64
4.2	Material	64
4.2.1	Chemikalien	64
4.2.2	Zusammensetzung von Puffern und verwendeten Lösungen	65
4.2.3	Zellkultur- und Transfektionsreagenzien	68
4.2.4	Zellkulturen	68
4.2.5	Antikörper	68
4.2.6	Materialien für Western Blot	69
4.2.7	Geräte	69
5	Diskussion	71
5.1	Darstellung der erreichten Zielsetzung	71
5.2	Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift	72
5.2.1	Wirkung des Ceramids auf sein Targetprotein PKC- α	72
5.2.2	Biologische Evaluierung des Scyphostatin-Analogons, eines nSMase-Inhibitors	77
5.2.3	Biologische Evaluierung verschiedener Ceramidanaloga	79
5.3	Fazit	82
6	Literaturverzeichnis	84

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dem.	Demineralisiertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
aPKC	Atypische Proteinkinase C
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bSMase	Bakterielle Sphingomyelinase
Bp	Basenpaare
CAPK	Ceramid-aktivierte Proteinkinase
CAPP	Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase
Cer	Ceramid
cPKC	Klassische Proteinkinase C
cPLA ₂	Zytosolische Phospholipase A ₂
c-Raf	Proteinkinase c-Raf
CTSD	Aspartatprotease Cathepsin D
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Optimierte Chemilumineszenz
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HepG2	Humane hepatische Krebszelllinie
HepG22a1	Humane hepatische Krebszelllinie, transfiziert
HLH	Hyperzytokinämische hämophagozytische Lymphohistiozytose
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatografie
hTERT-BJ1	Humane Telomerase-immortalisierte Zelllinie
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KBr	Kaliumbromid
LDL	Low-Density Lipoprotein

Leu	Leucin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mmLDL	Minimal modifiziertes Low-Density Lipoprotein
MΦ	Makrophagen
nLDL	Natives Low-Density Lipoprotein
nPKC	Neuartige Proteinkinase C
nSMase	Neutrale Sphingomyelinase
NSMII	Neutrale Sphingomyelinase 2
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
PBMC	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	Dulbecco's Phosphat Puffer
PCD	Programmierter Zelltod
Phe	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACK	Rezeptor für aktivierte C Kinase
REM	Relative elektrophoretische Mobilität
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS/PA-Gel	Natriumdodecylsulfat/Polyacrylamid-Gel
Ser	Serin
SMase	Sphingomyelinase
SM	Sphingomyelin
SMPD	Sphingomyelin Phosphodiesterase
Thr	Threonin
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor alpha
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
wtGFP	GFP-Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Ceramide

1.1.1 Freisetzung und Wirkung

Das Sphingolipid Sphingomyelin **1** (Abb. 1) ist ein integraler, ubiquitärer und inerte Baustein von Biomembranen, der in eukaryontischen Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp bis zu 25 % der Membranlipidmasse beträgt [1]. Weiterführende Erkenntnisse zeigen, dass Membranlipide und deren Abbauprodukte wichtige Funktionen in der Signaltransduktion der Zellen besitzen und ihre Wirkung als Botenstoffe in der intrazellulären Signalübertragung wird immer deutlicher. Besonders Ceramide **2** als primäre Metabolite des Sphingomyelins gelten dabei als hochreaktive, modulierende Moleküle. Ihre Freisetzung und Teilnahme an der intrazellulären Signaltransduktion, dem so genannten Sphingomyelin-Signalweg, wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht [2]. Ceramide spielen, wie in zahlreichen Studien berichtet wird, als intrazelluläre Lipidmediatoren (*Second Messenger*) eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation, der Zellwachstumshemmung, dem programmierten Zelltod (Apoptose) und der Freisetzung von inflammatorischen Eicosanoiden [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. So sind Veränderungen der intrazellulären Ceramidkonzentration bei verschiedenen Erkrankungen wie Krebs, Arteriosklerose, HIV-Infektion, neurodegenerativen Erkrankungen, chronischen und akuten inflammatorischen Prozessen oder Sepsis nachgewiesen [14]. Die Freisetzung des Ceramids und damit die Erhöhung der intrazellulären Ceramidkonzentration kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen (Abb. 1): Die *de novo* Synthese startet mit der Reaktion von Palmitoyl-CoA **3** und L-Serin **4** zu 3-Oxosphinganin **5**. Im nächsten Schritt wird **5** durch die 3-Oxosphinganin-Reduktase mit Hilfe von NADPH als Kofaktor zu Sphinganin **6** reduziert. Sphinganin wird anschließend über die Dihydroceramid-Synthase zu Dihydroceramid **7** acyliert, bevor dieses im letzten Schritt zu **2** dehydriert wird (Weg A). Der zweite Weg zur intrazellulären Ceramidgenerierung erfolgt über die Hydrolyse des membranintegrierten Sphingomyelins **1** durch die so genannten Sphingomyelinasen (Weg B). Diesem Weg kommt aufgrund der Schnelligkeit und leichten Regulierbarkeit die größte Bedeutung hinsichtlich der Beeinflussung und Regulation des Ceramidspiegels innerhalb der Zelle zu. Der dritte Weg, über den die Ceramidkonzentration kontrolliert werden kann, läuft über die ceramidabbauenden Enzyme Sphingomyelin-Synthase, Glycosylceramid- bzw. Galactosylceramid-Synthase, Ceramidase oder Ceramid-Kinase (Weg C) [15, 16].

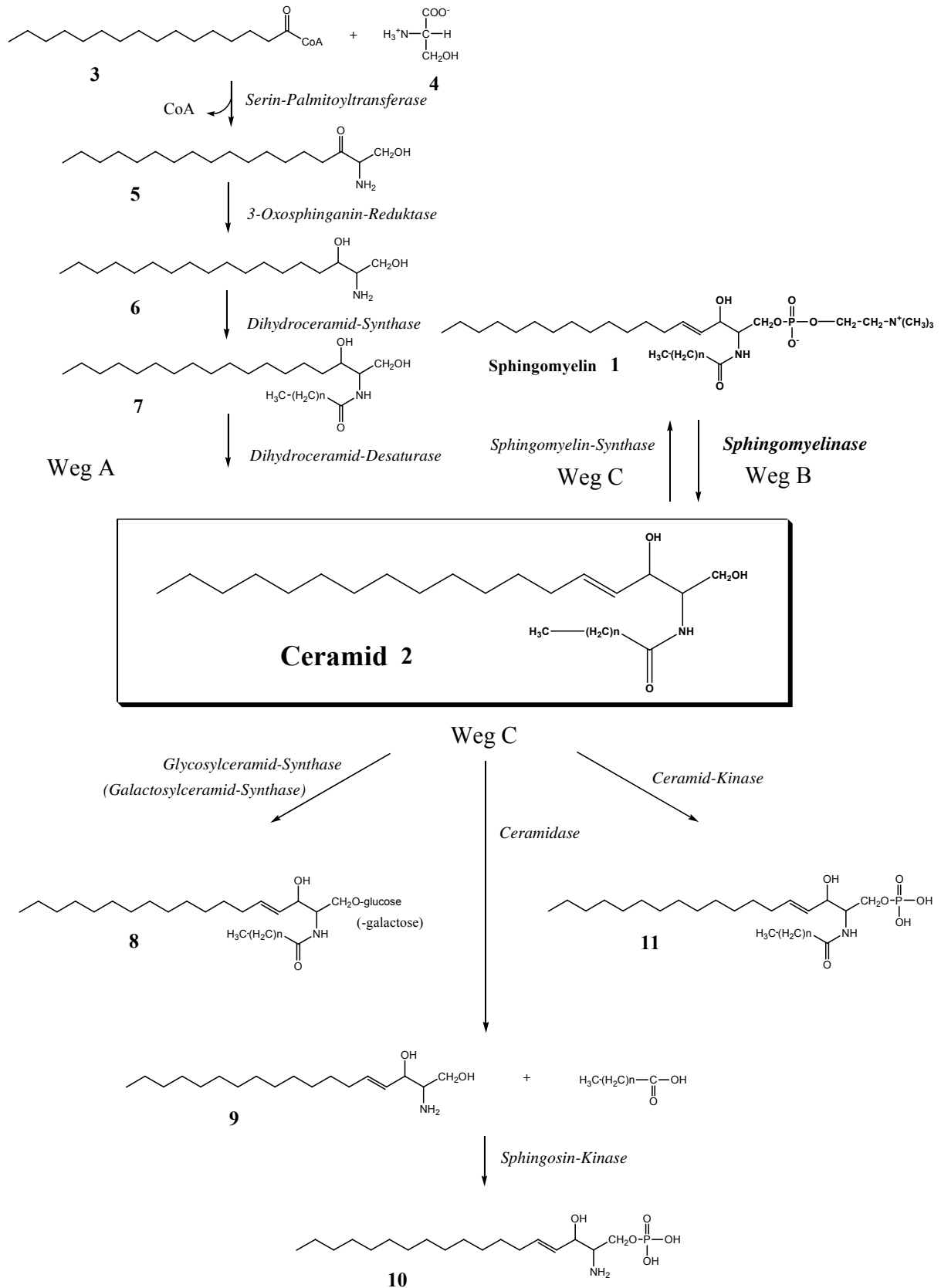


Abb.1 Sphingolipidmetabolismus und Kontrolle des Ceramidspiegels. Die Regulation des Ceramidspiegels läuft über drei Wege (Weg A, B und C), nähere Erläuterungen siehe Text. Beteiligte Enzyme sind durch kursive Schrift gekennzeichnet. **3** Palmitoyl-CoA; **4** L-Serin; **5** 3-Oxosphinganine; **6** Sphinganine; **7** Dihydroceramid; **8** Glycosyl- bzw. Galactosylceramid; **9** Sphingosin; **10** Sphingosin-1-phosphat; **11** Ceramidphosphat; n, Anzahl der CH₂-Gruppen je nach Länge der acylierten Fettsäure.

Dieser Sphingolipidmetabolismus, dargestellt in Abb. 1, zeigt die komplexe Interaktion zwischen zahlreichen Enzymen und ihren Substraten bzw. Produkten, wobei die verschiedenen Derivate/Metabolite des Ceramids selbst als Effektormoleküle mit entweder antagonistischen oder die Ceramideffekte unterstützenden Wirkungen fungieren können. Untersuchungen postulieren eine enge Wechselwirkung zwischen **2** und **10**, wodurch die Regulation von Proliferation und Apoptose streng koordiniert wird [17, 18]. Die Ceramide können mit verschiedenen Fettsäuren unterschiedlicher Länge acyliert sein. Dies ist durch den Index n in Abb. 1 gekennzeichnet. Vor allem die kurzkettigen zellpermeablen Ceramide C₂-Ceramid (N-Acetyl sphingosin, $n = 2$) und C₆-Ceramid (N-Hexanoyl sphingosin, $n = 6$) werden für Untersuchungen der Ceramidwirkungen verwendet.

1.1.2 Sphingomyelinasen (SMasen)

Die Hydrolyse des membrangebundenen Sphingomyelins (SM) durch die so genannten Sphingomyelinasen (SMasen) spielt den bedeutensten und schnellsten Schritt bei der intrazellulären Regulation der Ceramidfreisetzung. Die übergreifende Enzymfamilie ist aufgrund des Phospholipase-C-ähnlichen Hydrolysemechanismus eines einzigen Substrates, des Sphingomyelins, funktionell definiert und beinhaltet bisher mindestens fünf verschiedene Isoformen [19, 20]. Diese Isoformen unterscheiden sich nicht nur durch ihr pH-Optimum und ihre notwendigen Kofaktoren, sondern auch durch ihre Lokalisation, ihre Aktivierungsmechanismen und ihre Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen. Bisher sind die lysosomale, Zn²⁺-unabhängige saure SMase, die sezernierte, Zn²⁺-abhängige saure SMase, die zytosolische, Mg²⁺-unabhängige neutrale SMase, die mikrosomenassoziierte, Mg²⁺-abhängige neutrale SMase, die membrangebundene, Mg²⁺-abhängige neutrale SMase und die alkalische SMase identifiziert worden. Eine Übersicht der endogenen Sphingomyelinasen, ihrer Gene und bekannter Inhibitoren ist in Abb. 2 zusammengestellt. Bei der Hydrolyse von SM durch die verschiedenen SMasen entsteht Phosphorylcholin und das intrazelluläre Effektormolekül Ceramid. Während das geladene Molekül Phosphorylcholin in das wässrige Milieu entlassen wird, verbleibt das freigesetzte Ceramid innerhalb der Zellmembran und wirkt als *Second Messenger* bei zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Proliferation, Inflammation oder Apoptose. Die meisten Säugetierzellen können diesen Sphingomyelin-Signalweg nutzen.

HUGO Name (Genbank ID)	pH- Optimum	Kofaktor	Lokalisation	Funktion	Inhibitor
SMPD1 (NM_000534)	~ 5	keine	Lysosomen, Caveolen, Plättchen [21, 22]	Metabolischer Abbau von endozytiertem SM; Apoptose, Differenzierung, Inflammation; Manifestation eines funktionellen Mangels: Niemann- Pick Erkrankung	Desipramin [23, 24], SR33557 [23, 25], NB6 [26], DTT[27]
SMPD1 (NM_000534)	5 - 7	Zn ²⁺	Sezerniertes Enzym [28, 29, 30, 22]	Arteriogenese [28, 29, 30], HLH [31], Diabetes [32]	%
N.N .	~ 7	<i>in-vitro</i> : Triton X- 100, Deoxychol- säure	Zytoplasma (HL-60 Zellen) [33]	Differenzierung; 1,25-Dihydroxy- vitamin D ₃ , IFN- γ und TNF- α vermittelte Signaltransduktion in HL-60 Zellen [34]	Cu ²⁺ Fe ³⁺ Zn ²⁺
SMPD2 (NP_003071)	~ 7	Mg ²⁺	Mikrosomen [35, 36], Endoplasma- tisches Retikulum [37]	Sequenz ähnlich bSMase, aber keine Veränderung im SM- Pool	%
SMPD3 [NSMII] (NP_061137)	~ 7	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ (millimolar), Phosphati- dylserin, Arachidon- säure	Membran [38]	Hydrolyse von membrangebundenem SM; Differenzierung, Proliferation, Inflammation, Zellwachstumshem- mung, Apoptose	Scyphostatin [39], Glutathion [27], Manumycin [40], Chlorogentisyl- chinon [41], Ubichinol [42], C11AG [43]
Alkalische Sphingomyelinase (intestinal) (AY_230663)	8 - 9,5	Gallensalze	Mukosamembran, Gallenflüssig- keit [44, 45]	Metabolischer Abbau von in Nahrungs- mitteln enthaltenem SM; Manifestation eines funktionellen Mangels: Dickdarm- krebs? [46]	%

Abb.2 Klassifikation der endogenen SMasen. In Säugetiergeweben kommen mehrere SM-spezifische Enzyme mit Phospholipase-C-ähnlicher Aktivität vor. Diese Isoenzyme unterscheiden sich in ihren katalytischen Eigenschaften, ihren Kofaktoren, ihrer Lokalisation und Funktion. SMPD1 (Sphingomyelin Phosphodiesterase 1) kodiert für die saure SMase, die abhängig vom Stimulus durch differentielle posttranslationale Modifikation entweder ins Lysosom transportiert oder ins Plasma sezerniert wird; SMPD2 (Sphingomyelin Phosphodiesterase 2) kodiert für die neutrale SMase1; SMPD3 (Sphingomyelin Phosphodiesterase 3) kodiert für die neutrale SMase2, ein aufgrund struktureller Besonderheiten abgeleitetes Gen (*bona-fide*-Gen); bSMase, bakterielle Sphingomyelinase; DTT, Dithiothreitol; HLH, Hyperzytokinämische hämophagozytische Lymphohistiozytose; HUGO, *Human Genome Organisation*; IFN- γ , Interferon gamma; NSMII, Neutrale Sphingomyelinase 2; SM, Sphingomyelin; TNF- α , Tumor Nekrose Faktor alpha.

1.1.2.1 Neutrale Sphingomyelinase (nSMase)

Von den verschiedenen SMase-Formen, die bisher identifiziert wurden, scheinen mindestens zwei, und zwar die lysosomale, Zn^{2+} -unabhängige saure SMase (SMPD1) und die membrangebundene, Mg^{2+} -abhängige neutrale SMase2 (SMPD3), den intrazellulären Ceramidlevel und die nachfolgenden Ceramid-vermittelten Zellantworten zu regulieren [47]. Da insbesondere die nSMase in der Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertationsschrift zur Untersuchung des SM-Signalwegs im Hinblick auf dessen Stimulation und Inhibierung eingesetzt wird, soll sie hier näher beschrieben werden. Der größte Anteil der nSMase2-Aktivität (SMPD3) ist in der zellulären Membranfraktion lokalisiert. Es wird angenommen, dass an der Innenseite der Zellmembran ein spezieller SM-Pool vorhanden ist, der für die Einspeisung in den SM-Zyklus zur Verfügung steht [48]. Die membrangebundene nSMase-Isoform wurde von Liu und Kollegen 1998 zum ersten Mal aus Rattenhirn isoliert und charakterisiert [49]. Bisher liegen keine Röntgenstruktur und keine Details über die hydrolytischen Mechanismen vor. Ihre physiologische Regulation unterliegt verschiedenen Substanzen. Mehrwertige Kationen wie Mg^{2+} und Mn^{2+} ebenso wie Arachidonsäure [50] und Phosphatidylserin (PS) führen zu einer Steigerung der Enzymaktivität. Andere Phospholipide wie Phosphatidsäure und Phosphatidylinositol führen nur in geringerem Maße zu einer Enzymaktivitätssteigerung, während Diolein und kurzkettige Ceramide keinen Effekt auf die Aktivität der nSMase ausüben [49]. Als selektive Inhibitoren der membrangebundenen nSMase wurden bisher Glutathion [27, 51], Scyphostatin [39, 52], Manumycin [40], Chlorogentisylchinon [41], Ubichinol [42] und das Aminoguanidin C11AG [43] identifiziert. Glutathion hemmt die nSMase-Aktivität sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo*, wobei ein Entzug an Glutathion zu einer gesteigerten SM-Hydrolyse und intrazellulären Ceramidzunahme führt [27]. Da eine Abnahme des Glutathionspiegels immer dann beobachtet wird, wenn Zellverletzungen oder Apoptoseprozesse in Zellen stattfinden, wird angenommen, dass das Absinken des Glutathionlevels und damit die gesteigerte nSMase-Aktivität eine Ursache für den durch oxidativen Stress aktivierten SM-Signalweg darstellen (vgl. Kapitel 1.1.3) [27]. Der Naturstoff Scyphostatin soll in der Lage sein, die nSMase mit einer IC_{50} von $1,0 \mu M$ zu hemmen. Scyphostatin wurde von Nara und Kollegen zum ersten Mal 1999 aus einem Pilzextrakt von *Trichopeziza mollissima* isoliert [39]. Im Jahre 2001 konnte eine Arbeitsgruppe um Arenz und Kollegen ein wirksames Analogon chemisch synthetisieren [53]. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde ein Analogon des Scyphostatins synthetisiert [54], das ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit zur Untersuchung des SM-Signalwegs eingesetzt und näher charakterisiert werden sollte.

1.1.3 Aktivierung des SM-Signalwegs

Die Generierung des Ceramids durch Hydrolyse des Sphingomyelins durch Sphingomyelinasen mit Aktivierung des SM-Signalwegs kann auf zwei Wegen erfolgen. Einerseits wird zellulärer Stress verursacht durch UV-Strahlung [55], Oxidantien [5, 16], Hitzeschock [56], Zytostatika [57, 58] oder radioaktive Strahlung [59, 60] als Auslöser angesehen und andererseits soll die Ceramidbildung über eine rezeptorvermittelte Stimulation erfolgen. Als solche extrazellulären Stimulanzen werden Vitamin D₃ [61], Interferon gamma (IFN- γ) [62], Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) [62, 63], Interleukin-1 (IL-1) [64], der Nervenwachstumsfaktor (NGF) [65, 66] und CD95-Ligand (Fas/APO-1) [67, 68] angesehen. Beide Wege bewirken eine transiente oder permanente Erhöhung des endogenen Ceramidlevels mit unterschiedlichen Kinetiken [5, 15, 69].

1.1.4 Targetproteine des Ceramids

Es ist bekannt, dass Ceramid die Aktivität mehrerer zellulärer Proteine reguliert [70, 71]. Als direkte Targetproteine des Ceramids sind bisher die Ceramid-aktivierten Proteinkinasen (CAPK) [72, 73, 74, 75] und die Ceramid-aktivierten Proteinphosphatasen (CAPP) [76, 77, 78] identifiziert worden (Abb. 3). Die CAPP führen über ein weiteres Zielmolekül zu einer Zellwachstumshemmung in der G1-Phase während der Zellteilung [79], ein biologischer Effekt, für den auch Ceramid verantwortlich sein soll. Mittels Fotoaffinitätsmarkierung konnte gezeigt werden, dass nach einer durch IL-1 induzierten Ceramidbildung dieses spezifisch an die Proteinkinase c-Raf bindet und dessen Kinaseaktivität erhöht [74, 80]. Als weitere Targetproteine des Ceramids sind die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) bekannt, die auch als c-Jun N-terminal Kinasen (JNK) bezeichnet werden. Sie können durch stressinduzierende Stimulanzen wie radioaktive Strahlung und Hitzeschock aktiviert werden, beides Stimuli, die auch in einem Anstieg des intrazellulären Ceramidlevels resultieren [81, 56]. Weiterführende Forschungsarbeiten entdeckten die Aspartatprotease Cathepsin D als neues direktes Ceramidtarget [82]. Zudem wurde mittels Fotoaffinitätsmarkierung die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) als direktes Target des Ceramidmoleküls identifiziert [83]. Die darauffolgende Arachidonsäurefreisetzung und Bildung von Eicosanoiden (Prostaglandine) könnte die Beteiligung des Ceramids als Botenstoff bei inflammatorischen Prozessen erklären [83]. Ebenfalls mittels Fotoaffinitätsmarkierung konnten erst kürzlich Ceramid-bindende Proteine als Targets in neuronalen Zellen identifiziert werden [84]. Ein weiteres direktes Targetprotein des Ceramids, mit dem sich auch die vorliegende

Dissertationsschrift beschäftigt, ist die Proteinkinase C (PKC) [85, 86, 16, 87]. Die Wirkung des Ceramids auf die verschiedenen Isoformen der PKC-Familie wird kontrovers diskutiert, worauf zusammen mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit in der Diskussion näher eingegangen wird.

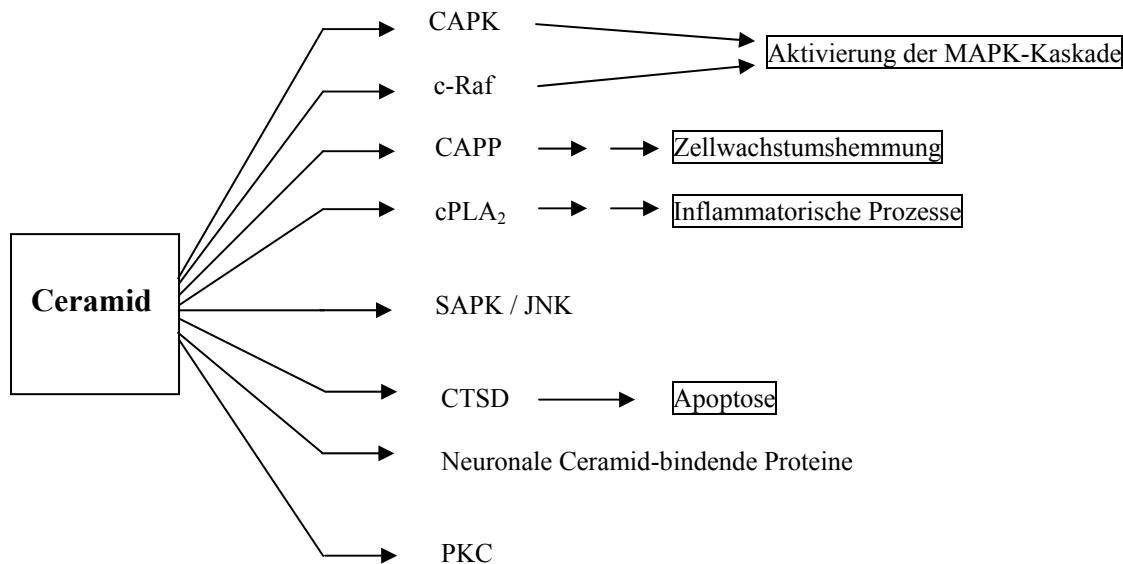


Abb.3 Direkte Targetproteine des Ceramids. CAPK, Ceramid-aktivierte Proteinkinase; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; c-Raf, Proteinkinase c-Raf; CAPP, Ceramid-aktivierte Proteinphosphatase; cPLA₂, zytosolische Phospholipase A₂; SAPK, Stress-aktivierte Proteinkinase; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; CTSD, Aspartatprotease Cathepsin D; PKC, Proteinkinase C [modifiziert nach 88].

1.1.5 Apoptose als Ceramid-induzierte Zellantwort

Neben den in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Effekten ist die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptose) eine sehr intensiv untersuchte Wirkung, die mit dem Lipidmediator Ceramid in Verbindung gebracht wird [8, 2, 59]. Zahlreiche Arbeitsgruppen stellen einen Zusammenhang zwischen Ceramid und apoptoseinduzierenden Proteasen, den so genannten Caspasen (Cysteinyl-Aspartasen), her [89, 90, 91]. Da die Messung der Ceramid-vermittelten Apoptoseinduktion auch in dieser Dissertationsschrift als Methode eingesetzt wird, um eine Ceramidwirkung nachzuweisen, soll dieser Prozess und die dafür zur Verfügung stehenden Nachweise näher beschrieben werden.

Der Nachweis der Apoptose kann biochemisch oder morphologisch erfolgen. Biochemische Veränderungen können in frühzeitigen Apoptosestadien (Effektorphase) an der Translokation des Phosphatidylserins von der Innenseite an die Außenseite der Mitochondrienmembran

(Verlust der Membranasymmetrie), an der Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials, an der Freisetzung mitochondrialer Komponenten wie Cytochrom C und ROS (reaktive Sauerstoffspezies) oder an der Aktivierung der Apoptosekaskade durch die Caspasen gemessen werden. In späteren Apoptosestadien (Degradationsphase) lassen sich biochemische Veränderungen am Abbau des Zellchromatins durch Endonukleasen und an der Spaltung des Enzyms Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) durch bestimmte Proteasen (Caspase-3) nachweisen [92, 16].

Zur Messung der Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Mitochondrienmembran kann dieses durch den Annexin-V-Nachweis identifiziert werden [93]. Da Annexin auch nekrotische Zellen anfärbt, wird mit Propidiumiodid gegengefärbt, da diese Verbindung nur bei nekrotischen Zellen bis in den Zellkern diffundiert und dort an die DNA bindet, was fluoreszenzfotometrisch gemessen werden kann. Die Freisetzung von Cytochrom C kann mittels Western Blots nachgewiesen werden [94] und die erhöhte ROS-Generierung durch Anfärben der Zellen mit Dihydroethidin [95]. Dieses reagiert mit ROS unter Bildung von Ethidium, dessen Fluoreszenz gemessen werden kann. Die Veränderung des Membranpotentials lässt sich an der veränderten Aufnahme des Farbstoffs Rhodamin 123, einem kationischen Fluorophor, in die Mitochondrien und Visualisierung durch ein konfokales Laserscanmikroskop erkennen [96]. Zur Bestimmung der zahlreichen in die Apoptosekaskade involvierten Caspasen (beim Menschen sind bisher mindestens 12 verschiedene Caspasen bekannt [2]), deren Aktivierung eine zum Zelltod führende Signalkaskade auslöst, existieren zahlreiche Antikörper oder kommerziell erwerbbar fluoreszenz-Assays. Nach der proteolytischen Spaltung eines fluoreszierenden Substrats durch eine aktive Caspase lässt sich diese Aktivität an der geänderten Fluoreszenz des entstandenen Spaltprodukts messen. *In-vivo* kann die Aktivierung der Caspasenkaskade über zwei Wege eingeleitet werden: Der erste Weg (extrinsischer Signalweg) läuft über die Aktivierung des CD95-Rezeptors (auch Fas- oder APO-1-Rezeptor bzw. Todesrezeptor genannt) und der zweite Weg (intrinsischer Weg) über die aus den permeabilisierten Mitochondrien freigesetzten Komponenten (u. a. Cytochrom C) [16]. Diese induzierte Aktivierung der verschiedenen Caspasen führt letztendlich zur Aktivierung derjenigen Enzyme, die in der Degradationsphase zum Absterben der Zelle führen: Der so genannte internukleosomale Chromatinabbau durch Endonukleasen, die das Chromatin in ca. 180 bp lange Abschnitte zerschneiden und damit die genetische Information zerstören, kann elektrophoretisch als DNA-Leiter („DNA-laddering“) identifiziert werden [97] oder kann *in-situ* durch Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen mittels eines spezifischen Enzyms, der

terminalen Desoxynukleotid-Transferase (TdT) unter Verwendung der so genannten TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin-Nick-end-Labeling) nachgewiesen werden [98]. Die Messung der Spaltung des Enzyms PARP, einem Schlüsselprotein zur Reparatur von DNA-Schäden, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie während des Apoptoseprozesses unter der Einwirkung der oben erwähnten Endonukleasen entstehen, erfolgt durch Proteinnachweis der zwei resultierenden Fragmente (29 kDa, 85 kDa) mittels Western Blot [97, 89]. Da die proteolytische Spaltung von PARP lediglich beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann mit diesem Assay Apoptose eindeutig von Nekrose unterschieden werden. In diesem Stadium kann die Apoptose zudem durch Anfärben der apoptotischen Zellen mit YO-PRO-1 gemessen werden [26]. Für diese Methode wird gleichzeitig mit Hoechst 33342 Farbstoff gegengefärbt. Während YO-PRO-1 nur im Falle einer Membrandesintegration in den Zellkern diffundiert, bindet Hoechst 33342 Farbstoff auch in intakten, d. h. nicht apoptotischen Zellen an die DNA, was über eine blaue Fluoreszenz gemessen werden kann. Durch Auszählen der apoptotischen durch YO-PRO-1 grün angefärbten Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl an blau fluoreszierenden Zellen kann die Apoptoserate in Prozent angegeben werden [26].

Morphologische Veränderungen lassen sich in der Degradationsphase an der Zelloberfläche durch kleine Vesikel oder Abschnürungen („Blebbing“) erkennen [99]. Ein auf dieses Phänomen beruhender Apoptosenachweis kann jedoch mit einer hohen Rate sowohl falsch positiver als auch falsch negativer Ergebnisse verbunden sein, so dass das Ergebnis stark von der Erfahrung des Untersuchenden abhängt.

1.2 Proteinkinase C

1.2.1 Proteinkinase C Familie

Die Familie der Proteinkinase C ist eine Gruppe von Enzymen, von denen zur Zeit zwölf verschiedene Isoformen bekannt sind. Sie werden, basierend auf ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Abhängigkeit von Phospholipidmetaboliten oder Ca^{2+} -Ionen, in drei Untergruppen eingeteilt. Diese bezeichnet man als klassische PKC (cPKC), neuartige PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). Die Isoformen der cPKC-Untergruppe (α , β I, β II und γ) bestehen aus einer Ca^{2+} -bindenden Region (C2-Region), die auch mit Phospholipiden insbesondere mit Phosphatidylserin (PS) interagiert, und zwei cysteinreichen Domänen (C1-Region), die Diacylglycerol (DAG) oder Phorbolster binden. Damit ist zur vollständigen Aktivierung der

cPKC sowohl Calcium, PS und DAG notwendig. Phorbolster sind metabolisch stabile Analoga des physiologischen Aktivators DAG. Sie binden an die gleiche cysteinreiche Domäne und imitieren die DAG-Effekte [100]. Die Isoformen der nPKC-Untergruppe (δ , ϵ , η und θ) besitzen die C1-Region und eine C2-ähnliche Region, so dass sie auch in Abwesenheit von Calcium durch PS und DAG oder Phorbolster aktiviert werden. Den Isoformen der aPKC-Untergruppe (ζ und ν/λ) fehlt die C2-Region, sie besitzen lediglich eine cysteinreiche Domäne. Ihre Regulation ist noch nicht vollständig geklärt. Sie können durch PS aktiviert werden, besitzen aber keine Bindestelle für DAG und Phorbolster (Abb. 4) [101, 102, 103]. Von Johannes und Kollegen wurde eine weitere vierte Untergruppe beschrieben, deren einzige Isoform als PKC- μ bezeichnet wird [104].

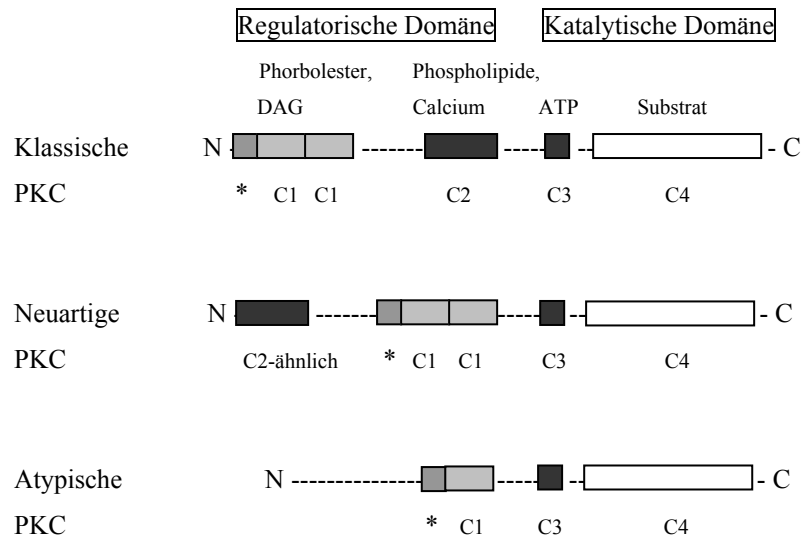


Abb.4 Schematische Darstellung der Primärstruktur der drei PKC-Subfamilien. Dargestellt sind Pseudosubstrat (*) und die Binderegionen für Phorbolster und DAG (C1), Phospholipide und Calcium (C2), Phospholipide (C2-ähnlich), ATP (C3) und Substrat (C4). C1 und C2 bilden die regulatorische Domäne, C3 und C4 die katalytische Domäne. ATP, Adenosintriphosphat; DAG, Diacylglycerol; N, N-Terminus; C, C-Terminus [102].

1.2.2 Aktivierung der PKC-Isoformen

Die PKC ist als Schlüsselenzym bei vielen Signaltransduktionen einer Zelle beteiligt und wird durch eine große Anzahl von Agonisten aktiviert. Vor der Stimulation ist die inaktive PKC im gesamten Zellzytosol diffus verteilt oder innerhalb spezieller Regionen der Zelle lokalisiert [105, 106]. Nach der Stimulation durch verschiedene Agonisten translozieren die PKC-Isoformen von ihren Zellstandorten im inaktiven Zustand zu den für jedes Isoenzym spezifischen Kompartimenten innerhalb der Zelle [106]. Diese Translokation der PKC ist sowohl schnell als auch zielgerichtet und lässt sich nach Sekunden und innerhalb eines

Intervalls von wenigen Minuten nach der Stimulation beobachten [107]. Von der cPKC und nPKC ist bekannt, dass sie durch die Aktivierung mit DAG oder Phorbolestern vom Zytosol an die Zellmembran translozieren [108]. Durch die Bindung des membranständigen DAG an die C1-Domäne und PS an die C2-Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung der regulatorischen Domäne, die in einer Entfernung des Pseudosubstrats von der Substratbindestelle resultiert und eine Substratbindung erlaubt. Für die cPKC-Isoformen erfolgt während dieses Aktivierungsprozesses außerdem die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an die C2-Domäne, wodurch die Affinität dieser Domäne gegenüber PS zusätzlich erhöht wird. Die PKC ist nun für die Phosphorylierung ihrer Zielsubstrate vollständig aktiviert [109, 103]. Es wird angenommen, dass dieses aktivierte Enzym mit membranständigen Proteinen, den sogenannten RACKs (Rezeptoren für aktivierte C Kinase) interagiert und damit eng positioniert zu seinen Substraten vorliegt [110]. Diese Rezeptor-Familie in der Membran weist Binderegionen auf, die für jedes aktivierte PKC-Isoenzym spezifisch sind. Diese Spezifität kann erklären, dass jeder PKC-Subtyp einen räumlich unterschiedlichen Targeting-Mechanismus besitzt, der dessen individuelle Rolle in der Zellsignalübertragung festlegt [111].

Da die Translokation jeder PKC-Isoform einer Teilnahme an der Signaltransduktion vorausgeht, stellt sie einen geeigneten Marker dar, um die Aktivierung dieser Enzyme durch verschiedene Stimuli zu untersuchen.

In der vorliegenden Dissertationsschrift sollte vor allem die Translokation des PKC- α Subtyps, hervorgerufen durch verschiedene Stimuli, untersucht werden.

1.2.3 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

Die Anwendung von fluoreszierenden Molekülen ist eine beliebte Methode zur Untersuchung und Detektion einer Vielzahl von biochemischen Phänomenen. Diese Techniken erfordern allerdings häufig eine nichtphysiologische Beeinträchtigung des biologischen Systems bzw. des Organismus, der untersucht werden sollte. Es war bis zur Entwicklung der GFP-Fusions-Methodik (Verknüpfung des GFP entweder N- oder C-terminal an das zu untersuchende Protein) nicht ohne Probleme möglich, in lebenden Zellen dynamische Prozesse wie Bindungsvorgänge oder Proteintranslokationen unter physiologischen Voraussetzungen und Echtzeitbedingungen (*real-time* Bedingungen) zu untersuchen. Die bisherigen Methoden wie die Anwendung von Fluoreszenzmarkern konnten durch die Bindung an die korrespondierenden Proteindomänen die Aktivität der zu untersuchenden Proteine verändern

oder es musste für die Anwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die zellmembranäre Integrität durch Permeabilisierung zerstört werden. Auch die häufig eingesetzte Fotoaffinitätsmarkierungs-Methode zur Identifizierung von neuen Targetproteinen ist im Vergleich zur GFP-Fusions-Methodik für die Beobachtung von intrazellulären, dynamischen Transport- und Translokationsprozessen nur eingeschränkt und nur mit erheblich höherem experimentellen Aufwand anzuwenden. Für diese Markierungs-Methode ist es notwendig, das Protein bzw. Molekül, dessen Bindungsprozesse untersucht werden sollten, sowohl mit einer fotoaktivierbaren als auch radioaktiven Partialstruktur zu markieren. Diese fotoaktive Gruppe ist bei Lichtausschluss stabil und wird bei Lichtzufuhr spontan in eine instabile, reaktive Verbindung überführt, die kovalent an das mögliche Targetprotein in unmittelbarer Nähe bindet. Diese gebundenen Targetproteine lassen sich dann aufgrund ihrer radioaktiven Markierung beispielsweise histologisch lokalisieren und proteinchemisch identifizieren [112]. Unter Verwendung des GFP bei der Beobachtung von intrazellulären Signaltransduktionswegen sind dagegen weder zusätzliche Substrate noch Kofaktoren notwendig. Das GFP wurde schon vor über dreißig Jahren aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert. In diesem Meerestierchen kommt die Fluoreszenz nach Calciumbindung durch Energietransfer zwischen den Proteinen Aequorin und GFP zustande. GFP absorbiert das durch Aequorin emittierte kurzwellige blaue Licht und emittiert gleichzeitig längerwelliges grünes Licht [113, 114, 115]. Diese GFP-Fluoreszenz erfordert keine Kofaktoren oder zusätzlichen Genprodukte von *Aequorea victoria*. Sie lässt sich auch in artfremden lebenden Zellen und Geweben ebenso wie in fixierten Proben mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektieren, das mit einem Filter für den Fluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC-Filter) ausgerüstet ist. Nach der Aufklärung der cDNA-Sequenz und Klonierung des GFP durch Prasher und Kollegen [116] wurde es sowohl in unfusionierter Form als auch in Fusion an andere Proteine in verschiedenen Organismen exprimiert und detektiert [117, 118, 119]. Zur Generierung von Fusionsproteinen werden Vektoren verwendet, die das GFP N- bzw. C-terminal an einer partiellen Signalstruktur des zu untersuchenden Proteins gebunden haben (Abb. 5).

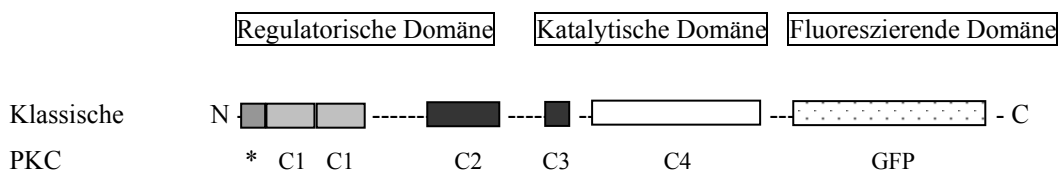


Abb.5 Schematische Darstellung des fluoreszierenden cPKC-GFP Fusionsproteins. Dargestellt ist cPKC C-terminal fusioniert mit GFP. Die PKC weist alle für die biologische

Aktivität notwendigen Domänen auf Pseudosubstrat (*), Binderegionen für Phorbolster und DAG (C1), Phospholipide und Calcium (C2), ATP (C3) und Substrat (C4). ATP, Adenosintriphosphat; DAG, Diacylglycerol; GFP, grün fluoreszierendes Protein; N, N-Terminus; C, C-Terminus.

Ein Nachteil des GFP liegt darin, dass seine Fluoreszenz bei moderater Expression im untersuchten Organismus oft zu schwach ist, um detektiert werden zu können. Eine gesteigerte Expression der GFP-Fusionsproteine allerdings kann den Organismus beeinträchtigen. Um dieses Problem aufzuheben, wurden geeignete Mutanten entwickelt. Das Absorptionsspektrum des wtGFP (GFP-Wildtyp) besitzt zwei Maxima (Maximum bei 395 nm, Schulter bei 475 nm), wobei eine Anregung bei 395 nm ein schnelleres Ausbleichen der Fluoreszenz zur Folge hat [117, 120]. Gezielte Mutationen (Austausch Phe⁶⁴ gegen Leu und Ser⁶⁵ gegen Thr im GFP-Chromophor) führen zu einer Verschiebung der maximalen Anregungswellenlänge zu 490 nm und Eliminierung des zweiten Absorptionspeaks [121]. Eine derartige Rotverschiebung ermöglicht eine optimale Anregung durch häufig eingesetzte Argonlaser, die eine Wellenlänge bei 488 nm emittieren. Die aufgrund dieser Eigenschaften am häufigsten verwendete GFP-Mutante ist das EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), das durch Rotverschiebung und stark erhöhtem Extinktionskoeffizienten eine um das 35fache gesteigerte Fluoreszenzintensität gegenüber dem wtGFP besitzt [121, 122]. Damit ermöglicht EGFP, neben GFP, in intakten lebenden Zellen eine detaillierte Charakterisierung der intrazellulären Lokalisierung und Translokation von Proteinen wie Phosphatasen und Kinasen oder Bestandteile des Zytoskeletts. Diese Methodik ist schneller und effektiver als der bisherige Einsatz von Fluoreszenzmarkern und fluoreszenzmarkierten Antikörpern und ermöglicht im Gegensatz zur Fotoaffinitätsmarkierungs-Methode die Beobachtung der Zelldynamik unter Echtzeitbedingungen. Für die PKC sind bereits mehrere GFP- bzw. EGFP-fusionierte Proteine beschrieben, z. B. für PKC- γ [123] und PKC- δ [124]. Auch die Wirkung von Ceramid auf fusionierte PKC- δ und PKC- ϵ ist untersucht [125]. Aber auch einige GFP-fusionierte PKC- α Proteine werden verwendet [126, 127], ein Fusionsprotein, das auch in der vorliegenden Arbeit für Studien generiert und eingesetzt werden sollte. Almholt et al. geben den Nachweis, dass sich sowohl die mit GFP N- als auch C-terminal fusionierte PKC- α (GFP-mPKC- α und mPKC- α -GFP) genau wie die unfusionierte PKC- α verhält. Versuche mit Phorbolestern ergaben, dass sich alle drei Kinasen sowohl vor als auch nach der Stimulation durch einen Phorbolster in der gleichen Zellfraktion befinden, was anhand von Western Blots belegt werden konnte [128]. Zu dem gleichen Ergebnis kommen auch Khalil und Kollegen nach immunozytochemischen Versuchen [129]. Daraus wird deutlich, dass solche Fusionsproteine zur Beobachtung bzw. Untersuchung von PKC-Translokationsstudien nicht

nur geeignet sind, sondern auch die Möglichkeit bieten, unter Echtzeitbedingungen in lebenden, intakten Zellen die Signaltransduktionswege zu verfolgen, zu messen und optisch festzuhalten.

Ein derartiges Protein-EGFP-Konstrukt sollte auch im Rahmen dieser Dissertationsschrift genutzt werden, um in einem *in-vivo* Testsystem anhand einer fluorophormarkierten PKC- α erweiterte Kenntnisse über die durch den Lipidmediator Ceramid vermittelten dynamischen Prozesse und ausgelösten Signaltransduktionswege zu erhalten.

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Charakterisierung der Ceramid-vermittelten Signaltransduktionswege ein *in-vivo* Testsystem auszuarbeiten, mit dem die Modulationen des intrazellulären Ceramidstoffwechsels unter Echtzeitbedingungen abgeschätzt und untersucht werden konnten. In diesem Zusammenhang sollte ein Assaysystem etabliert werden, das es ermöglicht, die Wirkung des Ceramids einschließlich anderer Stimulanzen auf die Translokation der phosphorylierenden PKC- α unter physiologischen Bedingungen zu verfolgen und näher zu charakterisieren. Eine weitere Aufgabenstellung zur Untersuchung des endogenen Ceramidstoffwechsels war die Bewertung und Identifizierung von potentiellen Ceramidanaloga und die biologische Evaluierung eines Inhibitors der intrazellulären Ceramidgenerierung.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung einer stabilen Zelllinie mit PKC- α -EGFP Fusionsprotein

Zielsetzung und Problemstellung

Für die Ausarbeitung und Aufstellung eines *in-vivo* Testsystems zur Abschätzung und Charakterisierung des intrazellulären Ceramidstoffwechsels unter Echtzeitbedingungen in lebenden Zellen war die erste Zielsetzung die Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie, die dauerhaft ein fluoreszierendes PKC- α -EGFP Fusionsprotein als Targetprotein überexprimiert.

Initial wurde eine humane immortalisierte Fibroblasten-Zelllinie (hTERT-BJ1) mit einem kommerziell erhältlichen pPKC α -EGFP Vektor mit Hilfe der Liposomen-induzierten Transfektions-Methode transfiziert. Eine geringe Transfektionsrate von nur fünf bis zehn Zellen pro Petrischale (\varnothing 100mm) konnte am folgenden Tag fluoreszenzmikroskopisch festgestellt werden. Nach der Selektion mit G418 [4mg/ml] unterblieb bei den erfolgreich transfizierten Zellen trotz wochenlanger Kultur unter Standardbedingungen die Zellteilung. Auch ein Zusatz an Bisindolylmaleimid, einem PKC-Inhibitor, der zur Kompensation einer möglichen Überexprimierung der PKC- α eingesetzt wurde, war nicht erfolgreich. Da wiederholte Ansätze das gleiche Ergebnis zeigten und Fibroblasten-Zelllinien in der Literatur teilweise als schwer transfizierbar gelten, wurde diese Linie lediglich als untransfizierte Zelllinie für bestimmte Versuche eingesetzt.

Für die notwendige Transfektion mit pPKC α -EGFP Vektor wurde daher eine zweite humane Zelllinie, die HepG2 Zelllinie, verwendet. Die Zellen wurden nach der gleichen Lipofektionsmethode, die bereits für die hTERT-BJ1 Zelllinie angewendet worden war, transfiziert. Diese Transfektion war bereits beim ersten Versuch erfolgreich und nach etwa sechs bis acht Wochen konnten die ersten stabil transfizierten Klone isoliert werden. Die ausgewählte, stabil transfizierte Zelllinie, mit der in den folgenden Kapiteln gearbeitet wird, wurde als HepG22aI Zelllinie bezeichnet.

Die erfolgreiche Transfektion konnte mittels klassischen immunochemischen Methoden (Western Blot) nachgewiesen werden. Dafür wurden sowohl Zellen der HepG2 Zelllinie als auch solche der HepG22aI Zelllinie mit serumfreiem RPMI 1640 inkubiert und anschließend die Zelllysate nach Zytosol- und Membranextrakt getrennt gewonnen. Nach der Proteinbestimmung und elektrophoretischen Auftrennung der Zytosol- und Membranproteine

durch ein SDS/Polyacrylamid-Gel (SDS/PA-Gel) wurden diese auf eine PVDF Membran geblottet und mit monoklonalem Antikörper gegen PKC- α als Primärantikörper und Peroxidase-gekoppeltem Antikörper als Sekundärantikörper inkubiert. Die spezifischen Banden wurden mit ECL-Detektionssystem auf entsprechenden Filmen detektiert. Anhand des Molekulargewichtsmarkers konnte für das HepG2 Lysat in beiden Fraktionen (Zytosol- und Membranfraktion) eine Bande bei etwa 82 kDa identifiziert werden, die der PKC- α Bande entspricht, und für das HepG22aI Lysat sowohl eine schwache Bande bei 82 kDa als auch eine stärkere Bande bei etwa 109 kDa, die dem PKC- α -EGFP Fusionsprotein entspricht (Abb. 6A und B).

Die Membran des zytosolischen Extrakts wurde anschließend gestrippt, erneut geblockt und mit Living Colors[®] A.v. Peptid Antikörper gegen EGFP als Primärantikörper und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Nach der ECL-Detektion konnte lediglich für das HepG22aI Lysat eine Bande von 109 kDa identifiziert werden (Abb. 6C).

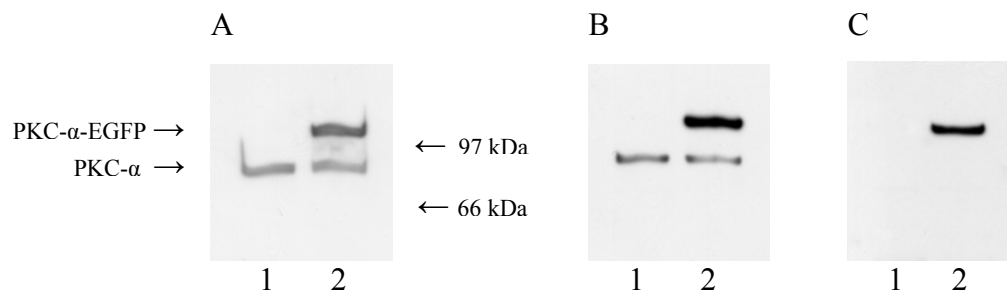


Abb.6 Western Blot für PKC- α (A, B) und EGFP (C) aus untransfizierten und transfizierten HepG2 Zellen. HepG2 Lysat (1) und HepG22aI Lysat (2) wurden als Zytosol- (A) und Membranextrakt (B) getrennt gewonnen. Gleiche Mengen Protein (5 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Nach Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C), Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4°C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen. Membran A mit HepG2 Lysat (1) und HepG22aI Lysat (2) des zytosolischen Extrakts wurde gestrippt, mit 1 % BSA geblockt (8h, 4°C) und mit polyklonalem Living Colors[®] A.v. Peptid Antikörper (über Nacht, 4 °C) gegen EGFP (109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen (C). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Durch diese Versuche stand eine stabil transfinzierte Zelllinie zur Verfügung, mit der nun die folgenden Experimente durchgeführt wurden, für den Aufbau und die Optimierung eines auf der intrazellulären Translokation der fluoreszierenden PKC- α basierenden Testsystems zur Charakterisierung des Ceramid-signaltransduktionsweges.

3.2 Optimierung der Testbedingungen zur Darstellung der Translokation des Targetproteins (PKC- α) an die Zellmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie und Western Blot

Zielsetzung und Problemstellung

Es ist bekannt, dass im Falle verschiedener Kinase-Isoformen die Translokation des Enzyms an die Zell- oder auch Kernmembran eine essentielle Voraussetzung für die Phosphorylierung der jeweiligen Zielsubstrate ist [130]. Die Translokation eines derart aktivierbaren Enzyms ist als ein Hinweis für seine Teilnahme an der Signaltransduktion anerkannt [131]. Für die Mehrheit der PKC-Isoformen, so auch für die PKC- α , wird die Translokation vom Zytoplasma zur Zellmembran [106] als Einleitung bzw. Widerspiegelung ihrer Aktivierung angesehen.

Als prinzipieller Nachweis sollte zuerst die Wirkung eines Phorbolesters auf das generierte PKC- α -EGFP Fusionsprotein untersucht werden. Phorbolster sind literaturbekannte stabile Analoga des DAG, dem physiologischen Aktivator der PKC. Phorbolster imitieren die aktivierende Wirkung des DAG auf die cPKC- und nPKC-Isoformen und führen zu einer Translokation der PKC vom Zytosol an die Membran [100, 132]. Eine solche Wirkung eines Phorbolesters auf ein PKC- α -GFP Fusionsprotein ist bereits beschrieben [128].

3.2.1 Welche Wirkung hat Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) auf das PKC- α -EGFP Fusionsprotein in HepG22aI Zellen?

Dafür wurden HepG22aI Zellen in 4-well Kulturplatten auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesät und für Inkubationszeiten von 10, 20, 30 und 75 Minuten mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in unterschiedlichen Konzentrationen von 3 μ M, 1,5 μ M, 750 nM, 325 nM und 160 nM behandelt. Nach der Fixierung der Zellen mit 2%iger Paraformaldehydlösung wurden die Deckgläschen einzeln durch Überführen auf Objektträger in jeweils einem Tropfen Dako[®] Fluorescent Mounting Medium für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop vorbereitet. Als Vergleich diente eine unbehandelte Probe als Kontrolle, die nur mit Kulturmedium behandelt wurde. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung am Axioplan-2 Mikroskop mit AxioCam der Firma Zeiss zeigte für die Konzentrationen 3 μ M, 1,5 μ M und 750 nM eine vollständige Translokation der fluoreszierenden PKC- α an die Zellmembran. Zusätzlich war bei diesen drei Konzentrationen

eine fokale Fluoreszenz in der Nähe des Zellkerns sichtbar (Abb. 7). Bei PMA Konzentrationen von 160 nM und 325 nM wurde keine vollständige Translokation zur Zellmembran festgestellt, das Enzym war diffus im Zytosol verteilt und es war keine Akkumulation der Fluoreszenz in Zellkernnähe erkennbar.

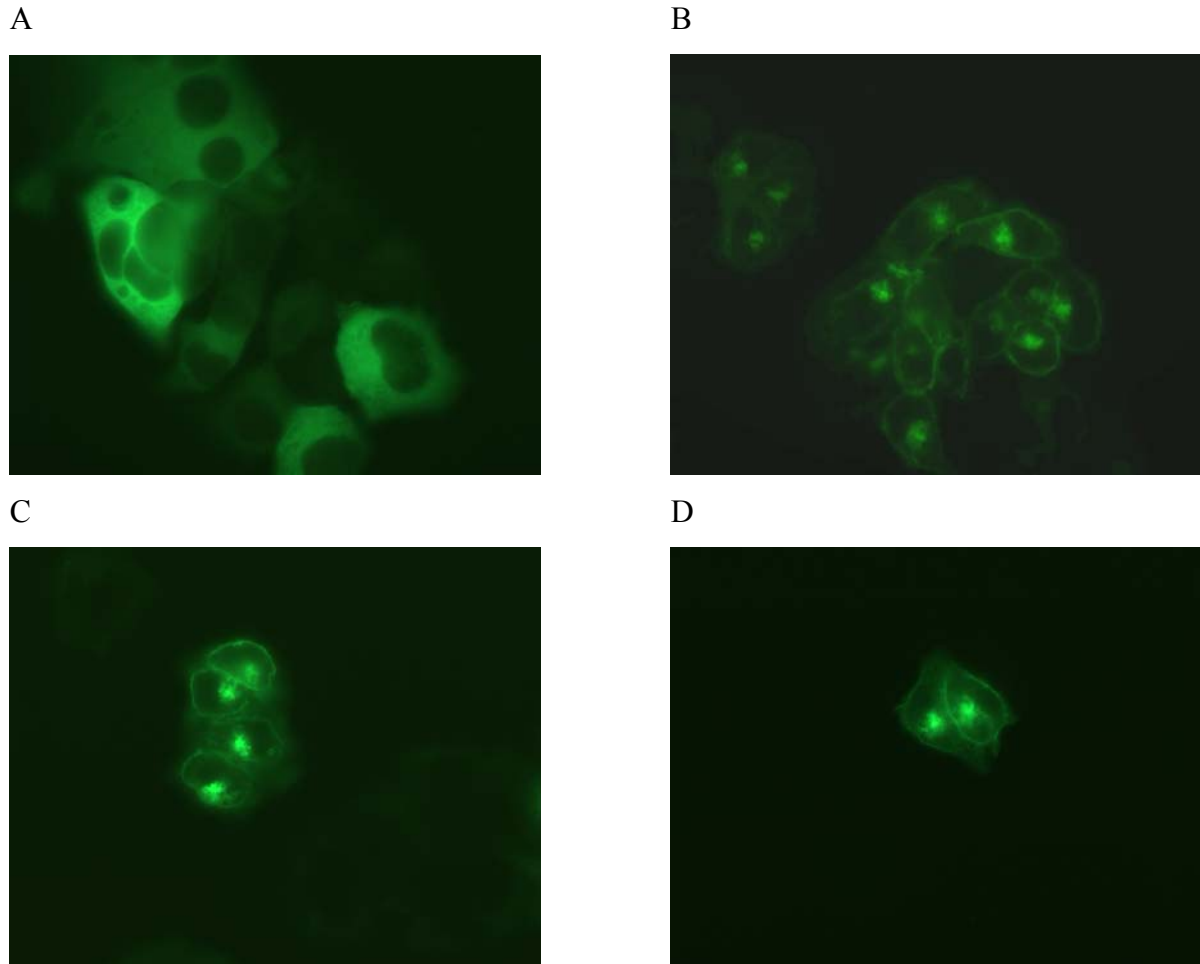


Abb.7 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Effekte des Phorbolesters auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (A) oder mit PMA in unterschiedlichen Konzentrationen von 3 μ M (B), 1,5 μ M (C) und 750 nM (D) für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei 630facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus mindestens vier voneinander unabhängigen Experimenten.

Um diese Ergebnisse mittels Western Blot zu bestätigen, wurden HepG22a1 Zellen in Petrischalen (\varnothing 35mm) ausgesät und nach der Inkubation mit PMA zur Gewinnung der Zelllysate in Lysepuffer resuspendiert. Nach Fraktionierung der Lysate in Zytosol- und Membranextrakt mittels Ultrazentrifugation wurden die Proteine in gleichen Proteinmengen auf einem SDS/Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet und mit Primärantikörper gegen PKC- α und entsprechendem Sekundärantikörper

inkubiert. Anschließend wurden die Banden mittels ECL-Methode visualisiert. Für PMA konnte sowohl konzentrationsabhängig (Abb. 8) als auch zeitabhängig (Abb. 9) eine eindeutige Konzentrationsverschiebung der PKC- α vom zytosolischen Extrakt zum Membranextrakt festgestellt werden.

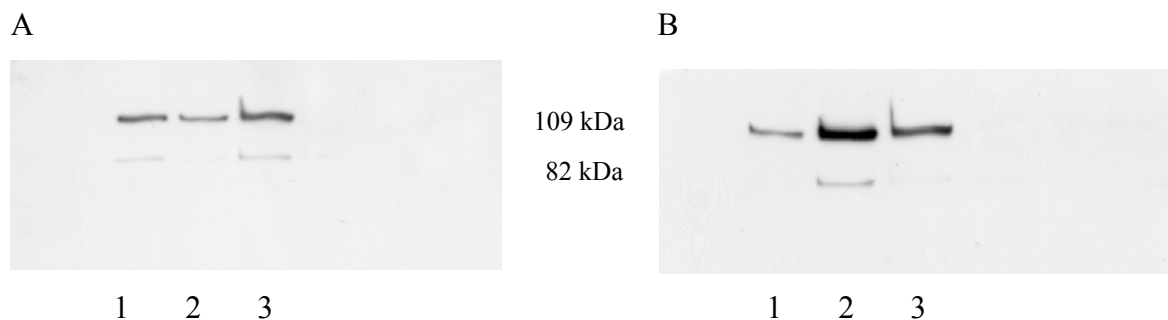


Abb.8 Western Blot. Effekte des Phorbolesters in unterschiedlicher Konzentration [1 μ M, 160nM] auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit PMA in Konzentrationen von 1 μ M (2) und 160 nM (3) für 30 min behandelt und zur Gewinnung der Zytosol- (A) und Membranextrakte (B) lysiert. Gleiche Mengen Protein (3 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Blotting der Proteine auf eine PVDF Membran und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4 $^{\circ}$ C) erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4 $^{\circ}$ C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT). Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen visualisiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

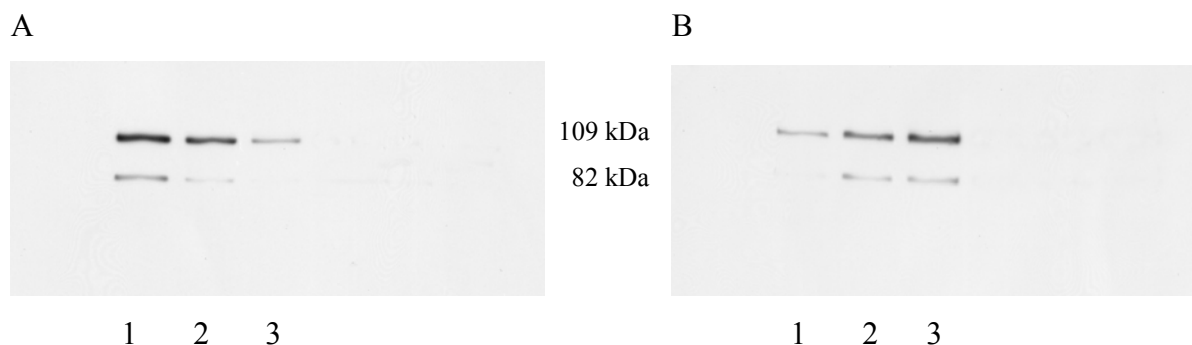


Abb.9 Western Blot. Effekte des Phorbolesters für unterschiedliche Inkubationszeiten (30min, 75min) auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit PMA [750nM] für 30 min (2) oder 75 min (3) behandelt und zur Gewinnung der Zytosol- (A) und Membranextrakte (B) lysiert. Immunoblot und Visualisierung der Banden erfolgte wie unter Abb. 8 beschrieben. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Einführung eines zusätzlichen Waschschriffs bei der Auftrennung der Zytosol- und Membranextrakte war erforderlich, da im primären Pellet, das nach der ersten Ultrazentrifugation und Abnahme des zytosolischen Überstands vorwiegend die Proteine der Membranfraktion enthalten sollte, eine relativ hohe verbleibende Proteinmenge zytosolischen

Ursprungs vorhanden war. Daher wurde das primäre Pellet nochmals mit Lysepuffer (ohne Triton X-100) resuspendiert und ultrazentrifugiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Zusatzes an Detergenz (Triton X-100) im Lysepuffer der Membranextrakt nach der dritten Ultrazentrifugation gewonnen. Der dabei resultierende Waschüberstand nach dem zweiten Ultrazentrifugationsschritt wurde in allen weiteren Versuchen verworfen, ist hier jedoch als „Waschextrakt“ (Abb. 10D) dargestellt. Zum Nachweis einer quantitativen Extraktion der Membranfraktion des gewaschenen Pellets, wird dieses einmalig nochmals mit tritonhaltigem Lysepuffer resuspendiert. Der gewonnene Zellüberstand ist als „Restextrakt“ in Abb. 10E dargestellt. Die geringe Signalintensität lässt auf eine annähernd vollständige Extraktion der Membranfraktion schließen.

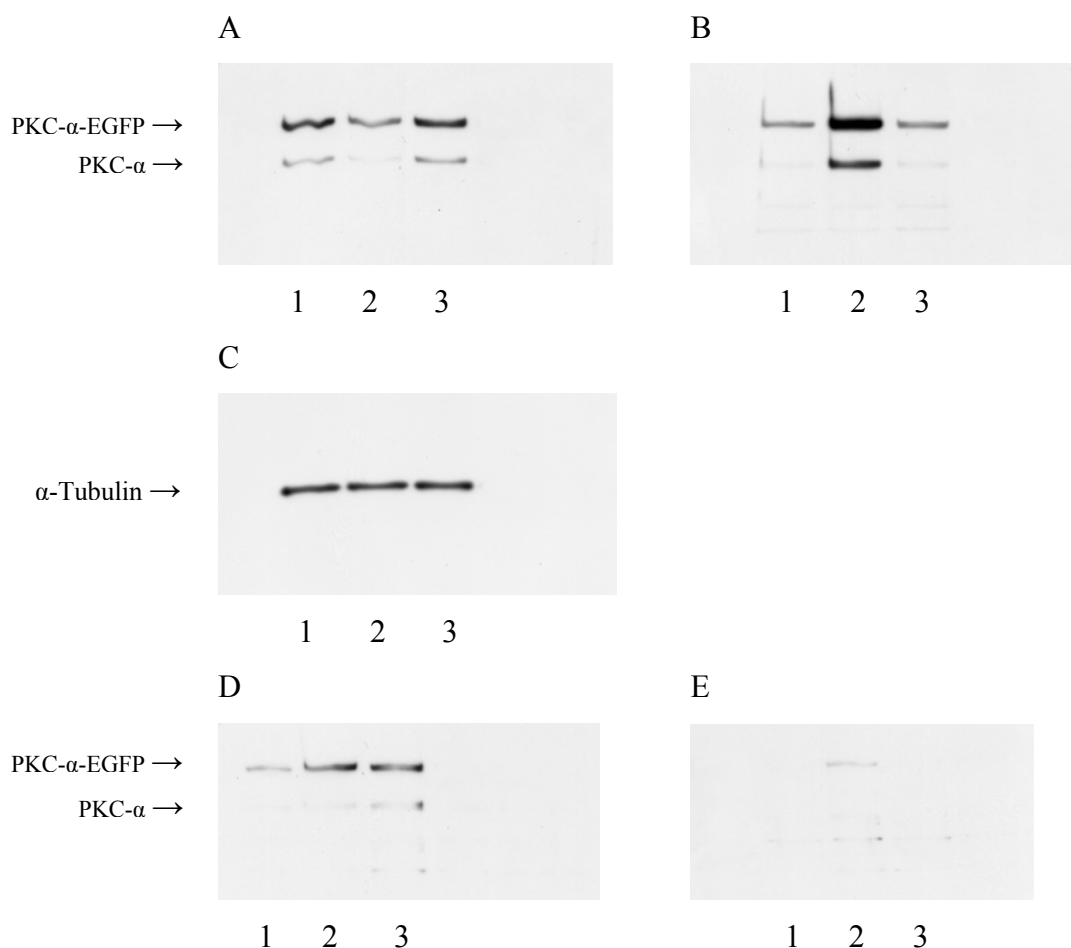


Abb.10 Western Blot. Darstellung der verbleibenden Proteinmengen im eingeführten Waschschritt und im resultierenden „Restpellet“. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit PMA [1 μ M] (2) oder 36N [20 μ M] (3) für je 30 min inkubiert und zur Gewinnung des zytosolischen Extrakts (A), des Membranextrakts (B), des Wasch- (D) und des Restextrakts (E) lysiert. Gleiche Mengen Protein (3 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf eine PVDF Membran und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C) erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4°C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT). Die Proteinbanden wurden mittels ECL-

Detektion auf entsprechenden Filmen visualisiert. Zum Nachweis quantitativ gleich aufgetragener Proteinmengen (C) wurde die Membran des zytosolischen Extrakts gestrippt, mit 1 % BSA geblockt (2h, RT) und mit monoklonalem Primärantikörper (2h, RT) gegen α -Tubulin (57 kDa) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte wie oben angegeben. 36N ist ein Analogon des Ceramids (siehe dazu Kapitel 3.4). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

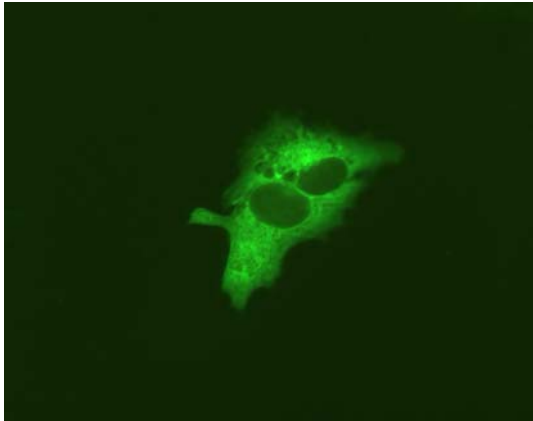
Mit diesen Versuchen waren optimierte Testbedingungen ausgearbeitet, um die Veränderung der subzellulären Lokalisation der PKC- α durch Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins an die Zellmembran mittels Fluoreszenzmikroskop und Western Blot sichtbar zu machen. Es war ein Testsystem etabliert, mit dem die Wirkungen verschiedener Stimuli auf die intrazelluläre Aktivierung der PKC- α unter Echtzeitbedingungen in lebenden Zellen untersucht werden konnten. Von besonderem Interesse war nun die unmittelbare Wirkung des Mediators Ceramid auf die PKC- α . Es sollte untersucht werden, welchen Effekt das zellpermeable C₆-Ceramid auf das PKC- α -EGFP Fusionsprotein ausübt. Die Frage war, ob C₆-Ceramid das PKC- α -EGFP Fusionsprotein direkt aktiviert und eine mikroskopisch sichtbare Translokation an die Zellmembran hervorruft, wie es bereits Huwiler und Kollegen [85] für C₁₆-Ceramid in einer Studie mit unfusionierter PKC- α in Mesangial-Zellen beschrieben. Im Falle einer positiven Bestätigung sollte diese Wirkung auf die PKC- α im nächsten Schritt mittels Western-Blot-Methode und Fraktionierung der Zellysate in Zytosol- und Membranextrakt analysiert werden.

3.2.2 Welche Wirkung hat C₆-Ceramid bzw. C₁₆-Ceramid auf das PKC- α -EGFP Fusionsprotein in HepG22aI Zellen?

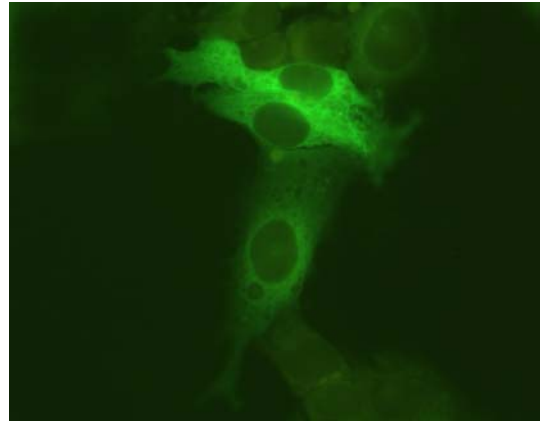
HepG22aI Zellen wurden in 4-well Kulturplatten auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesät und für unterschiedliche Inkubationszeiten von 10 Minuten bis 4 Stunden mit C₆-Ceramid oder C₁₆-Ceramid behandelt. Nach der Fixierung der Zellen mit 2%iger Paraformaldehydlösung wurden die Deckgläschen auf Objektträgern für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop vorbereitet. Als Kontrolle wurde eine Probe, die nur mit Kulturmedium behandelt wurde, angefertigt. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung ergab zwischen den Kontrollzellen und den mit C₆-Ceramid oder C₁₆-Ceramid behandelten Zellen zu keiner Inkubationszeit mikroskopisch sichtbare Unterschiede in der Zellverteilung der fluoreszierenden PKC- α (Abb. 11). Das Enzym war ebenso wie in der Kontrolle stets diffus im gesamten Zytosol verteilt, so dass geschlussfolgert werden kann, dass weder C₆-Ceramid noch C₁₆-Ceramid in der Lage sind, unter diesen Versuchsbedingungen eine

Aktivierung und damit eine Translokation des Enzyms an die Zellmembran zu verursachen. Diese Versuche wurden zum Ausschluss möglicher Interaktionen mit Serumlipidbestandteilen sowohl mit als auch ohne FCS-Zusatz (Fetales Kälberserum) im Inkubationsmedium durchgeführt und zeigten vergleichbare Ergebnisse.

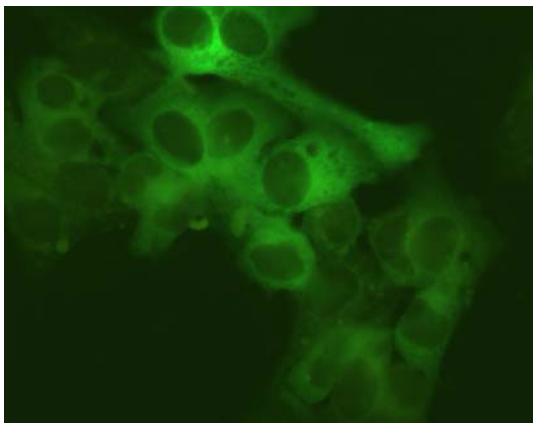
A



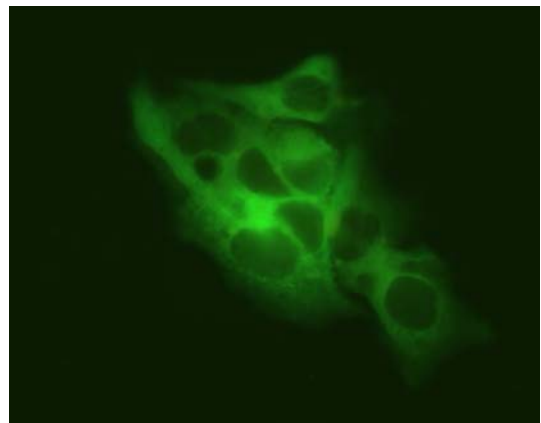
B



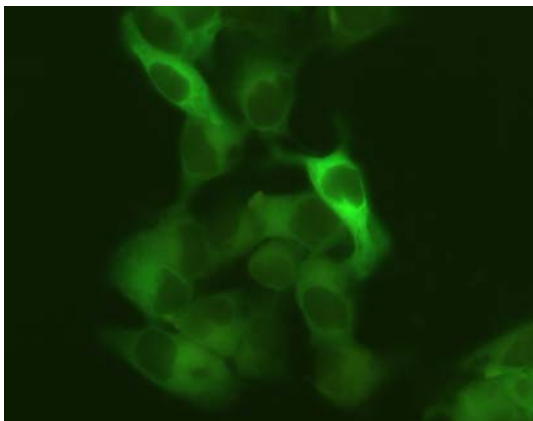
C



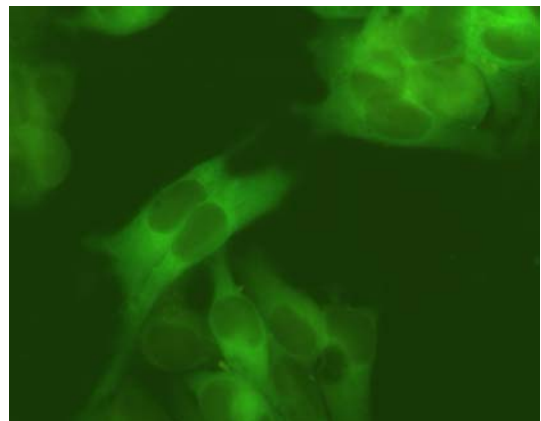
D



E



F



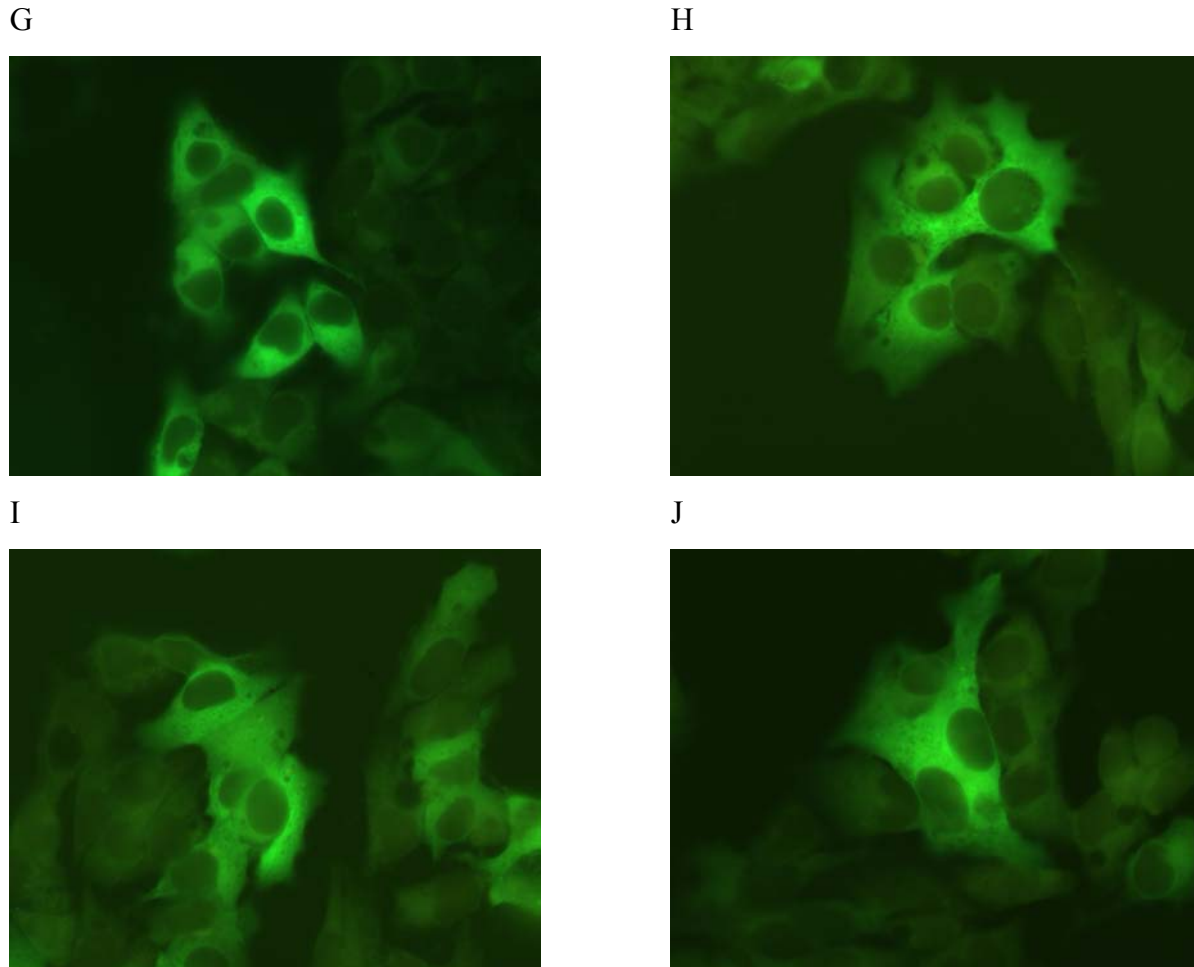


Abb.11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Effekte des C₁₆- und C₆-Ceramids auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (A, B) oder mit C₁₆-Ceramid [30 μ M] für 60 min (C) und 90 min (D) oder mit C₆-Ceramid [30 μ M] für 20 min (E), 30 min (F), 60 min (G), 2,5 h (H), 3 h (I) und 4 h (J) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei 630facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Zur Bestimmung der Zellverteilung der PKC- α auf Proteinebene mittels Western Blot wurden HepG22a1 Zellen in Petrischalen (\varnothing 35mm) ausgesät und nach der Inkubation mit C₆-Ceramid zur Gewinnung der Zelllysate in Lysepuffer resuspendiert. Nach Fraktionierung der Lysate in Zytosol- und Membranextrakt mittels Ultrazentrifugation wurden die Proteine in gleichen Proteinmengen zur elektrophoretischen Trennung auf ein SDS/Polyacrylamid-Gel aufgetragen, um sie auf eine PVDF Membran zu blotten. Nach Inkubation der Membranen mit Primärantikörper gegen PKC- α und entsprechendem Sekundärantikörper konnte nach Visualisierung der spezifischen Banden mit der ECL-Methode kein Intensitätsunterschied zwischen der Kontrolle und den mit C₆-Ceramid behandelten Lysaten festgestellt werden (Abb. 12).

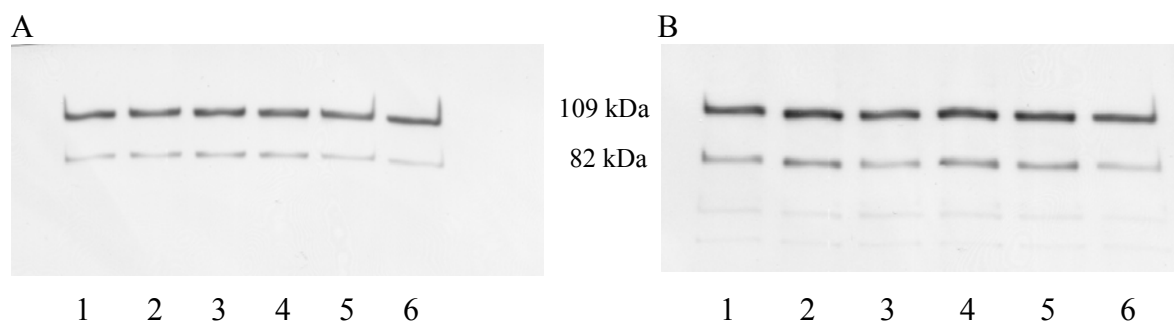


Abb.12 Western Blot. Effekte des C₆-Ceramids auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit C₆-Ceramid [30 μ M] für 10 min (2), 20 min (3), 30 min (4), 60 min (5) und 90 min (6) inkubiert und zur Gewinnung der Zytosol- (A) und Membranextrakte (B) lysiert. Gleiche Mengen Protein (3 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf eine PVDF Membran und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C) erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4°C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT). Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen visualisiert. Dargestellt ist je ein repräsentativer Blot aus mindestens vier voneinander unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse belegen, dass für die gewählten Versuchsbedingungen weder C₆-Ceramid noch C₁₆-Ceramid das PKC- α -EGFP Fusionsprotein direkt aktivieren noch eine mikroskopisch sichtbare Translokation an die Zellmembran hervorrufen. Der unmittelbare Effekt des Ceramids auf die Phosphotransferasenaktivität und die Lokalisation der Kinase war folglich noch unklar, obwohl ein direkter Effekt des Ceramids auf die PKC mittels anderer Methoden nachgewiesen oder lediglich postuliert wurde [85, 86, 133].

3.3 Ausarbeitung eines Assaysystems zur Charakterisierung von Ceramid-effekten auf die PKC- α Translokation

Zielsetzung und Problemstellung

Eine Aktivierung der PKC- α durch Ceramid auf direktem Wege, wie es Huwiler et al. [85] beschreiben, konnte unter den gewählten Testbedingungen (vgl. Ergebnisse 3.2.2) nicht nachgewiesen werden. Die Rolle von Proteinkinasen als Zielproteine des Lipidmediators Ceramid ist jedoch unbestritten [73, 74, 75, 86]. Die in der Literatur kontrovers diskutierte Beziehung zwischen dem Lipidmediator und seinem Effektorprotein PKC- α sollte nun näher charakterisiert werden, da eine direkte Aktivierung nicht bestätigt werden konnte. Liegt eine indirekte, aktivierende Wirkung vor, bei der noch andere biofunktionelle Prozesse beteiligt sind oder hat C₆-Ceramid vielmehr eine inhibierende Wirkung auf die PKC- α , wie es von

anderen Autoren angenommen wird? So berichteten Lee und Kollegen in einer Studie von 1996 und 2000, dass eine Behandlung mit C₆-Ceramid zu einer Dephosphorylierung und Inaktivierung der PKC- α führt. Sie führten dies auf eine Aktivierung der Ceramid-aktivierten Proteinphosphatasen (CAPP vgl. Einleitung 1.1.4) zurück, die in einer Dephosphorylierung der PKC resultieren [134, 131]. Zudem berichteten Luberto und Kollegen, dass exogen zugesetzte bakterielle SMase (bSMase) in der Lage ist, eine bekannte Phorbolsterwirkung, in diesem Fall die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Zellkern, zu verhindern [135]. Diese PMA Aktivierung von NF- κ B erfolgt, wie von einigen Autoren gezeigt, über eine direkte Aktivierung der cPKC und / oder nPKC [136, 137, 138]. Da Phorbolster wie PMA eindeutige Aktivatoren der PKC sind und die bSMase, die zu einer endogenen Generierung von Ceramid führt, in der Lage war, eine Phorbolsterwirkung zu hemmen, stellte sich uns die Frage, ob diese Inhibierung auf die Wirkung des endogen generierten Ceramids zurückgeht. Dies könnte bedeuten, dass Ceramid einen inhibitorischen Effekt auf sein Targetprotein PKC- α ausübt und daher in der Lage ist, eine über die PKC vermittelte Phorbolsterwirkung zu hemmen. Um dies zu testen, wurden die Zellen im bereits entwickelten *in-vivo* Testsystem mit einer Kombination aus PMA und C₆-Ceramid inkubiert.

Dazu wurden HepG22aI Zellen in 4-well Kulturplatten auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesät und mit PMA in verschiedenen Konzentrationen in Kombination mit C₆-Ceramid inkubiert. C₆-Ceramid wurde ohne Mediumwechsel für jeweils 45 min vor oder nach der PMA Inkubation auf die Zellen gegeben. Die dabei in den Zellen ablaufenden Prozesse wurden wieder mit 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Deckgläschen wie oben für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop vorbereitet. Die Auswertung am Mikroskop ergab einen deutlich nachweisbaren Unterschied in der Fluoreszenz für die Zellprobe, die mit PMA [750nM] für 30 min und einer nachfolgenden Inkubation mit C₆-Ceramid [30 μ M] für 45 min behandelt wurde, im Vergleich zur Probe, die nur mit PMA [750nM] für 75 min inkubiert worden war. Die für PMA allein verursachte vollständige Translokation der fluoreszierenden PKC- α an die Zellmembran und die beobachtete Ansammlung des Enzyms in Zellkernnähe war für die Kombination von PMA und C₆-Ceramid nicht mehr gegeben. Das Enzym war sichtbar von der Zellmembran zurück ins Zytosol transloziert und die starke, fokale Akkumulation der Fluoreszenz in Zellkernnähe war nicht mehr sichtbar (Abb. 13). C₆-Ceramid führt damit unter diesen Versuchsbedingungen zu einer reversen Translokation seines zuvor durch PMA aktivierten Targetproteins. Ceramid ist nach diesen Ergebnissen scheinbar in der Lage, die über die PKC vermittelten PMA

Wirkungen zu verhindern. Dies ist konform mit den von Lee et al. [131] postulierten Ergebnissen, dass C₆-Ceramid zu einer Dephosphorylierung und Inaktivierung der PKC- α führt. Dieses Phänomen der reversen Translokation war für die höheren PMA Konzentrationen von 1,5 μ M und 3 μ M mikroskopisch nicht eindeutig bzw. überhaupt nicht mehr festzustellen. Die umgekehrte Behandlung der Zellen zuerst mit C₆-Ceramid für 45 min und anschließender Inkubation mit PMA für 30 min ergab für jede der eingesetzten PMA Konzentrationen keinen optisch sichtbaren Unterschied in der Verteilung der PKC- α im Vergleich zu den Zellen, die nur mit PMA für 30 min behandelt worden waren. Dies lässt darauf schließen, dass C₆-Ceramid die PKC-Translokation nicht verhindert, sondern vielmehr zu einer Verdrängung des Enzyms von der Membran führt, wenn es nach der Aktivierung durch PMA zugesetzt wird.

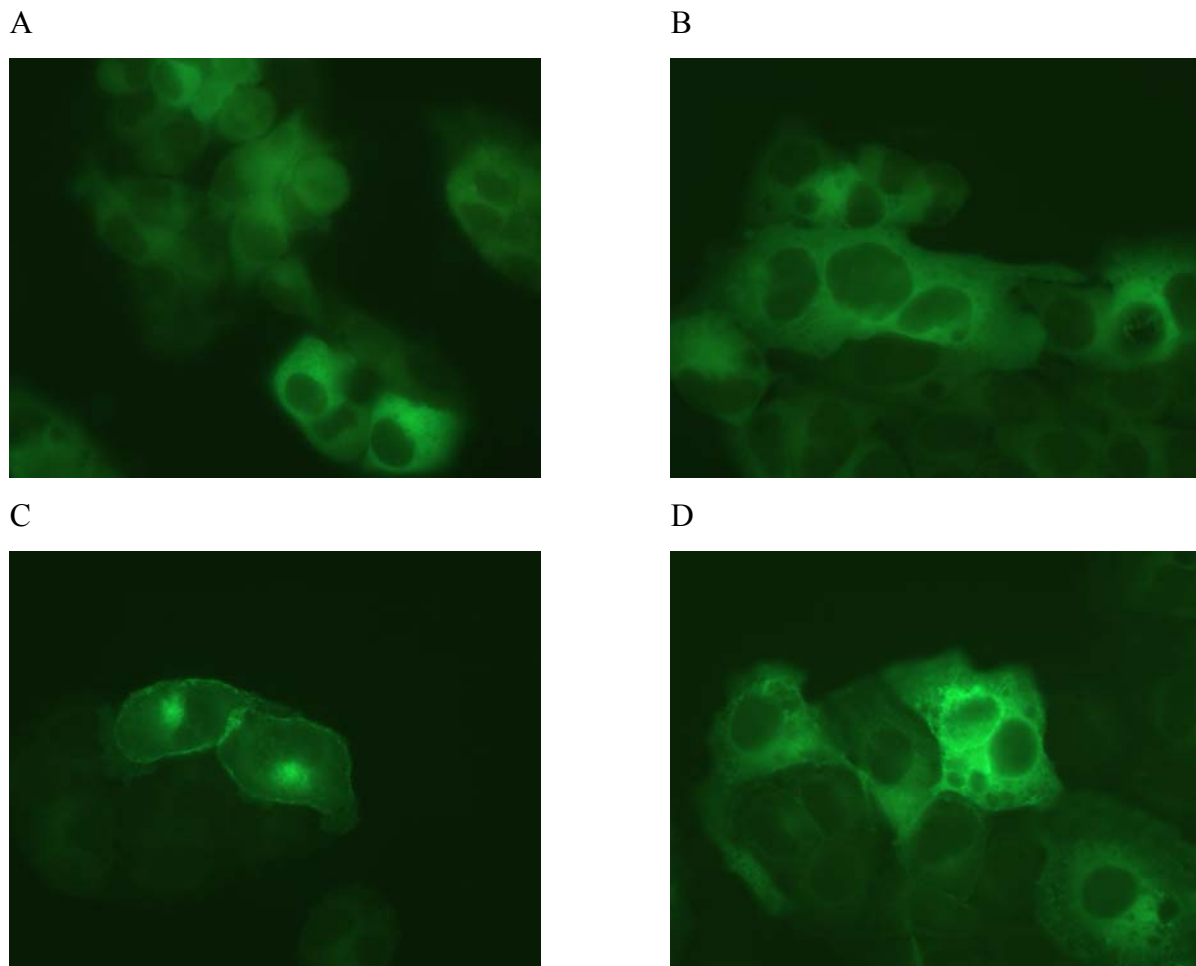


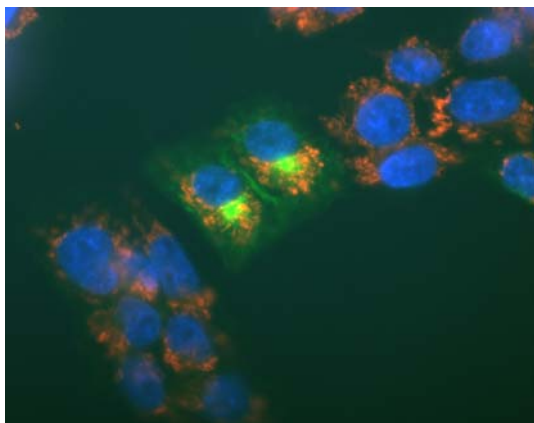
Abb.13 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Effekte des C₆-Ceramids in Kombination mit PMA auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG2a1 Zellen wurden entweder ohne (A) oder mit C₆-Ceramid [30 μ M] für 30 min (B), mit PMA [750 nM] für 75 min (C) oder mit PMA [750 nM] für 30 min + C₆-Ceramid [30 μ M] für 45 min (D) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei einer 630fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop

fotografiert. Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus vier voneinander unabhängigen Experimenten.

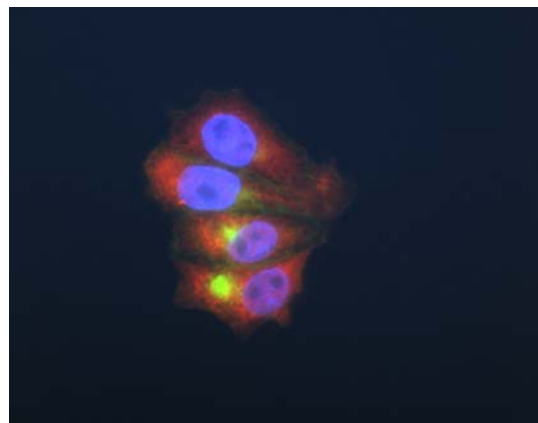
Da dieses Phänomen der reversen Translokation in mit PMA aktivierten Zellen insbesondere am Auftreten einer fokalen Fluoreszenz in Zellkernnähe eindeutig sichtbar wurde, die bei gleichzeitiger Inkubation mit Ceramid nicht mehr vorhanden war, sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, in welchem Kompartiment der transfizierten HepG2 Zelllinie diese Akkumulation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins stattfindet.

Dazu wurden mit PMA für 30 min stimulierte und anschließend fixierte Zellen durch Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton-X-100-Lösung für die folgende Immunocytochemie vorbereitet. Es wurden vier verschiedene Primärantikörper zur Anfärbung der Mitochondrien, der Peroxisomen, des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats eingesetzt, die alle mit Hilfe eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht werden konnten (Abb. 14). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 Farbstoff gefärbt. Die Einfach- und Dreifachfluoreszenzbilder zeigen eine Überlagerung der Rot- und Grünfluoreszenz bei den Zellen, die mit Antikörpern gegen Mikrosomen (Abb. 14D1 - D4) angefärbt worden waren, was auf eine Ansammlung des PKC- α -EGFP Fusionsproteins im Endoplasmatischen Retikulum hindeutet. Dies ist konform mit Untersuchungen von Goodnight und Kollegen [106].

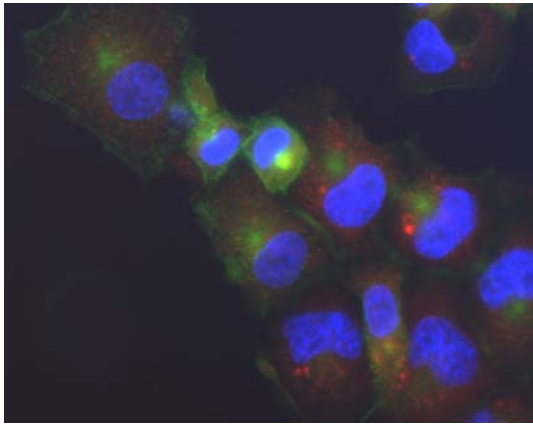
A



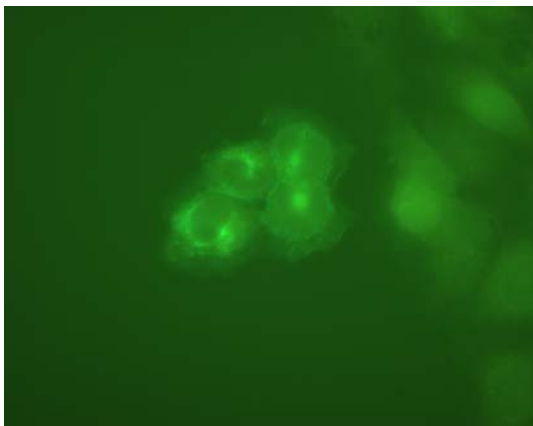
B



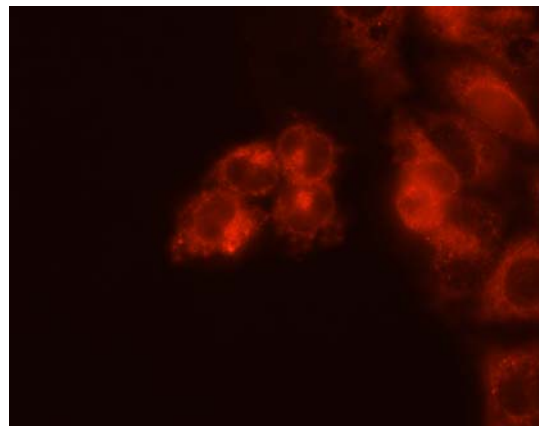
C



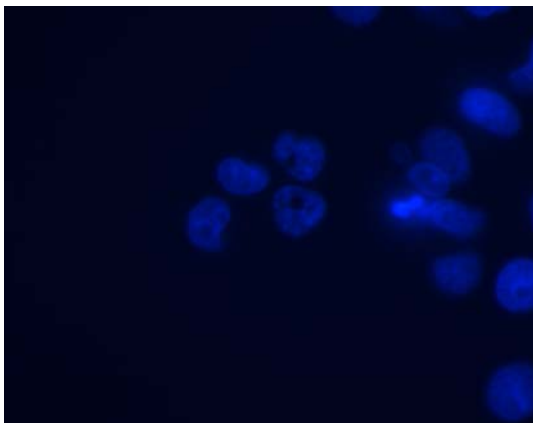
D1



D2



D3



D4

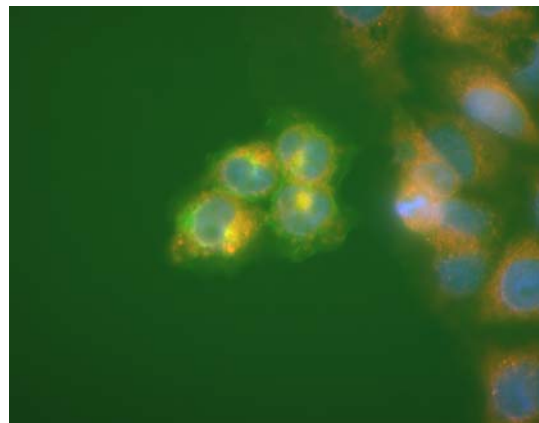


Abb.14 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Kompartimentierung der PKC- α im Endoplasmatischen Retikulum nach PMA-induzierter Translokation. HepG22a1 Zellen wurden nach Stimulation mit PMA [750nM oder 1,5 μ M für 30min] mit 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert (20min, RT) und mittels 0,2%iger Triton-X-100-Lösung (10min, RT) für die nachfolgende Antikörperbehandlung permeabilisiert. Nach Inkubation mit Primärantikörpern (30min, RT) zur Anfärbung der Mitochondrien (A), der Peroxisomen (B), des Golgi-Apparats (C) oder des Endoplasmatischen Retikulums (D1-D4) und Inkubation mit entsprechenden Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern (30min, RT) wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 Farbstoff (5min, RT) blau angefärbt und die Zellproben mit Dako[®] Fluorescent Mounting Medium auf Objektträgern zum Fotografieren vorbereitet. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 630fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop. Abbildungen A, B, C und D4 zeigen übereinandergelegte Dreifachfluoreszenz, Abbildungen D1, D2 und D3 zeigen Einfachfluoreszenz: FITC-Fiter (D1), Cy3-

Filter (D2), DAPI-Filter (D3). Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Mit diesen Versuchen war ein direkter Effekt des C₆-Ceramids auf sein vermutetes Targetprotein insoweit abgesichert, dass C₆-Ceramid nicht wie ursprünglich vermutet eine direkte, aktivierende Wirkung auf die PKC- α aufweist, sondern vielmehr zu einer Deaktivierung einer bereits aktivierten und membranständigen PKC- α und dadurch zu einer Rückkehr dieses Enzyms von seinem membrangebundenen Zustand ins Zytosol führt.

Zudem war ein *in-vivo* Testsystem erfolgreich etabliert worden, das nicht nur zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Stimulanzen auf die Translokation der phosphorylierenden PKC- α Isoform eingesetzt werden konnte, sondern durch die erreichte Visualisierung der Ceramidwirkung auf die PKC- α auch die Testung von potentiellen Ceramidanaloga ermöglichte.

3.4 Charakterisierung von potentiellen Ceramidanaloga

Zielsetzung und Problemstellung

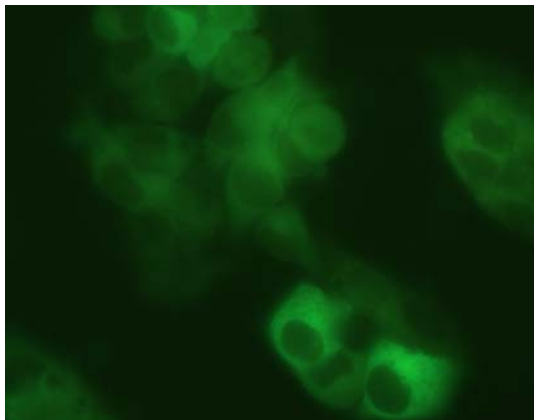
Mit den bisher gewonnenen Ergebnissen konnte nun im entwickelten Testsystem die Wirkung potentieller Ceramidanaloga untersucht werden. Durch Testung unterschiedlicher, konformations-definierter Ceramidanaloga sollten dabei neue Kenntnisse über die noch nicht bekannten, biologisch aktiven Konformationen des flexiblen Lipids erhalten werden. Daher sollten einige ausgewählte Analoga in diesem zellulären Modell getestet und die mikroskopischen Ergebnisse mittels Western Blots verifiziert werden. Außerdem war die Frage zu klären, ob die im Testsystem eingesetzten Analoga auch andere Ceramid-medierte Wirkungen auf die Zellantwort induzieren können. Als unabhängige Vergleichsmethode wurden dazu konventionelle Methoden, wie z. B. die Bestimmung der Apoptoseinduktion eingesetzt.

Die im Rahmen der dargestellten Untersuchungen eingesetzten Analoga wurden im Zusammenhang einer bereits abgeschlossenen Dissertation mit präparativ-synthetischem Schwerpunkt am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg hergestellt [139].

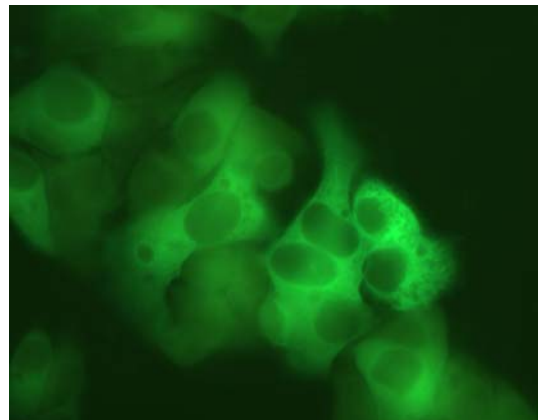
3.4.1 Untersuchung potentieller Ceramidanaloga im *in-vivo* Testsystem sowie mittels Western Blots

Zur Testung einiger ausgewählter Analoga wurden HepG22aI Zellen auf Deckgläschen ausgesät und sequentiell mit PMA (Vorinkubation [750nM, 30min]) und anschließend mit verschiedenen Ceramidanaloga [20 μ M, 45min], wie im Kapitel 3.3 für C₆-Ceramid dargestellt, inkubiert. Nach der Fixierung mit 2%iger Paraformaldehydlösung und Beurteilung der PKC- α Verteilung in der Zelle am Fluoreszenzmikroskop ergaben sich folgende Ergebnisse: Von den eingesetzten Analoga wiesen die Substanzen 36N und 39N (Strukturformeln siehe Diskussion 5.2.3 Abb. 34) C₆-Ceramid-analoge Wirkungen auf, wobei die durch PMA induzierte initiale Translokation der PKC- α aufgehoben und eine diffuse zytosolische Verteilung nachgewiesen werden konnte. Zudem war in den mit beiden Analoga behandelten Zellen die starke fokale Akkumulation der fluoreszierenden PKC- α in Zellkernnähe nicht mehr zu beobachten (Abb. 15). Diese Auslösung der reversen Translokation war für die beiden Analoga dosisabhängig und für eine Konzentration von 2 μ M nicht, für eine Konzentration von 20 μ M dagegen eindeutig sichtbar. Die ebenfalls getesteten Analoga 40N als Diastereomerenmischung und die Diastereomere 40SS und 40SR (Strukturformeln siehe Diskussion 5.2.3 Abb. 34) zeigten im Testsystem keine Deaktivierung der PKC- α . Das markierte Protein behielt seine durch PMA induzierte Lokalisation an der Zellmembran bzw. seine fokale Akkumulation in Zellkernnähe. Als Negativkontrolle wurde eine Inkubation der Zellen mit den Analoga ohne PMA durchgeführt. Dies ergab für alle Substanzen eine diffuse Verteilung der PKC- α im Zytosol, was vergleichbar war mit der unbehandelte Kontrolle, die lediglich mit Inkubationsmedium behandelt worden war, und der mit C₆-Ceramid behandelten Probe.

A



B



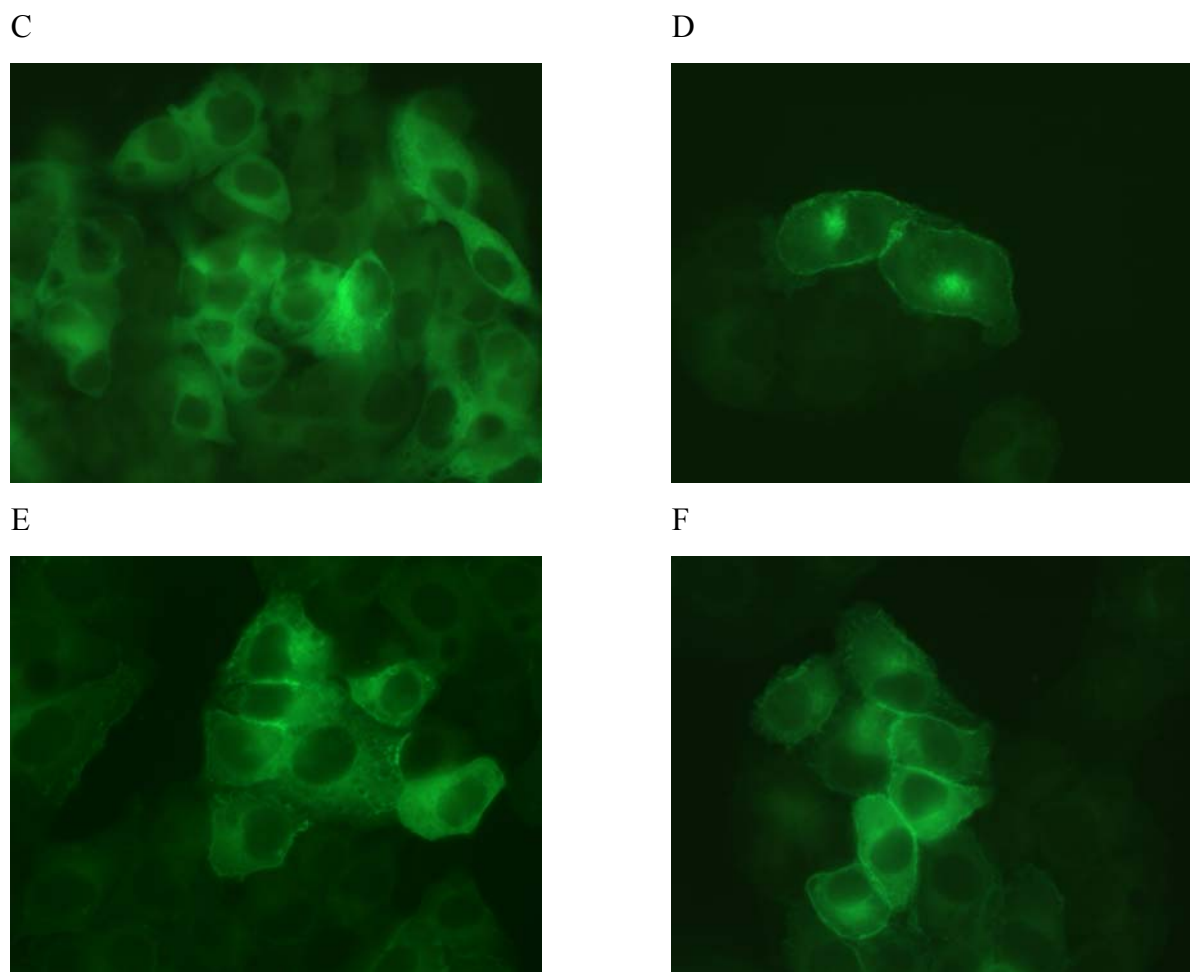


Abb.15 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Effekte der Ceramidanaloga 36N und 39N in Kombination mit PMA auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22aI Zellen wurden entweder ohne (A) oder mit 36N [20 μ M] für 30 min (B), mit 39N [20 μ M] für 30 min (C), mit PMA [750nM] für 75 min (D), mit PMA [750nM] für 30 min + 36N [20 μ M] für 45 min (E) oder mit PMA [750nM] für 30 min + 39N [20 μ M] für 45 min (F) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei einer 630fachen Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

Diese mittels Fluoreszenzmikroskopie erhaltenen Ergebnisse wurden immunochemisch bestätigt, indem HepG22aI Zellen in Petrischalen (\varnothing 35mm) ausgesät und nach Vorinkubation mit PMA [750nM, 30min] entweder mit C₆-Ceramid [30 μ M] oder den Analoga 36N, 39N und 40N [je 20 μ M] für 45 min inkubiert wurden. Als Vergleich wurden Zellproben mit PMA, C₆-Ceramid oder purem Inkubationsmedium mitangefertigt. Die Zelllysateproteine wurden nach der in Kapitel 3.2.1 bereits beschriebenen Methode zur Gewinnung der fraktionierten Zelllysate erhalten, nach der ebenfalls dort erwähnten Methode elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Primärantikörper gegen PKC- α und der ECL-Methode sichtbar gemacht. Beide Extrakte zeigen, dass die zusätzliche Inkubation der Zellen mit 36N und 39N analog zu C₆-Ceramid zu einer Abnahme der membrangebundenen PKC- α

im Membranextrakt und gleichzeitig zu einer Zunahme der Proteinmenge im zytosolischen Extrakt führt (Abb. 16). Für die Substanzen 40N, 40SS und 40SR war keine Deaktivierung der PKC- α festzustellen. Beide Ergebnisse bestätigen die zuvor am Fluoreszenzmikroskop erhobenen Befunde.

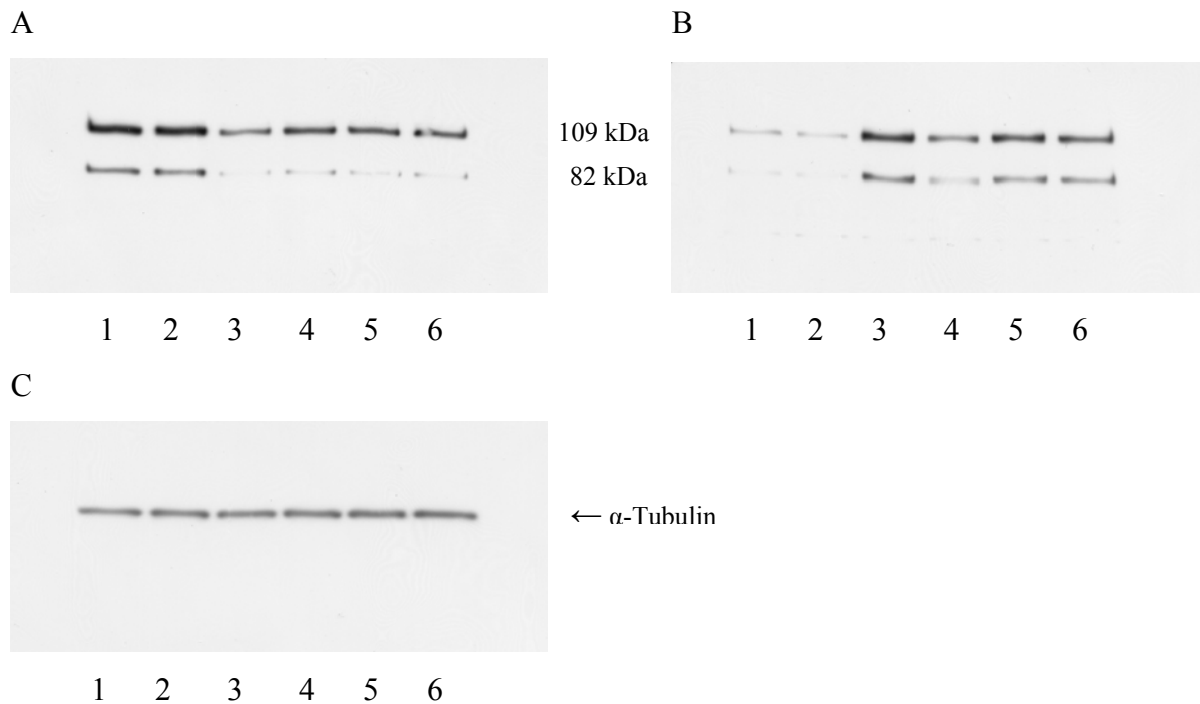


Abb.16 Western Blot. Effekte des C₆-Ceramids und der Analoga 36N und 39N in Kombination mit PMA auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit C₆-Ceramid [30 μ M, 45min] (2), PMA [750nM, 75min] (3), PMA [750nM, 30min] + C₆-Ceramid [30 μ M, 45min] (4), PMA [750nM, 30min] + 36N [20 μ M, 45min] (5), PMA [750nM, 30min] + 39N [20 μ M, 45min] (6) inkubiert und zur Gewinnung der Zytosol- (A) und Membranextrakte (B) lysiert. Gleiche Mengen Protein (3 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Blotting der Proteine auf eine PVDF Membran und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C) erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4°C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT). Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen visualisiert. Zum Nachweis quantitativ gleich aufgetragener Proteinmengen (C) wurde die Membran des zytosolischen Extrakts gestrippt, mit 1 % BSA geblockt (2h, RT) und mit monoklonalem Primärantikörper (2h, RT) gegen α -Tubulin (57 kDa) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte wie oben angegeben. Dargestellt ist je ein repräsentativer Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse für die Membranfraktionen der voneinander unabhängigen Experimente wurden densitometrisch ausgewertet und als Diagramm in Abb. 17 dargestellt.

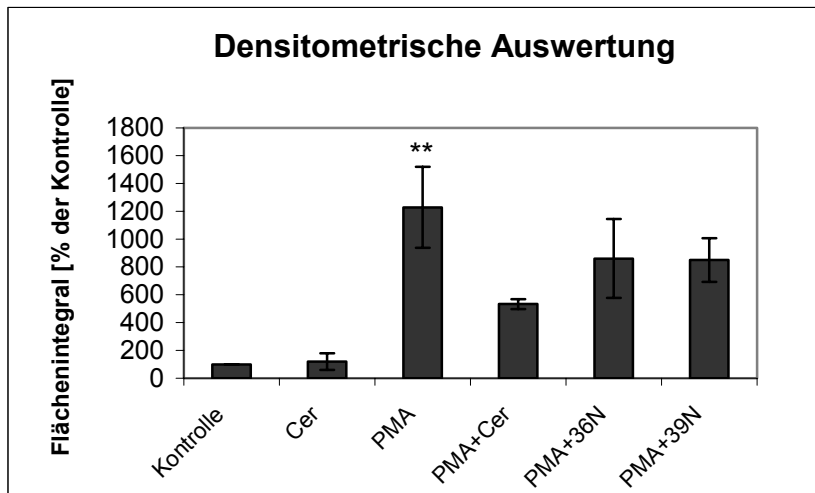


Abb.17 Densitometrische Auswertung. Die spezifischen Bandenstärken für die Membranextrakte (Abb. 16B) der voneinander unabhängigen Experimente wurden densitometrisch vermessen und als Diagramm dargestellt. Das absolute Flächenintegral der Kontrolle wurde 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Statistische Signifikanz: **, $p < 0,02$ vs. Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney U Rank Sum W Test. Die densitometrische Messung erfolgte mittels eines Bildscanners von Biorad und AIDA Software. Cer, C₆-Ceramid; PMA, Phorbol-12-myristat-13-acetat; 36N und 39N sind Ceramidanaloga.

3.4.2 Untersuchung potentieller Ceramidanaloga auf Apoptoseinduktion

Zur Untersuchung auf Apoptoseinduktion wurden Makrophagen (MΦ) mit C₆-Ceramid [30μM] und den Ceramidanaloga 36N, 39N, 40N, 40SS und 40SR [je 20μM] für 4 h inkubiert. Anschließend wurden die mit YO-PRO-1 detektierten apoptotischen Zellen im Verhältnis zu den mit Hoechst 33342 Farbstoff angefärbten Zellkernen mittels computerunterstützter Morphometrie am Inversfluoreszenzmikroskop quantifiziert [26]. Die Auszählung und Angabe der Apoptoserate in Prozent ergab für C₆-Ceramid eine gesteigerte absolute Apoptoserate von 11,8 % (entspr. 175 %, Apoptoserate der Kontrolle 100 % gesetzt) im Vergleich zur Kontrolle mit einer spontanen Apoptoserate von 6,6 % (entspr. 100 %). Von den getesteten Analoga zeigten 36N mit 12,2 % (entspr. 183 %) und 39N mit 20,8 % (entspr. 327 %) eine noch ausgeprägtere Apoptoseinduktion als C₆-Ceramid. Die Analoga 40N und 40SR dagegen ergaben mit 7,9 % (entspr. 153 %) bzw. 7,1 % (entspr. 142 %) eine Apoptoserate, die unterhalb der des C₆-Ceramids lag, während 40SS mit 6,5 % (entspr. 135 %) zu keiner signifikant erhöhten Apoptoserate gegenüber der Kontrolle führte (Abb. 18).

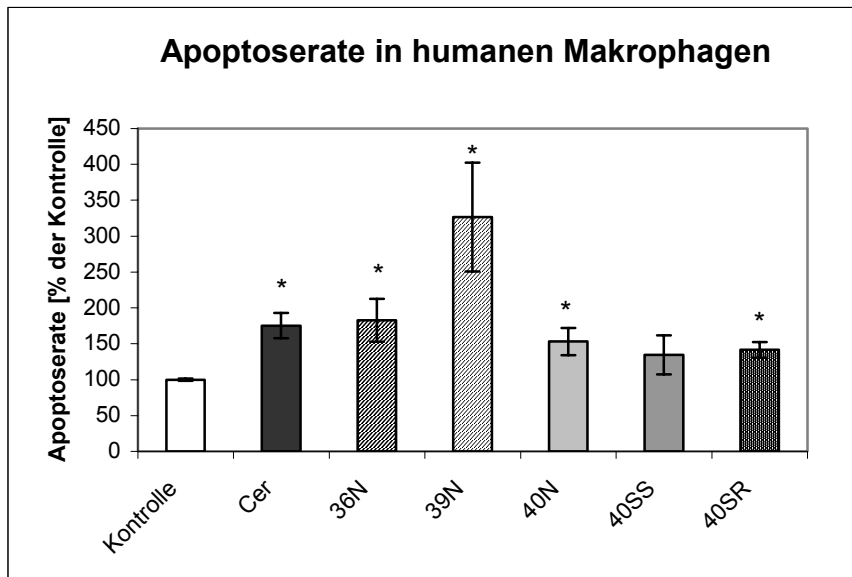


Abb.18 Apoptoserate verschiedener Ceramidanaloga in humanen Makrophagen. M Φ ($2,5 \times 10^5$) wurden mit Medium (Kontrolle), C₆-Ceramid [30 μ M], 36N, 39N, 40N, 40SS, 40SR [je 20 μ M] für 4 h bei 37 °C inkubiert und die Apoptoserate durch Auszählung der apoptotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl nach Anfärben mit YO-PRO-1 und Hoechst 33342 Farbstoff in % der Kontrolle angegeben. Die absolute Apoptoserate der Kontrolle 6,6 % \pm 1,6 wurde als 100 % gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten jeweils durchgeführt als Dreifachbestimmung. Statistische Signifikanz: *, p < 0,05 vs. Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney U Rank Sum W Test. Cer, C₆-Ceramid.

Zur Bestätigung der Untersuchung auf Apoptoseinduktion wurden zudem Western-Blot-Experimente durchgeführt. Dafür wurden M Φ mit C₆-Ceramid [20 μ M], Dihydroceramid [2 μ M], 39N [2 μ M] und Alsterpaullon [2 μ M] behandelt und nach 4 h die Apoptoserate gemessen. Nach Gewinnung der Zellextrakte wurden die Proteine elektrophoretisch getrennt, auf eine PVDF Membran gebロットet und nach Behandlung mit Primärantikörper gegen PARP und Verwendung der ECL-Detektionmethode visualisiert. Alsterpaullon (eine Positivkontrolle), C₆-Ceramid und 39N zeigten eine eindeutig starke Bande bei 85 kDa, die dem Molekulargewicht des PARP-Fragments entspricht. Dihydroceramid dagegen, eine biologisch inaktive Form des Ceramids, dem die (C4)-(C5) Doppelbindung (siehe Diskussion 5.2.3 Abb. 35) fehlt und bekanntermaßen nicht in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Sie zeigte eine nur ganz schwache Bande bei 85 kDa und eine daher entsprechend starke Bande bei 116 kDa, die dem Molekulargewicht der intakten nicht durch Apoptoseprozesse gespaltenen PARP entspricht (Abb. 19).

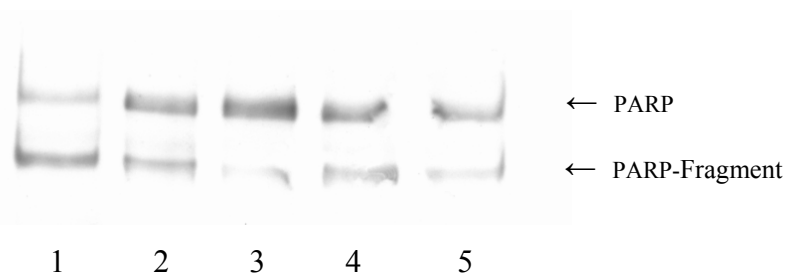


Abb.19 Western Blot. Effekt des C₆-Ceramids und des Analogons 39N auf die Spaltung von PARP in humanen Makrophagen. MΦ (2x10⁶) wurden mit Alsterpaullon [2µM] (1), 39N [2µM] (2), Dihydroceramid [2µM] (3), C₆-Ceramid [20µM] (4) oder mit Medium (Kontrolle) (5) für 4 h bei 37 °C inkubiert und zur Gewinnung des zytosolischen Extrakts lysiert. Gleiche Mengen Protein (10µg) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF Membran geblottet und die unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C) geblockt. Nach Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper gegen PARP (116 kDa) und dessen Fragment (85 kDa) (über Nacht, 4°C) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Mit diesen Untersuchungen konnten zwei Substanzen (36N, 39N) als Ceramidanaloga charakterisiert werden, die den Wirkungen des Ceramids in Bezug auf sein Targetprotein PKC- α als auch in Bezug auf die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, entsprachen.

3.5 Charakterisierung von Inhibitoren der intrazellulären Ceramidgenerierung

Zielsetzung und Problemstellung

Das in Kapitel 3.2 und 3.3 entwickelte und optimierte zelluläre Testmodell zur Abschätzung der Modulationen des intrazellulären Ceramidstoffwechsels diente nicht nur dem Ziel, die Ceramidwirkungen auf die intrazellulären Signaltransduktionswege optisch zu verfolgen und potentielle Ceramidanaloga zu charakterisieren, sondern sollte auch die Untersuchung potentieller Inhibitoren der Ceramidgenerierung ermöglichen: Die Ausschaltung der intrazellulären Ceramidentstehung durch einen zu testenden Inhibitor konnte durch die fehlende Wirkung auf die PKC- α mit Hilfe des fluoreszierenden PKC- α -EGFP Fusionsproteins optisch sichtbar gemacht werden. In diesem Zusammenhang sollte die biologische Aktivität eines potentiellen Sphingomyelinase-Inhibitors unter Anwendung verschiedener Testmodelle bewertet werden. Dabei standen folgende Fragen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses:

- Wirkt der potentielle Inhibitor zytotoxisch auf humane Zellen?

- Welchen Einfluss hat der Inhibitor auf die endogene Ceramidgenerierung?
- Wirkt er durch Erniedrigung des Ceramidlevels antiapoptotisch?
- Lässt sich für die zu testende Substanz eine inhibitorische Wirkung *in-vivo* nachweisen?
- Ist diese Wirkung spezifisch für die eukaryontische nSMase?
- Über welchen Hemmmechanismus wirkt der Inhibitor auf die nSMase?
- Ist die inhibitorische Wirkung im oben etablierten *in-vivo* Testmodell mikroskopisch sichtbar?
- Kann dies mittels Western Blots verifiziert werden?

Die zu testende Substanz wurde im Rahmen einer bereits abgeschlossenen Dissertation am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Universität Heidelberg synthetisiert und charakterisiert [54]. Sie stellt ein stabiles Derivat des Scyphostatins dar, einem niedermolekularen Inhibitor der nSMase, der von Nara und Kollegen [39] aus einem Pilzextrakt *Trichopeziza mollissima* vor einigen Jahren isoliert und als potentieller nSMase-Inhibitor näher charakterisiert wurde [52]. Im Folgenden wird sie als Scyphostatin-Analogon bezeichnet.

3.5.1 Wirkt das Scyphostatin-Analogon zytotoxisch auf humane Zellen?

Die Zytotoxizität des Scyphostatin-Analogons wurde an humanen, frisch isolierten Monozyten getestet. Diese wurden mit dem Analogon in vier verschiedenen Konzentrationen über Nacht inkubiert. Die Zytotoxizität des Scyphostatin-Analogons wurde im Zellkulturüberstand anhand der Konzentration des aus geschädigten Zellen freigesetzten Enzyms Lactat Dehydrogenase mittels kommerziell erhältlichem Assay von Roche Diagnostics gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine Probe verwendet, die mit 0,1 % Triton X-100 behandelt worden war. Die Ergebnisse zeigen, dass das Analogon keinen zytotoxischen Effekt auf behandelte Zellen hat (Abb. 20).

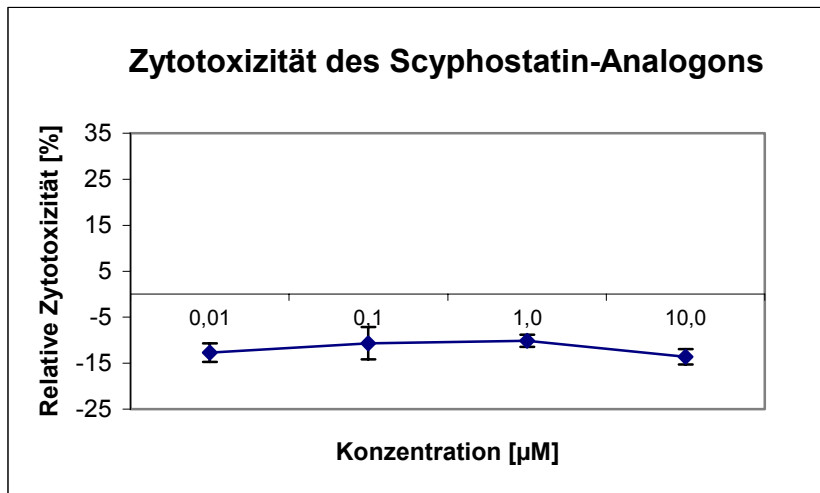


Abb.20 Das Scyphostatin-Analogon hat keine zytotoxische Wirkung auf humane Monozyten. Frisch isolierte Monozyten wurden mit dem Scyphostatin-Analogon [0,01 μM , 0,1 μM , 1,0 μM , 10,0 μM] für 16 h bei 37 °C inkubiert. Im Zellkulturüberstand wurde die Freisetzung des Enzyms Lactat Dehydrogenase mittels des Zytotoxizitätstests von Roche Diagnostics, Mannheim, ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus vier Experimenten.

3.5.2 Welchen Einfluss hat das Scyphostatin-Analogon auf den intrazellulären Sphingomyelin-Metabolismus und damit auf die endogene Ceramidgenerierung?

Minimal modifiziertes Low-Density Lipoprotein (mmLDL) und TNF- α sind als potentielle Stimulatoren der nSMase bekannt [140]. Zur Untersuchung einer vermuteten Inhibierung der nSMase durch das Scyphostatin-Analogon wurden humane M Φ mit einem fluoreszierenden Sphingomyelinderivat markiert [141]. Nach der Vorinkubation mit dem Scyphostatin-Analogon in drei unterschiedlichen Konzentrationen wurde mit mmLDL [27 $\mu\text{g/ml}$] eine Stimulation des Sphingomyelin-Metabolismus induziert. Nach Extraktion der Zelllipide wurde mittels HPLC-Analyse die Trennung und Bestimmung der pro Ansatz enthaltenen Konzentrationen an SM und Ceramid (Cer) erreicht. Die Hydrolyse von SM zu Cer, angegeben als Verhältnis SM/Cer, zeigte, dass das Analogon die Umsetzung von SM zu Ceramid durch Hemmung der nSMase verminderte. Während sich für die Kontrolle ein Umsetzungsverhältnis SM/Cer von 18,4 % und für die allein mit mmLDL stimulierte Probe ein Verhältnis von 25,5 % ergab, konnte das Scyphostatin-Analogon konzentrationsabhängig [0,1 μM , 1,0 μM , 10,0 μM] die Umsetzung von 22,8 % auf 18,0 % vollständig herabsetzen (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Analogon in diesem Zellmodell die durch mmLDL induzierte gesteigerte Aktivität der nSMase und die dadurch gesteigerte SM-Umsetzung zu Ceramid hemmt. Es führt folglich zu einer Herabsetzung der Ceramidgenerierung, was auf eine Wirkung als potentieller nSMase-Inhibitor schließen lässt.

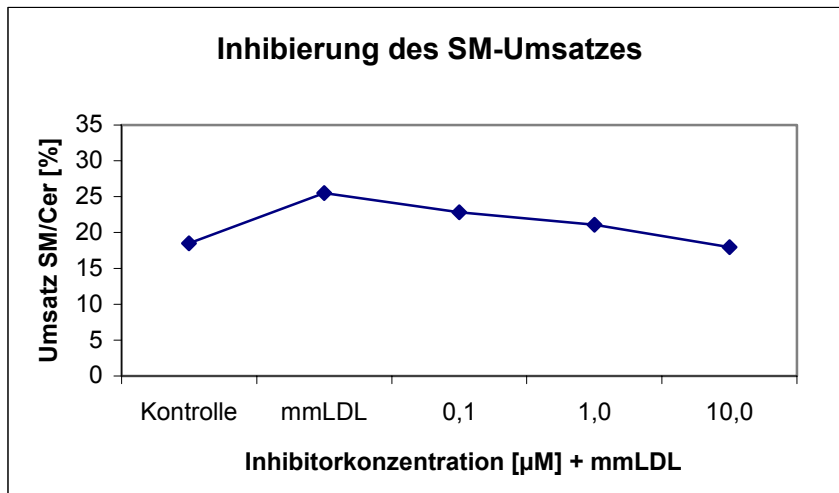


Abb.21 Wirkung des Scyphostatin-Analogons auf den intrazellulären Sphingomyelin-Umsatz in humanen Makrophagen. MΦ ($1,5 \times 10^6$) wurden über Nacht mit fluorophormarkiertem SM/BSA-Komplex (BODIPY[®]-FL C₅-SM/BSA-Komplex) gelabelt, danach mit dem Scyphostatin-Analogon in unterschiedlichen Konzentrationen [0,1µM, 1,0µM, 10,0µM] für 30 min vorinkubiert und mit mmLDL [27µg/ml] für 4 h stimuliert. Nach Extraktion der Zelllipide nach der Methode von Bligh und Dyer [142] wurde das Verhältnis SM/Cer mittels HPLC-Methode bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5.3 Wirkt das Scyphostatin-Analogon durch Erniedrigung des Ceramidlevels anti-apoptotisch?

Für die Untersuchung der antiapoptotischen Eigenschaften des synthetisierten Inhibitors wurden humane MΦ mit dem Scyphostatin-Analogon in unterschiedlichen, ansteigenden Konzentrationen vorinkubiert und anschließend zur Apoptoseinduktion entweder mit mmLDL [27µg/ml] (Ansatz 1) oder *hr*TNF-α [10ng/ml] + BSA [10ng/ml] (Ansatz 2) inkubiert. Die Apoptoserate wurde durch Auszählen der apoptotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl nach Zugabe von YO-PRO-1 und Hoechst 33342 Farbstoff ermittelt [26]. Für Ansatz 1 ergab sich für die Kontrolle eine spontane Apoptoserate von 4,3 %, während die mit mmLDL behandelten Zellen einen Anstieg der Apoptose auf 19,4 % (als 100 % gesetzt, siehe Abb. 22) zeigten. Die Vorbehandlung mit Scyphostatin-Analogon führte konzentrationsabhängig [0,25µM, 0,5µM, 2,5µM, 5,0µM] zu einer Abnahme der Apoptoserate auf 7,8 % (entspr. 40,2 %) für die höchste Konzentration von 5,0 µM (Abb. 22). Für Ansatz 2 konnte eine spontane Apoptoserate von 9,4 % für die Kontrolle und eine auf 18,9 % (als 100 % gesetzt, siehe Abb. 23) gesteigerte Rate für die mit TNF-α inkubierte Probe festgestellt werden. Auch hier konnte das Analogon [0,1µM, 1,0µM] die induzierte Apoptose auf 11,8 % (entspr. 62,2 %) bzw. 9,7 % (entspr. 51,0 %) senken (Abb. 23). Die Versuchsansätze verdeutlichen, dass das Scyphostatin-Analogon die durch mmLDL und

TNF- α induzierte Apoptose inhibieren kann und damit fähig sein muss, in die durch mmLDL und TNF- α hervorgerufene Induktion der Ceramidgenerierung hemmend einzuwirken, was wiederum auf eine Inhibierung der nSMase schließen lässt.

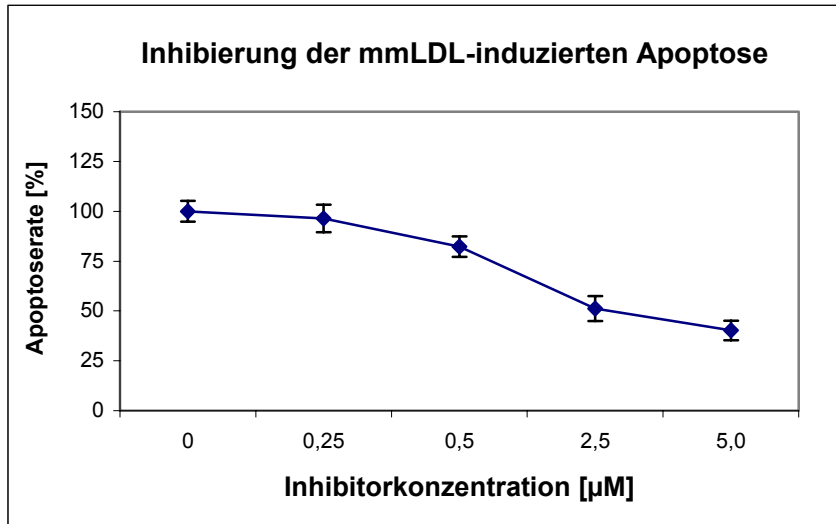


Abb.22 Wirkung des Scyphostatin-Analogons auf die durch mmLDL induzierte Apoptose in humanen Makrophagen. M Φ ($2,5 \times 10^5$) wurden mit dem Scyphostatin-Analogon in unterschiedlichen Konzentrationen [0,25µM, 0,5µM, 2,5µM, 5,0µM] für 30 min vorinkubiert und zur Induktion der Apoptose mit mmLDL [27µg/ml] für 4 h bei 37 °C stimuliert. Nach Inkubation der M Φ mit YO-PRO-1 und Hoechst 33342 Farbstoff wurde die Apoptoserate als Prozentsatz der mit YO-PRO-1 angefärbten Zellen relativ zur Gesamtzellzahl angegeben. Die absolute Apoptoserate 19,4 % der lediglich mit mmLDL stimulierten Probe ohne Inhibitorzusatz wurde als 100 % gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

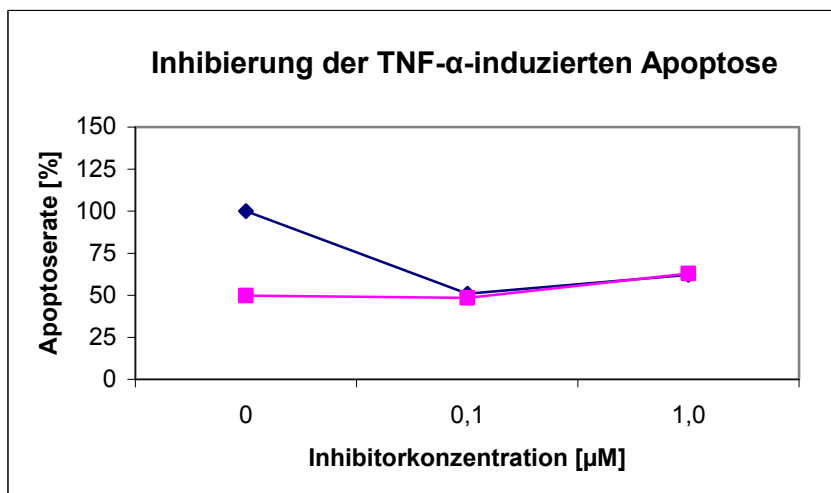


Abb.23 Wirkung des Scyphostatin-Analogons auf die durch *hr*TNF- α induzierte Apoptose in humanen Makrophagen. M Φ ($2,5 \times 10^5$) wurden mit dem Scyphostatin-Analogon in unterschiedlichen Konzentrationen [0,1µM, 1,0µM] für 30 min vorinkubiert und zur Induktion der Apoptose mit TNF- α [10ng/ml] + BSA [10ng/ml] (-♦-) oder lediglich mit BSA [10ng/ml] (-■-) für 4 h bei 37 °C stimuliert. Nach Inkubation der M Φ mit YO-PRO-1 und Hoechst 33342 Farbstoff wurde die Apoptoserate als Prozentsatz der mit YO-PRO-1 angefärbten Zellen relativ zur Gesamtzellzahl angegeben. Die absolute Apoptoserate 18,9 % der mit TNF- α behandelten Probe ohne Inhibitorzusatz

wurde als 100 % gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5.4 Lässt sich für das Analogon eine inhibitorische Wirkung auf die nSMase *in-vivo* nachweisen?

In Kenntnis einer Herabsetzung des SM-Umsatzes durch das Scyphostatin-Analogon (vgl. Ergebnis 3.5.2) und einer Verminderung der mmLDL- und TNF- α -induzierten Apoptoserate (vgl. Ergebnis 3.5.3) sollte nun ein direkter Effekt des Analogons auf die nSMase untersucht werden.

Dafür wurden humane M Φ mit dem Scyphostatin-Analogon in entsprechenden Konzentrationen zur Hemmung der nSMase vorinkubiert und mit mmLDL [80 μ g/ml] für 2 h stimuliert. Nach Gewinnung der Zelllysate wurde die vorhandene sphingolytische Aktivität jeder Zellprobe durch Zusatz eines fluorophormarkierten Sphingomyelins (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) in ausreichender Menge festgelegt, indem die durch den Umsatz der nSMase in jeder Probe entstandenen Konzentrationen an SM und Cer mit Hilfe der HPLC-Analyse detektiert und berechnet wurden. Für den prozentualen Umsatz, der ein Maß für die im Zelllysate vorhandene nSMase-Aktivität ist, ergab sich eine eindeutige Abnahme der nSMase-Aktivität um mehr als die Hälfte von 15,4 % auf 7,4 %, wenn mit dem Scyphostatin-Analogon in einer ansteigenden Konzentration von 0,01 μ M bis 1,0 μ M vorinkubiert wurde (Abb. 24). Diese Abnahme der sphingolytischen Aktivität war auch zu beobachten, wenn zuvor durch mmLDL zusätzlich eine Steigerung der nSMase-Aktivität induziert worden war (Abb. 25).

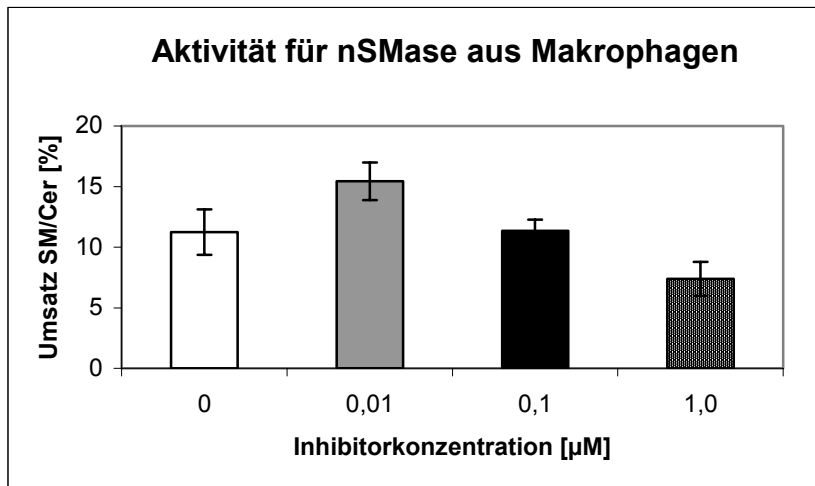


Abb.24 Spingolytische Aktivität der nSMase in Makrophagen nach Inkubation mit dem Scyphostatin-Analogon. MΦ wurden mit dem Scyphostatin-Analogon [0,01µM, 0,1µM, 1,0µM] für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im gewonnenen Zelllysat wurde durch Zugabe eines fluorophormarkierten Sphingomyelins als Substrat die vorhandene Aktivität der nSMase am Umsatz von SM zu Ceramid nach Inkubation bei 37 °C für 120 min gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC-Methode. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

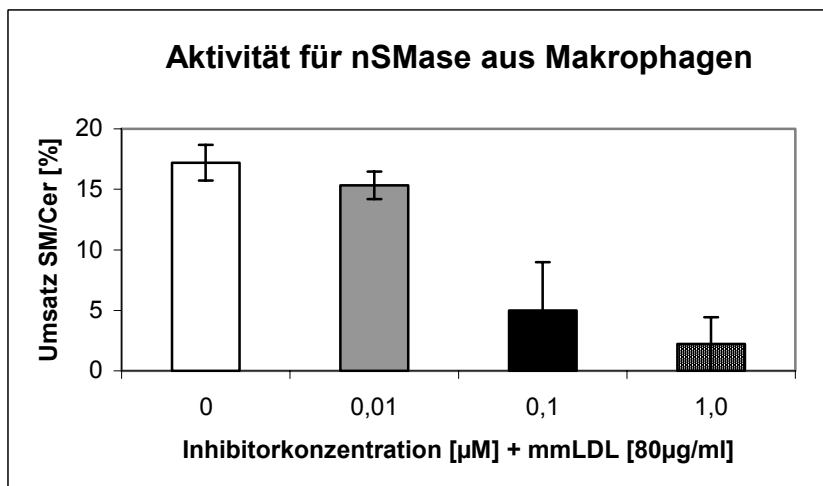


Abb.25 Spingolytische Aktivität der nSMase in Makrophagen nach Inkubation mit dem Scyphostatin-Analogon und mmLDL Stimulation. MΦ wurden mit Scyphostatin-Analogon [0,01µM, 0,1µM, 1,0 µM] für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend mit mmLDL [80µg/ml] für 2 h stimuliert. Im gewonnenen Zelllysat wurde durch Zugabe eines fluorophormarkierten Sphingomyelins als Substrat die vorhandene Aktivität der nSMase am Umsatz von SM zu Ceramid nach Inkubation bei 37 °C für 120 min gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC-Methode. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5.5 Ist die inhibitorische Wirkung spezifisch für die eukaryontische nSMase?

Um die Spezifität des Scyphostatin-Analogons auf eukaryontische nSMase zu untersuchen, wurde dessen Wirkung auf die Aktivität einer nSMase prokaryontischen Ursprungs getestet. Dafür wurde nSMase aus *Bacillus cereus* (bSMase) mit dem Scyphostatin-Analogon in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Nach Zugabe von fluorophormarkiertem Sphingomyelin (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) als Substrat für das Enzym wurde die veränderte Aktivität der bSMase durch Bestimmung der entstandenen Konzentrationen an SM und Cer mit Hilfe der HPLC-Analyse gemessen. Dabei konnte für keine der eingesetzten Analogonkonzentrationen eine Veränderung des prozentualen SM-Umsatzes festgestellt werden (Abb. 26). Dies zeigt, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die inhibitorische Wirkung des Scyphostatin-Analogons lediglich für die eukaryontische nSMase relevant ist, da die bSMase in ihrer Aktivität durch den Analogonzusatz nicht beeinflusst wird.

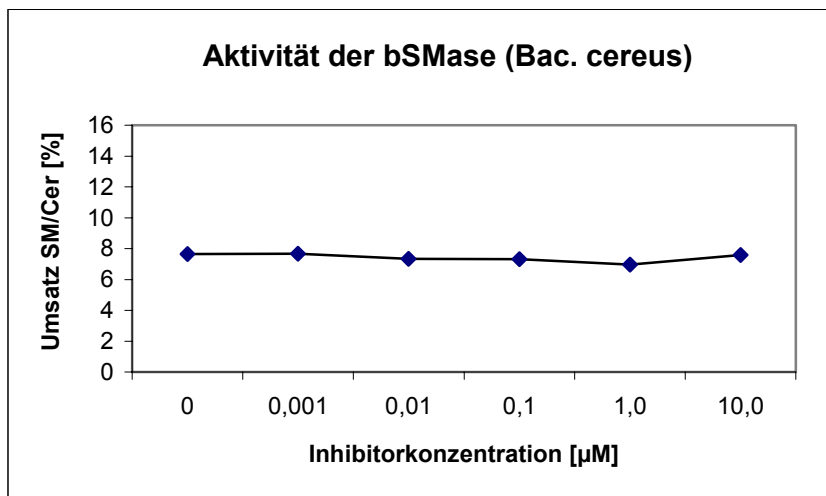


Abb.26 Sphingolytische Aktivität der nSMase aus *Bacillus cereus* (bSMase) nach Behandlung mit dem Scyphostatin-Analogon. Bakterielle SMase (1mg/ml, 24 U/mg Feststoff) wurde 1:10000 in nSMase-Reaktionspuffer verdünnt und *in-vitro* mit dem Scyphostatin-Analogon [0,001µM, 0,01µM, 0,1µM, 1,0µM, 10,0µM] für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe eines fluorophormarkierten Sphingomyelins als Substrat für die bSMase wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die Aktivität der bSMase am Umsatz von SM zu Ceramid gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels HPLC-Methode.

3.5.6 Über welchen Hemmmechanismus wirkt das Scyphostatin-Analogon auf die nSMase?

Für diese Untersuchung wurde ein roher Zellextrakt, der aus frisch isolierten Monozyten gewonnen wurde und die Mg^{2+} -abhängige neutrale SMase enthielt, verwendet. Die basale sphingolytische Aktivität wurde in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen nach Zusatz eines fluorophormarkierten Sphingomyelins (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) als Substrat (für 2 h bei 37 °C) mittels chromatographischer Analyse am Umsatzverhältnis SM/Cer gemessen. Es ergab sich im Zellextrakt ein prozentualer Umsatz von 16,8 %. In zwei weiteren Ansätzen wurde das Scyphostatin-Analogon zum einen vor der zweistündigen Substratzugabe für 60 min vorinkubiert und in der zweiten Probe erst zusammen mit dem Substrat zugegeben. In beiden Ansätzen nahm der SM/Cer-Umsatz auf vergleichbare Werte ab (5,9 % vs. 6,7 %). Dies deutet darauf hin, dass das Scyphostatin-Analogon die nSMase über einen reversiblen Mechanismus hemmt, da trotz Vorinkubation von 60 min keine signifikant gesteigerte Aktivitätshemmung gegenüber der Wirkung ohne Vorinkubation beobachtet wurde. Zur Analyse der Mg^{2+} -unabhängigen, unspezifischen sphingolytischen Aktivität im Zellextrakt wurde diese ohne Zusatz von Mg^{2+} -Ionen gemessen und der prozentuale SM-Umsatz auf 3,2 % festgelegt (Abb. 27).

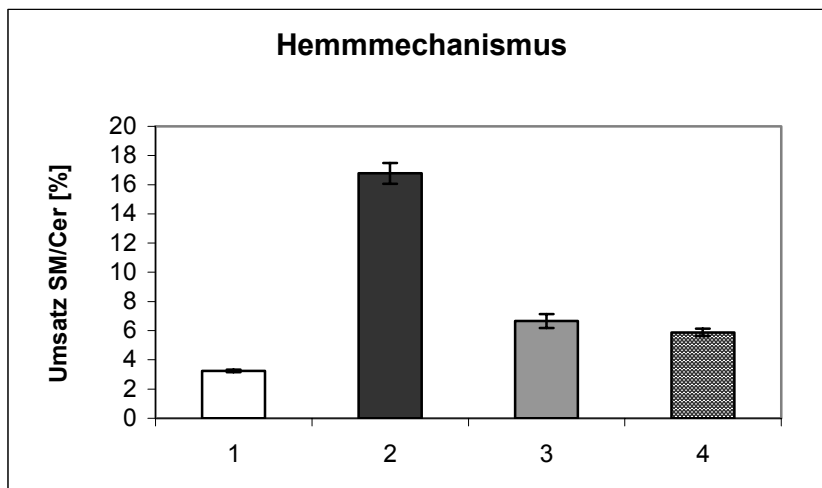


Abb. 27 Sphingolytische Aktivität der nSMase in rohem Zellextrakt nach Inkubation mit dem Scyphostatin-Analogon. Die sphingolytische Aktivität eines Zellextrakts aus frisch isolierten Monozyten wurde mit Vorinkubation des Scyphostatin-Analogons [100 μ M] für 60 min bei 37 °C (4) oder ohne Vorinkubation (3) bestimmt. Die vorhandene sphingolytische Aktivität wurde in beiden Ansätzen in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen nach Zugabe eines fluorophormarkierten Sphingomyelins (2h bei 37°C) als Substrat gemessen. Zudem wurde die basale sphingolytische Aktivität des Zellextrakts ohne (1) und mit (2) Mg^{2+} -Zusatz bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels chromatographischer Methode. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

3.5.7 Ist der *in-vivo* Effekt des Scyphostatin-Analogons auf die nSMase in dem in dieser Arbeit entwickelten Testmodell durch das PKC- α -EGFP Fusionsprotein sichtbar und kann dies mittels Western Blots verifiziert werden?

Für diesen Nachweis wurde eine ursprünglich von Kajimoto et al. [143] publizierte Methode modifiziert. Dazu wurden HepG22aI Zellen für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop auf mit Gelatine beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach Vorinkubation mit dem Scyphostatin-Analogon [10 μ M] mit einer Kombination aus PMA und C₆-Ceramid bzw. PMA und IFN- γ stimuliert. Es ist bekannt, dass die endogene Ceramidgenerierung neben der *de novo* Synthese durch Hydrolyse des zellmembrangebundenen SM erfolgt und dass diese Ceramidgenerierung über rezeptorvermittelte Stimulation durch verschiedene extrazelluläre Liganden hervorgerufen wird, zu denen neben vielen anderen auch IFN- γ gehört [62] (vgl. Einleitung 1.1.3). Sofern für die durch IFN- γ induzierte endogene Ceramidfreisetzung die Aktivierung der Mg²⁺-abhängigen nSMase essentiell ist [143], sollte diese Abhängigkeit durch Einsatz des nSMase-Inhibitors an der fehlenden Wirkung des Ceramids auf das durch PMA aktivierte PKC- α -EGFP Fusionsprotein im entwickelten Testsystem zu sehen sein.

Die Inkubation der HepG22aI Zellen mit dem Scyphostatin-Analogon, PMA, C₆-Ceramid und IFN- γ wurde in Anlehnung an Kajimoto und Kollegen [143] sowohl mit als auch ohne Zusatz von extrazellulären Mg²⁺-Ionen durchgeführt. Die Auswertung der Zellen am Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass IFN- γ durch seine endogene Ceramidgenerierung (Abb. 29D) analog zu exogenem C₆-Ceramid (Abb. 29C) die reverse Translokation der PKC- α vom aktivierten Zustand an der Membran zurück ins Zytosol induziert und dass das Scyphostatin-Analogon durch Hemmung der nSMase diese durch IFN- γ hervorgerufene reverse Translokation verhindern konnte (Abb. 29F). Im Kontrollexperiment mit exogenem Ceramid-Zusatz konnte das Scyphostatin-Analogon erwartungsgemäß die durch das zugesetzte C₆-Ceramid hervorgerufene reverse Translokation nicht hemmen (Abb. 29E). Abb. 29A zeigt zusätzlich, dass das Scyphostatin-Analogon selbst keine Wirkung auf die Verteilung der PKC- α ausübt, da das Enzym wie in unbehandelten Zellen diffus im Zytosol verteilt vorliegt. Die Versuche ohne Zusatz von Mg²⁺-Ionen zeigten, dass die beobachteten Effekte streng Mg²⁺-abhängig sind. Ohne Zusatz von Mg²⁺-Ionen war keine reverse Translokation hervorgerufen durch IFN- γ sichtbar (Abb. 30A), da offensichtlich keine ausreichende endogene Ceramidgenerierung durch die Mg²⁺-abhängige nSMase stattfand. Da bei Stimulation von Leberzellen mit IFN- γ von einer obligaten Aktivierung der neutralen SMase auszugehen ist [143, 62, 144] und ein Mangel an Mg²⁺-Ionen keine IFN- γ -vermittelte reverse

Translokation der PKC- α bewirkte, lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den Effekten des Scyphostatin-Analogons auf die reverse Translokation um die Wirkung des Analogons auf die Mg²⁺-abhängige nSMase handelt. Eine Zusammenstellung der für die unterschiedlichen Inkubationsschemata erwarteten und beobachteten Effekte ist je nach Stimulus in Abb. 28 dargestellt.

Stimulus	Mg ²⁺ -Ionen [1mM]	Scyphostatin-Analogon [10 μ M]	Erwarteter Effekt	Beobachteter Effekt	Abb.
	+	+	Inhibitor ist ohne Effekt auf Enzymverteilung, d. h. diffuse Verteilung der fluoreszierenden PKC- α im Zytoplasma	Diffuse Enzymverteilung im Zytoplasma	29A
PMA	+	-	PMA-induzierte Translokation	Anreicherung der fluoreszierenden PKC- α an Zellmembran und ER	29B
PMA + Cer	+	-	Aufhebung der PMA-induzierten Translokation durch exogenes Cer	Diffuse Enzymverteilung im Zytoplasma	29C
PMA + IFN- γ	+	-	Aufhebung der PMA-induzierten Translokation durch endogen gebildetes Cer	Diffuse Enzymverteilung im Zytoplasma	29D
PMA + Cer	+	+	Aufhebung der PMA-induzierten Translokation durch exogenes Cer, kein Effekt des nSMase-Inhibitors	Diffuse Enzymverteilung im Zytoplasma	29E
PMA + IFN- γ	+	+	Inhibierung der endogenen Ceramidgenerierung hemmt die Aufhebung der PMA-induzierten Translokation	Anreicherung der fluoreszierenden PKC- α an Zellmembran und ER	29F
PMA + IFN- γ	-	- / +	Ohne endogene Ceramidgenerierung durch die Mg ²⁺ -abhängige nSMase keine Aufhebung der PMA-induzierten Translokation. Dies ist unabhängig vom Inhibitorzusatz	Anreicherung der fluoreszierenden PKC- α an Zellmembran und ER	30A/30B

Abb.28 Zusammenstellung der je nach Stimulus erwarteten und beobachteten Effekte auf die Zellverteilung der fluoreszierenden PKC- α in transfizierten HepG2 Zellen. Cer, Ceramid; ER, Endoplasmatisches Retikulum; IFN- γ , Interferon gamma.

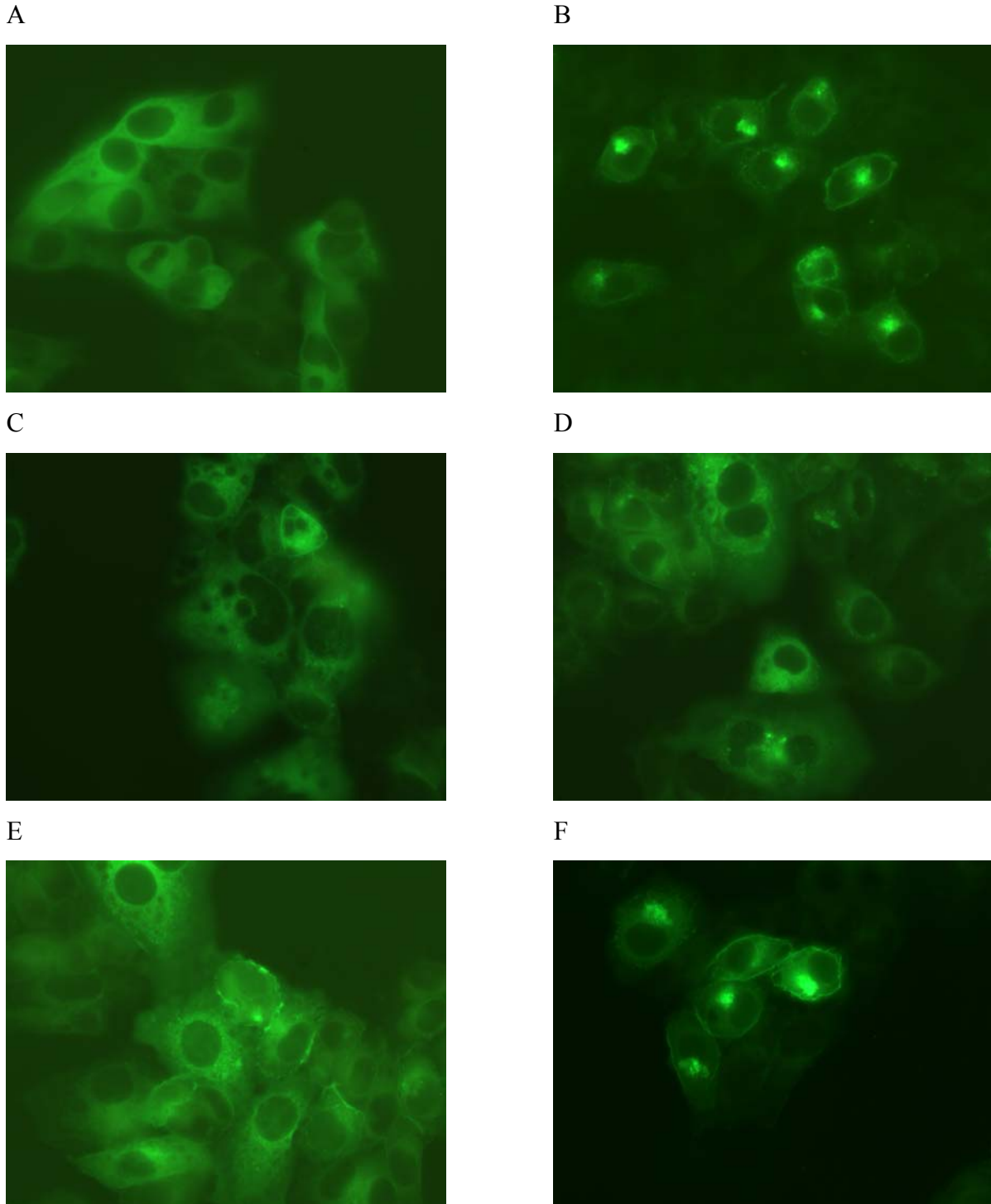


Abb.29 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Effekte des Scyphostatin-Analogons auf die durch IFN- γ endogen induzierte Ceramidgenerierung in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen in transfizierten HepG2 Zellen. HepG2aI Zellen wurden entweder mit Scyphostatin-Analogon [10 μ M] für 1 h 45 min (A), mit PMA [750nM] für 75 min (B), mit PMA [750nM] für 30 min + C₆-Ceramid [30 μ M] für 45 min (C), mit PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [400U/ml] für 45 min (D), mit Scyphostatin-Analogon [10 μ M] für 30 min + PMA [750nM] für 30 min + C₆-Ceramid [30 μ M] für 45 min (E) oder mit Scyphostatin-Analogon [10 μ M] für 30 min + PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [400U/ml] für 45 min (F) inkubiert. In allen Ansätzen erfolgte ein Zusatz von 1mM MgCl₂. Die Zellen wurden anschließend in 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei 630facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dargestellt ist je eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten.

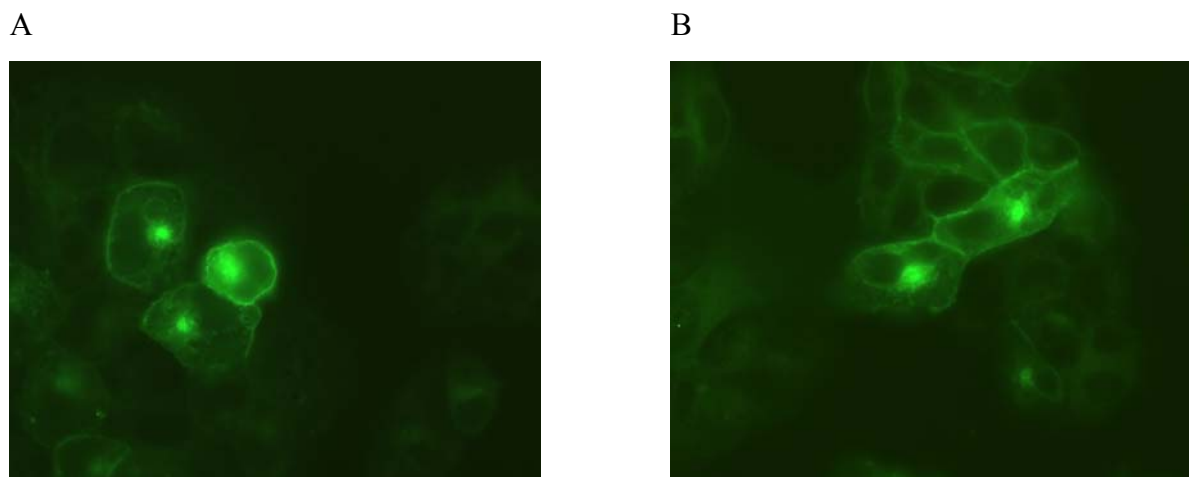
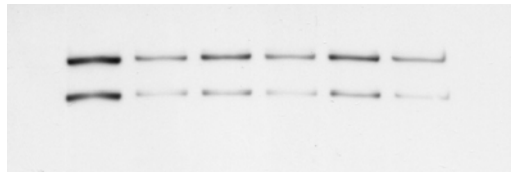


Abb.30 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Ein Mangel an Mg^{2+} -Ionen führt nicht zur endogen induzierten Ceramidgenerierung durch IFN- γ in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden mit PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [400U/ml] für 45 min (A) oder mit Scyphostatin-Analogue [10 μ M] für 30 min + PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [400U/ml] für 45 min (B) ohne Zusatz von $MgCl_2$ inkubiert, mit 2%iger Paraformaldehydlösung fixiert und in Dako[®] Fluorescent Mounting Medium bei 630facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

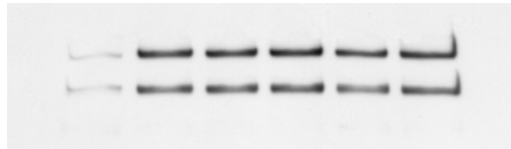
Um diese Versuche zu verifizieren, wurden HepG22a1 Zellen für Western-Blot-Versuche ausgesät und ebenfalls mit und ohne Zusatz von Mg^{2+} -Ionen im Inkubationsmedium mit dem Scyphostatin-Analogue [10 μ M] für 30 min vorinkubiert und mit einer Kombination aus PMA [750nM für 30min] und C_6 -Ceramid [30 μ M für 90min] bzw. IFN- γ [600U/ml für 90min] stimuliert. Nach Gewinnung der fraktionierten Zellextrakte (Zytosol- und Membranextrakt) wurden gleiche Mengen der fraktionierten Proteingemische auf ein SDS/Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Blotting auf PVDF Membranen wurden die Proteinbanden durch Antikörper gegen PKC- α auf entsprechendem ECL-Filmmaterial sichtbar gemacht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützten die zuvor fluoreszenzmikroskopisch gemachten Beobachtungen: Das Scyphostatin-Analogue verhindert durch Inhibierung der Mg^{2+} -abhängigen nSMase die durch IFN- γ hervorgerufene reverse Translokation der PKC- α (Abb. 31). Die Proteinbanden der Zytosol- und Membranextrakte wurden densitometrisch quantifiziert und der prozentuale Anteil der PKC- α in der Membranfraktion bezogen auf das Gesamtvorkommen in beiden Fraktionen (Zytosol- und Membranextrakt) angegeben. Die Ergebnisse sind als Diagramm in Abb. 32 dargestellt. Zum Nachweis quantitativ gleich aufgetragener Proteinmengen wurden die Membranen der zytosolischen Extrakte gestrippt und erneut mit Antikörpern gegen α -Tubulin behandelt. Abb. 31C und Abb. 31F zeigen die Ergebnisse bei Anwendung nahezu identischer Proteinkonzentrationen. Für Proteine aus dem Membranextrakt steht keine Normalisierungskontrolle zur Verfügung.

Ohne Mg^{2+} -Zusatz:

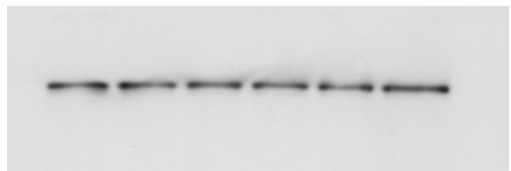
A

109 kDa
82 kDa

B

109 kDa
82 kDa

C

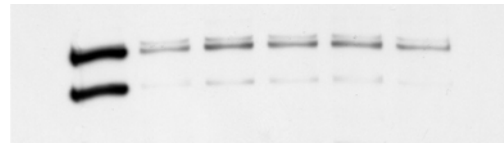


57 kDa

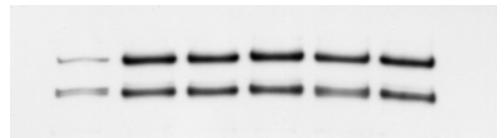
1 2 3 4 5 6

Mit Mg^{2+} -Zusatz:

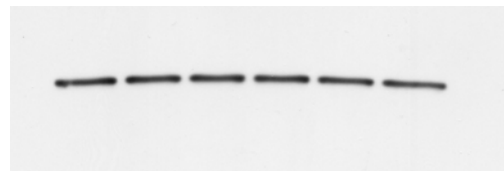
D



E



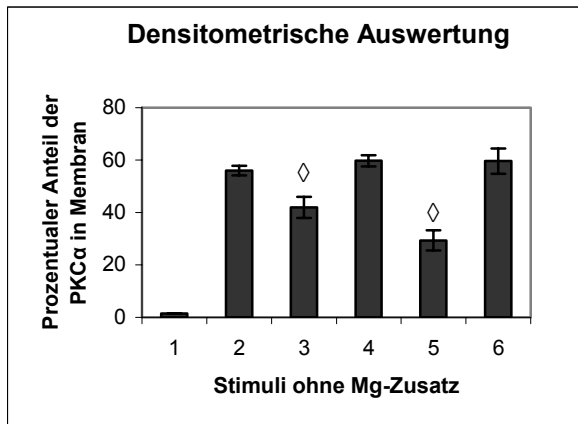
F



1 2 3 4 5 6

Abb.31 Western Blot. Effekte des Scyphostatin-Analogons auf die durch IFN- γ endogen induzierte Ceramidgenerierung mit und ohne Mg^{2+} -Zusatz in transfizierten HepG2 Zellen. HepG22a1 Zellen wurden entweder ohne (1) oder mit PMA [750nM] für 2 h (2), mit PMA [750nM] für 30 min + C₆-Ceramid [30 μ M] für 1 h 30 min (3), mit PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [600U/ml] für 1 h 30 min (4), mit Scyphostatin-Analogon [10 μ M] für 30 min + PMA [750nM] für 30 min + C₆-Ceramid [30 μ M] für 1 h 30 min (5), oder mit Scyphostatin-Analogon [10 μ M] für 30 min + PMA [750nM] für 30 min + IFN- γ [600U/ml] für 1 h 30 min (6) inkubiert und zur Gewinnung der Zytosol- (A, D) und Membranextrakte (B, E) lysiert. Gleiche Mengen Protein (3 μ g) wurden auf einem 7,5 % SDS/PA-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Blotten der Proteine auf PVDF Membranen und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mit 1 % BSA (8h, 4°C) erfolgte die Inkubation mit monoklonalem Primärantikörper (über Nacht, 4°C) gegen PKC- α (82 kDa PKC- α , 109 kDa PKC- α -EGFP) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT). Die Proteinbanden wurden mittels ECL-Detektion auf entsprechenden Filmen visualisiert. Zum Nachweis quantitativ gleich aufgetragener Proteinmengen (C, F) wurden die Membranen des zytosolischen Extrakts gestrippt, mit 1 % BSA geblockt (2h, RT) und mit monoklonalem Primärantikörper (2h, RT) gegen α -Tubulin (57 kDa) und Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1h, RT) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Detektion. Abbildungen A, B und C zeigen den Ansatz ohne Mg^{2+} -Zusatz, Abbildungen D, E und F die Ansätze mit Mg^{2+} -Zusatz.

A



B

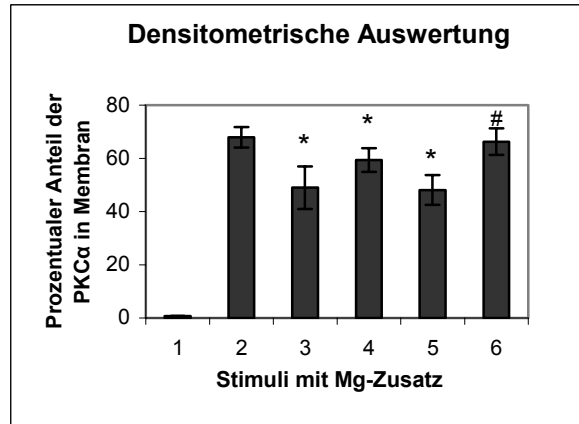


Abb.32 Densitometrische Auswertung. Die Bandenstärken der Zytosol- und Membranextrakte (siehe Abb. 31) wurden für den Ansatz ohne (A) und mit (B) Mg^{2+} -Zusatz densitometrisch ausgewertet. Angegeben ist der prozentuale Anteil der PKC- α in der Membranfraktion bezogen auf das Gesamtvorkommen der PKC- α in beiden Fraktionen (Zytosol- und Membranextrakt). Kontrolle (1), PMA [750nM] (2), PMA [750nM] + C₆-Ceramid [30 μ M] (3), PMA [750nM] + IFN- γ [600U/ml] (4), Scyphostatin-Analogon [10 μ M] + PMA [750nM] + C₆-Ceramid [30 μ M] (5), Scyphostatin-Analogon [10 μ M] + PMA [750nM] + IFN- γ [600U/ml] (6). Statistische Signifikanz: ρ , $p < 0,05$ vs. PMA (2); *, $p < 0,05$ vs. PMA (2); #, $p < 0,05$ vs. PMA+IFN- γ (4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney U Rank Sum W Test.

Die Ergebnisse dieses Untersuchungsansatzes in transfizierten HepG2 Zellen bestätigten die bereits *in-vivo* an M Φ belegte inhibitorische Wirkung des Scyphostatin-Analogons auf die nSMase.

4 Methoden und Material

4.1 Methoden

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Zellkulturmedien

HepG2 Zellen und stabil transfizierte HepG22aI Zelllinie werden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 0,292 mg/ml L-Glutamin und 10 % fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt werden. Für die transfizierte Zelllinie wird zusätzlich als Selektionsdruck 0,2 mg/ml G418 eingesetzt.

hTERT-BJ1 Zellen werden in einem Kulturmedium kultiviert, das aus DMEM und Medium 199 Hank in einem Verhältnis 4 : 1 angesetzt wird und dem 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin und 10 % inaktiviertes FCS zugesetzt werden. Die Inaktivierung des FCS erfolgt durch Erhitzen im Wasserbad bei 56 °C für 30 min.

Humane Monozyten werden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin, 0,292 mg/ml L-Glutamin und 10 % inaktiviertes FCS zugesetzt werden.

Für alle Zellversuche wird serumfreies RPMI 1640 Medium verwendet, dem lediglich 100 Units/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 0,292 mg/ml L-Glutamin zugesetzt werden.

4.1.1.2 Kultivieren und Passagieren

HepG2, HepG22aI und hTERT-BJ1 Zellen werden in ihren jeweiligen Kulturmedien in einem Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Luftatmosphäre, angereichert mit 5 % CO₂, kultiviert. Alle drei Zelllinien werden als Stammkultur in Einmalkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² ausgesät und zweimal pro Woche, die hTERT-BJ1 Zelllinie lediglich einmal pro Woche, unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung passagiert. Dafür werden die Zellen mit 1 ml Trypsinlösung versetzt und nach dem Ablösen vom Flaschenboden und Inaktivieren des Trypsins in der Kulturflasche durch 0,5 ml FCS-Zusatz in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wird anschließend 5 min bei 250xg zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Pellet wird in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums

resuspendiert und nach Verdünnen der Zellsuspension auf die gewünschte Konzentration in eine neue Kulturflasche ausgesät.

Humane Monozyten werden für jeden Versuch frisch aus dem Blut gesunder Spender mittels Ficolldichtegradient isoliert (Methode siehe 4.1.1.3) und anschließend nicht länger als drei Wochen unter gelegentlicher Zugabe von frischem Kulturmedium (ein- bis zweimal proWoche) kultiviert.

4.1.1.3 Isolierung humaner Monozyten aus Frischblut (Buffy Coats)

Zur Gewinnung humaner Monozyten werden Buffy Coats (je 125ml) von gesunden Spendern der Blutspendezentrale der Universität Heidelberg verwendet. Dazu werden 30 ml eines Buffy Coat auf 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (Dichte 1,077g/ml) pipettiert und 30 min mit 400xg bei Raumtemperatur zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Plasma im Überstand wird abpipettiert und verworfen. Die Interphase, in der die mononukleären Zellen lokalisiert sind, wird vorsichtig abgenommen und 1 : 4 mit Dulbecco's Phosphat Puffer (PBS) verdünnt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 250xg wird der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 45 ml PBS resuspendiert und bei 250xg zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wird nochmals wiederholt, bevor das resultierende Pellet in RPMI 1640 (supplementiert mit 10% FCS, 100Units/ml Penicillin G, 100µg/ml Streptomycin und 0,292mg/ml L-Glutamin) so verdünnt wird, dass die Zellen eines Buffy Coats auf vier Kulturflaschen (75cm²) zu je 25 ml Medium ausgesät werden können. Die anschließende Kultivierung erfolgt für ca. 10 Tage unter Standardbedingungen im Inkubator. Dabei wird etwa zweimal pro Woche frisches Kulturmedium zugegeben.

4.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung werden 50 µl Trypan-Blau-Lösung, 30 µl PBS und 20 µl der auszuzählenden Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß angesetzt, 1 min stehen gelassen und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es werden nur die ungefärbten, vitalen Zellen bei der Auszählung berücksichtigt.

Für die Berechnung der Zellen pro ml Zellsuspension wird die erhaltene Zellzahl durch die Anzahl der ausgezählten Quadrate (4 Quadrate) dividiert und mit dem Verdünnungsfaktor (Faktor 5) multipliziert. Die so erhaltene Zellzahl wird mit 10⁴ multipliziert und ergibt die Zahl der Zellen pro Milliliter der untersuchten Zellsuspension.

4.1.2 Stabile Transfektion

Für die Transfektion werden humane HepG2 Zellen bzw. hTERT-BJ1 Zellen in Kulturschalen (Ø 100mm) ausgesät und bis zu einer Semikonfluenz von etwa 60 % in Kulturmedium wachsen gelassen. Zur Transfektion wird das Kulturmedium durch OptiMEM Medium ersetzt und pro Kulturschale 10 µg pPKCα-EGFP Vektor gelöst in 20 µl LipofektaminTM Reagenz verwendet. Nach einer Inkubation von 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wird die Transfektionsmischung abgenommen, die Zellen mit frischem Kulturmedium gewaschen und zwei Tage im Inkubator belassen. Die Selektion der tatsächlich transfizierten Zellen wird durch einen Zusatz von 0,4 mg/ml des Selektionsantibiotikums G418 erreicht: Die nach einigen Wochen sichtbaren, stabil transfizierten Klone werden einzeln mit Papierschnippseln, die in Trypsin getränkt werden, steril in eine 24-well Kulturplatte überführt. Aus dieser werden die angewachsenen Klone nach nur wenigen Tagen mittels Trypsin in einzelne Kulturflaschen (25cm²) ausgesät. Nach mehreren Passagen über einige Wochen wird die Konzentration des G418 auf 0,2 mg/ml reduziert.

Von den erfolgreich transfizierten neuen Zelllinien, die jeweils auf einen einzelnen Klon zurückgehen, wird lediglich eine Zelllinie verwendet, mit der alle Experimente dieser Arbeit durchgeführt werden. Sie wird im Folgenden als HepG22aI Zelllinie bezeichnet. Von allen neuen Zelllinien werden einige Chargen in frischem Cryomedium (70% RPMI 1640 ohne Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin, 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.1.3 Western Blot

4.1.3.1 Gewinnung der Zytosol- und Membranfraktion aus HepG2 bzw. HepG22aI Zellen

Für Western-Blot-Experimente werden pro Kulturschale (Ø 35mm) 8×10^5 HepG2 bzw. HepG22aI Zellen ausgesät und zwei Tage kultiviert. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn werden sie mit RPMI 1640 Medium ohne FCS versehen. Zur Trennung der Zelllysate in Zytosol- und Membranfraktion wird eine bereits veröffentlichte Methode mit einigen Modifikationen angewandt [145].

Sofort nach Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Stimulantien werden sie zweimal kurz mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig

vom Zellboden gelöst und in 80 µl Lysepuffer, dem zur Proteaseinhibition ein Mix aus Benzamidin, Leupeptin, Thrypsin Inhibitor [je 10µg/ml], Dithiothreitol (DTT) [10mM] und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) [1mM] frisch zugesetzt wird, resuspendiert. Dieser und alle folgenden Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellen werden für zwei Sekunden sonifiziert (10% Power) und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Ultrazentrifugation (Beckman Optima™ TL) bei 100000xg für 30 min und 4 °C wird der Zellüberstand abgenommen (Zytosolfraktion). Für die nachfolgende Proteinbestimmung wird pro Probe ein Aliquot von je 23 µl separiert, bevor alle Proben bei -80 °C gelagert werden. Die Zellpellets werden anschließend in 45 µl Lysepuffer vorsichtig resuspendiert und wieder bei 100000xg und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Dieser Zellüberstand wird als so genannte Waschfraktion verworfen. Die verbleibenden Zellpellets werden in 55 µl Lysepuffer resuspendiert, der zusätzlich mit 0,2 % (V/V) Triton X-100 versetzt wird, und für 15 Sekunden sonifiziert (10% Power). Nach der Inkubation auf Eis für 10 min werden die Extrakte erneut bei 100000xg und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen (Membranfraktion) und pro Probe wird ein Aliquot von 17 µl für die Proteinbestimmung entnommen, bevor alle Proben bei -80 °C eingefroren werden.

4.1.3.2 Gewinnung der Zytosolfraktion aus Makrophagen

Für die Gewinnung des zytosolischen Extrakts aus MΦ werden diese nach der Isolierung und Kultivierung für etwa 5 bis 10 Tage (Methode siehe 4.1.1.3) zu 2×10^6 Zellen pro Well einer 6-well Zellkulturplatte ausgesät.

Für das Aussäen in 6-well Platten wird das überstehende Medium einer Kulturflasche mit MΦ abgesaugt. Die adhärenen MΦ-Kolonien bleiben dabei auf dem Flaschenboden zurück. Anschließend wird zweimal mit 15 ml PBS nachgewaschen, um die bei der Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) mitisolierten Lymphozyten zu entfernen. Die adhärenen MΦ werden mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflasche vorsichtig gelöst und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Nachwaschen der Kulturflasche mit PBS, um eine möglichst quantitative Überführung der abgelösten MΦ zu erreichen, wird die Zellsuspension 10 min bei 250xg zentrifugiert. Das Pellet wird je nach Zelldichte in 5 bis 10 ml supplementiertem RPMI resuspendiert, um nach Auszählen der Zellzahl (Methode siehe 4.1.1.4) 2×10^6 Zellen zu 2 ml Kulturmedium pro Well einer 6-well Zellkulturplatte auszusäen. Die Zellen werden erneut 2 bis 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Dabei wird einmal pro Tag ein Wechsel des Kulturmediums

durchgeführt. Vor der Versuchsdurchführung werden die MΦ mit serumfreiem RPMI 1640 gewaschen und etwa 20 min mit diesem Medium vorinkubiert.

Nach der Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Stimulantien [20μM C₆-Ceramid, 2μM Dihydroceramid, 2μM 39N, 2μM Alsterpaullon] für 4 h bei 37 °C wird eiskaltes PBS ins Medium gegeben. Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß auf Eis überführt. Nach Zentrifugation (Heraeus Sepatech Biofuge) bei 250xg und 4 °C wird das Pellet einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und danach in 60 μl Lysepuffer, dem ein Mix aus Benzamidin, Leupeptin, Thrypsin Inhibitor [je 10μg/ml], DTT [10mM] und PMSF [1mM] frisch zugesetzt wird, resuspendiert. Diese Zellsuspension wird 1 min auf Eis sonifiziert (10% Power) und zur Entfernung der Zellbestandteile erneut bei 11000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei -80 °C für nachfolgende Western-Blot-Experimente gelagert. Für die Proteinbestimmung wird pro Ansatz ein Aliquot von 17 μl getrennt eingefroren.

4.1.3.3 Proteinbestimmung von Zelllysaten mittels Bradford-Reagenz

Zur Quantifizierung der Proteinmengen aus den einzelnen Zellfraktionen wird die Bradfordbestimmung angewandt [146]. Durch Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G 250 an Proteine erfolgt eine Änderung des Extinktionsmaximums. Zur Auswertung wird ein computerunterstütztes Mehrkanal-UV/VIS-Fotometer (Varian Cary 100) verwendet. Als Standardprotein zur Festlegung der Kalibriergeraden wird Rinderserumalbumin (BSA) [0,4mg/ml] eingesetzt. Davon werden 5, 10, 15 und 30 μl mit isotonischer Kochsalzlösung zu 1 ml Endvolumen in Einmalküvetten angesetzt. Von den zu bestimmenden Zelllysaten werden geeignete Mengen Lysat (je nach Konzentration zwischen 5μl bis 20μl) ebenfalls in Einmalküvetten zu 1 ml mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. Als Nullwert dient isotonische Kochsalzlösung mit Reagenzienzusatz. Die Messung am Fotometer erfolgt nach dem jeweiligen Zusatz von 1,2 ml Bradfordreagenz nach genau 1 min 45 s bei einer Wellenlänge von 595 nm. Alle Bestimmungen werden als Dreifachbestimmungen ausgeführt. Die Berechnung des Mittelwerts erfolgt aufgrund der Standardgeraden unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls.

4.1.3.4 Immunoblot

Die Auftrennung der Proteine auf einem SDS/Polyacrylamid-Gel und anschließendes Blotten auf PVDF Membranen erfolgt entsprechend den Methoden nach Laemmli [147] bzw. Burnette [148] mit einigen Modifikationen.

Gemäß den Proteinkonzentrationen aus der Bradfordbestimmung werden quantitativ gleiche Proteinmengen aus den zu untersuchenden Zellextrakten 1 : 4 mit Roti[®]-Load 1 Puffer verdünnt, für 2 min bei 95 °C auf dem Wasserbad erhitzt und mit einer Hamiltonspritze auf ein SDS/Polyacrylamid-Gel mit einem 7,1%igen Sammelgel und einem 7,5%igen Trenngel aufgetragen. Nach der Trennung bei 100 mV in einem Elektrophoresesystem von Biorad mit Anoden- und Kathodenpuffer werden die Proteine in Transferpuffer nach der Wet-Blot-Methode bei konstant 62 Milliampere für 16 h und 4 °C auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wird anschließend 15 min in Inkubationspuffer gewaschen und 8 h bei 4 °C in Inkubationspuffer mit 1 % BSA unter leichtem Schwenken geblockt. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C ebenfalls in Inkubationspuffer mit 1 % BSA (monoklonaler Maus anti-Human PKC- α Antikörper, Biomol, 1:4000; monoklonaler Maus anti-Human PARP Antikörper, Biomol, 1:1600). Anschließend wird siebenmal für 5 min in Inkubationspuffer gewaschen und dann 1 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper in Inkubationspuffer inkubiert (Ziege anti-Maus IgG POD Antikörper, Sigma-Aldrich, 1:4000). Nach erneutem siebenmaligem Waschen in Inkubationspuffer wird die Membran 1 min bei Raumtemperatur mit 2 ml ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech) inkubiert und die Proteinbanden werden auf entsprechendem Filmmaterial sichtbar gemacht.

Die entwickelten Membranen werden in Folie eingeschweißt und bei 4 °C für eine Wiederverwendung mit anti- α -Tubulin Antikörper oder Living Colors[®] A.v. Peptid Antikörper gelagert:

Zum Nachweis gleicher Proteinmengen werden die Membranen der Zytosolfractionen gestrippt und erneut mit anti- α -Tubulin Antikörper behandelt. Dazu werden die Membranen in Strippingpuffer 30 min bei 50 °C auf dem Wasserbad inkubiert und zweimal für 10 min in Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen für 2 h bei Raumtemperatur in Inkubationspuffer mit 1 % BSA geblockt. Die Inkubation mit Primärantikörper erfolgt für 2 h bei Raumtemperatur in einer 1 : 200 Verdünnung in Inkubationspuffer mit 1 % BSA (monoklonaler Maus anti-Human α -Tubulin Antikörper, Dianova). Nach mehrmaligem Waschen, wie oben beschrieben, werden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG POD Antikörper, Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1 : 8000 in Inkubationspuffer unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Die Proteinbanden werden wie oben beschrieben nach erneutem siebenmaligem Waschen der Membran für jeweils 5 min in Inkubationspuffer mit ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech) auf den entsprechenden Filmen visualisiert.

Um die erfolgreiche Transfektion durch Western Blot nachzuweisen, werden die entsprechenden Membranen mit Living Colors[®] A.v. Peptid Antikörper (Clontech) behandelt. Dafür werden die Membranen in Strippingpuffer 30 min bei 50 °C inkubiert und anschließend zweimal für 10 min in Inkubationspuffer gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen werden 8 h bei 4 °C in Inkubationspuffer mit 1 % BSA geblockt. Die Inkubation mit dem oben genannten Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C in einer 1 : 100 Verdünnung in Inkubationspuffer mit 1 % BSA. Nach siebenmaligem Waschen in Inkubationspuffer für je 5 min erfolgt die Inkubation mit Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG POD, Sigma-Aldrich) für 1 h bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1 : 16000 in Inkubationspuffer. Nach erneutem siebenmaligem Waschen der Membran in Inkubationspuffer werden die Proteinbanden mit ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia Biotech), wie oben beschrieben, auf den entsprechenden Filmen visualisiert.

4.1.4 Mikroskopie und Immunozytochemie

Für immunozytochemische Experimente und Mikroskopie werden pro Well einer 4-well Kulturplatte 1×10^5 HepG22aI Zellen auf Deckgläschen, die zuvor 6 h mit 0,2%iger Gelatinelösung im Inkubator beschichtet wurden, ausgesät und zwei Tage kultiviert. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn werden die Zellen mit RPMI 1640 Medium ohne FCS versehen. Nach der Behandlung der Zellen mit den zu testenden Stimulantien werden die Zellen mit PBS einmal gewaschen und in 2%iger Paraformaldehydlösung in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem dreimaligen Waschen für 5 min mit PBS werden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen zum Fotografieren vorsichtig auf einen Objektträger mit einem Tropfen Dako[®] Fluorescent Mounting Medium überführt. Die entsprechenden Fotos werden bei 630facher Vergrößerung mittels Axioplan-2 Mikroskop und AxioCam (Zeiss) aufgenommen.

Für die Immunozytochemie werden die transfizierten Zellen nach entsprechender Stimulation, wie oben beschrieben, fixiert, dreimal mit PBS für 5 min gewaschen und in 0,2%iger Triton-X-100-Lösung in PBS für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen zu je 5 min mit PBS werden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur mit Primärantikörper (monoklonaler Maus anti-Human MnSOD Antikörper, MedSystems Diagnostics, 1:100; polyklonaler Kaninchen anti-Human Catalase Antikörper, 1:200; polyklonaler Kaninchen anti-Human Mikrosomen Antikörper, 1:200 und monoklonaler Maus

anti-Human Golgi Komplex Antikörper, NatuTec, 1:25) verdünnt in PBS inkubiert. Die Zellen werden dreimal mit PBS zu je 3 min gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit Sekundäantikörper (Ziege anti-Maus IgG/Cy3 Antikörper, Jackson ImmunoResearch, 1:500; Ziege anti-Kaninchen IgG/Cy3 Antikörper, Jackson ImmunoResearch, 1:500) verdünnt in PBS inkubiert. Nach dem erneuten dreimaligen Waschen mit PBS für 3 min werden die Zellkerne mit Hoechst 33342 Farbstoff [25µg/ml] 5 min bei Raumtemperatur angefärbt. Es wird wieder dreimal für 3 min gewaschen, bevor die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen zum Fotografieren vorsichtig auf einen Objektträger mit einem Tropfen Dako[®] Fluorescent Mounting Medium überführt werden. Die Aufnahmen werden bei 630facher Vergrößerung mittels Axioplan-2 Mikroskop inklusive AxioCam (Zeiss), ausgerüstet mit FITC-, Cy3- und DAPI-Filter, aufgenommen.

4.1.5 Apoptosemessung für Makrophagen

Die für 10 Tage kultivierten MΦ werden für die Apoptosemessung zu $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well einer 4-well Platte ausgesät.

Das Aussäen der MΦ aus den Kulturflaschen in 0,5 ml Kulturmedium pro Well erfolgt nach der unter 4.1.3.2 beschriebenen Methode. Die ausgesäten Zellen werden erneut 3 bis 4 Tage unter Standardbedingungen und täglichem Wechsel des Kulturmediums kultiviert. Vor der Versuchsdurchführung werden die MΦ mit serumfreiem RPMI 1640 gewaschen und etwa 20 min in diesem Medium vorinkubiert.

Zur Induktion der Apoptose wird für 4 h bei 37 °C im Inkubator mit den entsprechenden Stimuli C₆-Ceramid [30µM] und dessen Analoga [20µM], mmLDL [27µg/ml] oder *hr*TNF-α [10ng/ml] inkubiert. Um bei der Behandlung der Zellen mit TNF-α eine Adsorption des Zytokins an der Plastikwand der Kulturschale zu vermeiden, wird zusätzlich BSA in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Nach der Zugabe von YO-PRO-1 [5µM] und Hoechst 33342 Farbstoff [25µg/ml] in das Zellmedium wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die durch YO-PRO-1 grün fluoreszierenden, apoptotischen Zellkerne im Verhältnis zu allen durch Hoechst blau fluoreszierenden Zellkernen ausgezählt und dadurch die Apoptoserate in Prozent berechnet. Als Negativkontrolle dient serumfreies RPMI Medium, dessen spontane Apoptoserate je nach Versuch 100 % gesetzt wird, um voneinander unabhängige Experimente miteinander zu vergleichen. Die Quantifizierung erfolgt bei 200facher Vergrößerung mittels computerunterstützter Morphometrie an einem

Inversfluoreszenzmikroskop (Nikon ECLIPSE TS 100), das mit einer Olympus Color Camera HCC – 3600 P sowie mit FITC- und DAPI-Filter ausgerüstet ist. Diese Methode wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [26].

4.1.6 Präparation, Reinheitsprüfung und Modifikation von humanem Low-Density Lipoprotein (LDL)

4.1.6.1 LDL-Präparation

Die Isolierung von LDL erfolgt aus einem Pool Vollblutproben gesunder Spender der Blutspendezentrale der Universität Heidelberg, die mit Heparin antikoaguliert wurden. Nach Abtrennung von Zellbestandteilen durch Zentrifugation für 20 min bei 800xg und 4 °C (Eppendorf 5810 R Zentrifuge) wird das Plasma mit 381,6 mg KBr / ml versetzt, mit Inertgas (Stickstoff) überschichtet und bis zur vollständigen Lösung des KBr vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt. Die Plasmadichte beträgt 1,24 g/ml. In einem Zentrifugationsröhrchen (Beckman Ultraclear 9/16 x 3 1/2 in.) mit einem Volumen von 11,2 ml werden 8 ml PBS-Puffer vorgelegt, der mit 1 g/l Na₂-EDTA (pH 7,4) versetzt wird. Diese Lösung wird mit 4,0 ml des KBr-Plasmas vorsichtig unterschichtet und im vorgekühlten Rotor SW40Ti 3 h bei 41000xg und 4 °C mit minimaler Beschleunigung und minimaler Bremsung zentrifugiert (Beckman Optima XL 100K). Nach Absaugen der obersten Banden, vorwiegend aus VLDL und Chylomikronen bestehend, wird die gelblich gefärbte Bande mit gebogener Spitze vorsichtig abgenommen, gepoolt und mittels Gelelektrophorese charakterisiert bzw. geprüft [149, 150].

4.1.6.2 Reinheitsprüfung

Die Reinheitsprüfung des isolierten LDL erfolgt durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Dafür werden 10 µl LDL-Fraktion mit 200 ng Nilrot (0,4 µg/µl in Ethanol) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl Auftragepuffer findet die Auftrennung in einem 0,6%igen Agarose-Gel in Barbitarpuffer über 2 h bei 56 V und Raumtemperatur statt. Die Bandendetektion erfolgt in einem Herolab UV-Transilluminator, wobei eine distinkte, fluoreszierende Bande mit einer relativen elektrophoretischen Mobilität (REM) von 0,20 bis 0,25 das LDL indiziert [151]. Mit einer anschließenden Coomassiefärbung als Ausschluss von möglichen Verunreinigungen (Albumin etc.) sind keine weiteren Proteinbanden detektierbar. Das LDL wird mit kristalliner Sucrose zu einer Endkonzentration

von 40 % versetzt, zu je 400 µl Aliquots separiert, mit Stickstoff über 2 h zur Einstellung eines Gleichgewichts begast und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung maximal über einen Zeitraum von 2 Monaten gelagert [152].

4.1.6.3 Minimale Modifikation von humanem Low-Density Lipoprotein

Bevor das, wie oben beschrieben, präparierte und geprüfte native LDL (nLDL) modifiziert und zu Zellversuchen eingesetzt werden kann, wird das zum Oxidationsschutz zugesetzte EDTA durch Säulenchromatografie entfernt. Dafür wird eine Minisäule (0,95-1,05 ml Volumen, Biorad) mit frisch in PBS gequollenem Sephadex G-25 unter Vermeidung von Luftblasen gepackt. Nach 10minütigem Äquilibrieren in PBS wird pro Minisäule ein nLDL-Volumen von 200 µl aufgetragen und unter ständiger tropfenweiser Zugabe von PBS langsam eluiert. Das Eluat wird ebenfalls tropfenweise aufgefangen, wobei eine gelbliche Färbung die nLDL-Fraktion anzeigt. Diese Fraktionen werden gepoolt und sofort bis zur Modifizierung auf Eis zwischengelagert. Für die später noch notwendige Bestimmung der REM der Lipoproteine (Methode siehe 4.1.6.4) wird ein Aliquot von 5 µl bei 4 °C für ca. 30 min gelagert.

Die milde Oxidation von nLDL zu mmLDL wird bei 37 °C mit Cu^{2+} -Ionen durchgeführt. Dafür werden dem nach der Säulenchromatografie gewonnenen nLDL 2 µM CuSO_4 zugesetzt und diese Lösung 30 min bei 37 °C unter Zugang von Luftsauerstoff inkubiert. Die dabei stattfindende minimale Oxidation wird durch Zusatz einer 1 mM EDTA-Lösung abgestoppt [140]. Von dieser mmLDL-Lösung werden 5 µl als Aliquot für die nachfolgende Bestimmung der REM zurückgestellt. Die restliche Menge an mmLDL wird bei 4 °C gelagert und innerhalb von zwei Stunden für Zellversuche eingesetzt.

4.1.6.4 Bestimmung des Oxidationsgrades von mmLDL

Die Überprüfung des Oxidationsgrades von mmLDL erfolgt mit Hilfe der Bestimmung der REM. Dazu wird in einer Flachbettelektrophoresekammer ein 1,5%iges Agarosegel in TAE-Puffer angesetzt. Je 8 µl nLDL und mmLDL (entspricht ca. 13µg Protein) werden mit 2 µl Loading-Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle dient 2 µl BSA [1mg/ml] verdünnt in 6 µl Aqua dest. und Zusatz von ebenfalls 2 µl Loading-Puffer. Nach der Auftrennung der Banden und Fixieren des Gels für 30 min in 25%iger Essigsäure werden die Proteinbanden durch Coomassie Blue G 250 Lösung über Nacht angefärbt. Nach dem Entfärben des Gels (10% Essigsäure, 10% Ethanol in Aqua dem.) kann die REM als Quotient aus Gesamtlaufstrecke und Laufstrecke der zu untersuchenden Substanzen festgelegt werden.

BSA besitzt die größte REM (ca. 0,74), während nicht oxidiertes natives LDL und mmLDL eine kleinere REM (0,20-0,25) aufweisen.

4.1.6.5 Proteinbestimmung von mmLDL mittels BCA-Reagenz

Diese Methode nach Lowry [153], leicht modifiziert nach Smith [154], beruht auf der im alkalischen Milieu durch Proteine hervorgerufenen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ . Sie kann nur angewandt werden, wenn in den zu quantifizierenden Proben keine Substanzen mit reduzierenden oder komplexierenden Eigenschaften vorhanden sind. Die Auswertung erfolgt an einem Einkanal-UV/VIS-Fotometer (Ultrospec II, Pharmacia LKB Biochrom Ltd.).

Als Standard dient BSA [1mg/ml]. Davon werden 5, 10 und 20 μl ad 50 μl mit Aqua dest. in Halbmikroküvetten angesetzt. Von der zu quantifizierenden mmLDL-Probe werden 5 μl ad 50 μl ebenfalls mit Aqua dest. in einer Halbmikroküvette eingesetzt. Dabei werden alle Messungen als Doppelbestimmung ausgeführt. Nach Zusatz von je 1 ml BCA-Reaktiv (100 Volumenteile BCA-Lösung A und 2 Volumenteile BCA-Lösung B) zu jeder der angesetzten Proben wird 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Nach dieser Bestimmung ergab sich für die mmLDL-Proben ein Proteingehalt von etwa 1,5 bis 1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.1.7 Messung des intrazellulären Sphingomyelin-Umsatzes

Frisch isolierte Monozyten werden zu $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 6-well Kulturplatte ausgesät und über Nacht mit je 1,5 ml fluorophormarkiertem SM/BSA-Komplex (BODIPY[®]-FL C₅ SM/BSA-Komplex) inkubiert. Zur Herstellung dieses Komplexes werden 4 nM BODIPY[®]-SM in Methanol gelöst, nach der Methode von Martin [141] mit fettsäurefreiem BSA versetzt und nach der Dialyse gegen PBS und Sterilfiltration (2 μm) in HMEM (10 mM HEPES-buffered minimal essential medium, pH 7,4) zu einem Endvolumen von 12 ml verdünnt. Die Zellen werden anschließend mit frischem Medium einmal gewaschen und mit dem Scyphostatin-Analogon [0,1 μM , 1,0 μM , 10,0 μM] für 30 min vorinkubiert, bevor sie erneut 4 h bei 37 °C mit mmLDL [27 $\mu\text{g}/\text{ml}$] versetzt werden. Nach der Inkubation werden sie zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße auf Eis überführt. Darauf erfolgt die Extraktion der Zelllipide nach der Methode beschrieben von Bligh und Dyer [142]. Die organische Phase wird mittels eines Vakuum Konzentrators (Bachofar Vacuum Concentrator) abgezogen. Zur Trennung und

Bestimmung der pro Ansatz enthaltenen Konzentrationen an SM und Cer wird folgende HPLC-Methode angewendet [Deigner, Bläß unveröffentlichte Ergebnisse]: Nach der Zugabe eines internen Standards BODIPY[®]-FL C₅ und je 90 µl TRIS 100 mM (pH 7,5) zu jeder Probe werden die Lipide auf einer RP-18 Säule (LiChroCART 125-4, LiChrospher 100 RP-18, Merck, Darmstadt) bei einer Flussrate von 1,85 ml/min getrennt. Als Fließmittel dient dabei eine Mischung aus destilliertem Methanol und TRIS 100 mM (pH 7,5) im Verhältnis 90 : 10 (V/V). Die Konzentrationen an SM und Cer werden durch einen Shimadzu RS-535 Detektor bei einer Emissions-/Extinktionswellenlänge von 515/505 nm detektiert und die Umsatz-Rate aus dem Verhältnis zwischen SM und Cer berechnet.

4.1.8 Aktivitätsmessung für nSMase nach *in-vivo* Stimulation

Etwa 5 bis 10 Tage alte Monozyten werden in supplementiertem RPMI 1640 Medium zu 5×10^5 in sterile 12-well Kulturplatten ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Vorinkubation mit dem Scyphostatin-Analogon in einer Konzentration von 0,01, 0,1 und 1,0 µM in serumfreiem RPMI Medium werden sie 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 2 h mit mmLDL [Endkonzentration 80µg/ml] versetzt. Ohne das überstehende Medium zu entfernen, werden die Makrophagen mit einem Zellschaber abgekratzt, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße auf Eis überführt und bei 4 °C und 250xg zentrifugiert (Heraeus Sepatech Biofuge). Das Pellet wird einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und danach in 40 µl nSMase-Reaktionspuffer lysiert [140] und die Zellbestandteile durch erneute Zentrifugation bei 11000xg abgetrennt. Die sphingolytische Aktivität der Zellextrakte wird in ca. 5 µl Aliquots [11µg Protein] gemessen. Dazu wird pro Probe ein fluorophormarkiertes Sphingomyelin (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) in ausreichender Menge [3µM] als Substrat zugesetzt und für einen Umsatz von etwa 10 % für 120 min auf dem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion in flüssigem Stickstoff gestoppt. Nach Zusatz von internem Standard (BODIPY[®]-FL C₅) werden alle Proben nach der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Methode mittels RP-18 HPLC chromatographisch getrennt und der prozentuale SM-Umsatz zu Ceramid berechnet.

4.1.9 Aktivitätsmessung für nSMase nach *in-vitro* Stimulation zur Festlegung des Hemmmechanismus

Dafür werden 100×10^6 frisch isolierte Monozyten über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Gewinnung eines rohen Zellextrakts werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 400 μl nSMase-Reaktionspuffer [140] mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, lysiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß auf Eis überführt. Anschließend wird 10 min bei $14000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. In einem 20 μl Aliquot des Überstandes wird die sphingolytische Aktivität nach Mg^{2+} -Zusatz [10mM] und Zugabe eines fluorophormarkierten Sphingomyelins (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) als Substrat in einer Menge von 1 nmol bestimmt. Dazu wird der rohe Zellextrakt für 2 h bei 37°C inkubiert und die Aktivität am Umsatz von SM zu Cer mittels chromatographischer Methode gemessen. Zur Bestimmung des Hemmmechanismus für das Scyphostatin-Analogon [100 μM] wird dieses in einem weiteren Aliquot vor der zweistündigen Substratzugabe vorinkubiert (für 60min bei 37°C) bzw. erst direkt mit dem Substrat zugegeben. Die sphingolytische Aktivität beider Aliquote wird mittels chromatographischer Methode am Umsatzverhältnis SM zu Cer ermittelt. Außerdem wird die Mg^{2+} -unabhängige Aktivität des Zellextrakts ohne zusätzliche Mg^{2+} -Zugabe im Reaktionspuffer als Kontrollversuch gemessen.

4.1.10 Aktivitätsmessung für bakterielle SMase nach *in-vitro* Stimulation

Für diese Untersuchung wird nSMase aus *Bacillus cereus* (1,0mg/ml, 24U/mg Feststoff) mit nSMase-Reaktionspuffer 1 : 10000 verdünnt und mit dem Scyphostatin-Analogon in verschiedenen Konzentrationen [0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1,0 μM , 10,0 μM] für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Nach der Zugabe von SM-Substrat (BODIPY[®]-FL C₅-sphingomyelin) [3 μM] wird für 15 min bei 37°C inkubiert, da nach Vorversuchen unter diesen Bedingungen ein SM-Umsatz von etwa 10 % zu erwarten ist. Das SM/Cer-Verhältnis wird mittels der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen HPLC-Methode nach Zugabe des internen Standards BODIPY[®]-FL C₅ berechnet.

4.1.11 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität des Scyphostatin-Analogons wird in RPMI 1640 Zellkulturmedium von frisch isolierten Monozyten getestet. Dafür mit einer Analogonkonzentration von bis zu 10 μM für 16 h unter Standardbedingungen im Inkubator inkubiert. Mittels des Zytotoxizitätstests von Roche Diagnostics, Mannheim, wird gemäß der Herstellervorschrift die von geschädigten Zellen ins Zytosol freigesetzte Konzentration des Enzyms Lactat Dehydrogenase im Zellkulturüberstand gemessen. Dies erfolgt über die Zugabe eines Substrats für die Lactat Dehydrogenase und anschließende Absorptionsmessung der umgesetzten Substratlösung bei 490 nm. Dabei dienen mit 0,1 % Triton X-100 behandelte Zellen als Positivkontrolle, unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und die Absorption puren Mediums als Nullwert. Für die Festlegung einer nicht vorhandenen Zytotoxizität darf der berechnete Quotient (siehe Formel) einen vom Hersteller angegebenen Wert nicht übersteigen. Die Messung der Absorption erfolgte am Mehrkanal-UV/VIS-Fotometer, Cary 100. AM Absorptionsmittelwert.

$$\text{Quotient: } \frac{(AM_{\text{Testsubstanz}} - AM_{\text{Nullwert}}) - (AM_{\text{Negativkontrolle}} - AM_{\text{Nullwert}}) \times 100}{(AM_{\text{Positivkontrolle}} - AM_{\text{Nullwert}}) - (AM_{\text{Negativkontrolle}} - AM_{\text{Nullwert}})}$$

4.2 Material

4.2.1 Chemikalien

Acrylamid-Bisacrylamid-30%-Lösung (29:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS Pufferan	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween [®] 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Roti [®] -Load 1 Protein-Gelladepuffer, reduzierend	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA, Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt
Leupeptinhemisulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzamidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin Inhibitor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100 (Octylphenolpolyethylenglycolether)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Sephadex [®] G-25	Pharmacia AB, Uppsala, Schweden
Gelatine gepulvert, DAB, PhEu, NF	Merck, Darmstadt
Agarose	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Riedel-de Haen AG, Seelze
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Hexanoylsphingosin	Alexis, Grünberg
N-Palmitoylsphingosin	Alexis, Grünberg
BODIPY [®] FL C ₅ -sphingomyelin	Molecular Probes, Göttingen
BODIPY [®] FL C ₅	Molecular Probes, Göttingen
Interferon- γ , human	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TNF- α , human, rekombinant	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAKO [®] Fluorescent Mounting Medium	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
YO-PRO-1	Molecular Probes, Göttingen
Hoechst 33342 Farbstoff	Molecular Probes, Göttingen

4.2.2 Zusammensetzung von Puffern und verwendeten Lösungen

Lysepuffer:

Hepes, pH 7,5	20 mM
Sucrose	300 mM
EDTA	2 mM
EGTA	10 mM
DTT	2 mM

Bradfordreagenz:

Coomassie Brilliant Blue G 250	100 mg
Ethanol 95 %	50 ml
Phosphorsäure 85 %	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Anodenpuffer (10x):

TRIS, pH 8,4	29,89 g
Aqua dem.	ad 1000 ml

Kathodenpuffer (10x):

TRIS	30,28 g
Glycin	144,0 g
SDS	10,0 g
Aqua dem.	ad 1000 ml

Transferpuffer:

TRIS	6,15 g
Glycin	35,68 g
Methanol chem. rein	500 ml
Aqua dem.	ad 2500 ml

Inkubationspuffer:

TRIS-HCl, pH 7,5	6,08 g
Natriumchlorid	11,94 g
Tween [®] 20	0,5 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Strippingpuffer:

TRIS-HCl, pH 6,7	62,5 mM
SDS	2 %
2-Mercaptoethanol	100 mM

Auftragepuffer:

TRIS-HCl, pH 8,0	20 mM
EDTA	1 mM
Sucrose	30 %
Bromphenolblau	0,05 %

Barbitalpuffer:

Barbital-Na, pH 8,6	50 mM
Barbital	10 mM

TAE-Puffer (50x):

TRIS	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5M EDTA, pH 8,0	100 ml
Aqua dem.	ad 1000 ml

Loading-Puffer:

Bromphenolblau	0,25 %
Xylen cyanol FF	0,25 %
Glycerol	30 %

Färbelösung:

Coomassie Blue G 250	100 mg
Ethanol 99 %	25 ml
Essigsäure	5 ml
Aqua dem.	ad 100 ml

Entfärbelösung:

Essigsäure	10 %
Ethanol	10 %

BCA-Lösung A:

Bicinchonic Acid-Na ₂ , pH 11,25	1 %
Natriumcarbonat	2 %
Natriumtartrat	0,16 %
Natriumhydroxid	0,4 %
Natriumhydrogencarbonat	0,95 %

BCA-Lösung B:

Kupfersulfat x 5H ₂ O	4 %
----------------------------------	-----

nSMase-Reaktionspuffer:

TRIS, pH 7,4	50 mM
DTT	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Triton X-100	0,05 %

4.2.3 Zellkultur- und Transfektionsreagenzien

DMEM low glucose mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Medium 199 Hank	PromoCell, Heidelberg
HMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat-Lösung (100mM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphat-Puffersalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung 0,5 %	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
G418-Lösung (50mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
OptiMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofektamin TM Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pPKC α -EGFP Vektor	Clontech, Heidelberg

4.2.4 Zellkulturen

hTERT-BJ1 Zellen	Clontech, Heidelberg
HepG2 Zellen	DSMZ, Braunschweig
Monozyten	Spenderblut der Blutspendezentrale, Heidelberg

4.2.5 Antikörper

Monoklonaler Maus anti-Human PKC- α	Biomol, Hamburg
--	-----------------

Polyklonaler Living Colors [®] A.v. Peptid	Clontech, Heidelberg
Monoklonaler Maus anti-Human α -Tubulin	Dianova, Hamburg
Monoklonaler Maus anti-Human PARP	Biomol, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monoklonaler Maus anti-Human MnSOD	MedSystems Diagnostics GmbH, Vienna, Österreich
Polyklonaler Kaninchen anti-Human Catalase	Geschenk Prof. Fahimi, Institut für Anatomie und Zellbiologie II, Universität Heidelberg
Polyklonaler Kaninchen anti-Human Mikrosomen	Geschenk Prof. Fahimi, Institut für Anatomie und Zellbiologie II, Universität Heidelberg
Monoklonaler Maus anti-Human Golgi Komplex	NatuTec GmbH, Frankfurt
Ziege anti-Maus IgG/Cy3	Jackson ImmunoResearch, USA, Vertrieb Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen IgG/Cy3	Jackson ImmunoResearch, USA, Vertrieb Dianova, Hamburg

4.2.6 Materialien für Western Blot

Premixed protein molecular weight marker	Boehringer, Mannheim
Prestained protein molecular weight marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Immobilon-P PVDF Membranen	Millipore GmbH, Eschborn
ECL-Detektionsreagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm [™] ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

4.2.7 Geräte

Brutschrank: Modell: 310 Series Direct Heat CO₂ Inkubator, Forma Scientific

Laminar-Air-Flow:

Pretil[®] Laminarflow, Bempflingen

LaminAir[®] HB 2448, Heraeus Instruments

Zentrifugen:

Beckman Optima™ TL Ultrazentrifuge mit Beckman Rotor TLA 100.3, München

Heraeus Sepatech Biofuge, Hanau

Heraeus Multifuge 3 S-R, Osterode

Beckman Optima XL 100K Zentrifuge, München

Mikroskope:

Inversmikroskop Nikon ECLIPSE TS 100/TS 100-F, Nikon Europe B. V., Badhoevedorp, Niederlande

Inversfluoreszenzmikroskop Nikon ECLIPSE TS 100 mit Olympus Color Camera HCC-3600P, Nikon Europe B. V., Badhoevedorp, Niederlande

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan-2 mit AxioCam, Jena

Sonifiziergerät: Bandelin Sonoplus, Berlin

Vakuum Konzentrador: Bachofer Vacuum Concentrator, Reutlingen

Elektrophoresekammer: Biorad Mini-Elektrophoresekammer, München

Blotkammer: Biorad Minitransblot Apparat, München

Elektrophorese Power Supply: Appligene Power Supply 300V-500mA, Strasbourg

Fotometer:

Einkanal-UV/VIS-Fotometer Ultrospec II, Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, England

Mehrkanal-UV/VIS-Fotometer Cary 100, Varian Deutschland GmbH, Darmstadt

UV-Transilluminator: Herolab UV-Transilluminator, Wiesloch

HPLC-Anlage: Shimadzu RS-535 Detektor, Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pump

Densitometrie: Biorad Image Scanner, München und AIDA (advanced image data analyzer) Software (Version 3.22)

5 Diskussion

5.1 Darstellung der erreichten Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertationsschrift wurde ein zelluläres *in-vivo* Testsystem entwickelt, mit dem es möglich wurde, direkt intrazelluläre Ceramid-vermittelte dynamische Prozesse unter Echtzeitbedingungen und ohne Zusatz von Substraten oder Kofaktoren zu beobachten. Dafür wurde mit Hilfe der vielversprechenden GFP-Fusions-Methodik eine Zelllinie transfiziert, die die PKC- α , ein literaturbekanntes Targetprotein des Ceramids, als Fusionsprotein mit EGFP stabil überexprimiert. Mit dieser EGFP-markierten PKC, die nach Anregung mit kurzweiligem Licht eine starke grüne Fluoreszenz emittiert, war es möglich, die Dynamik der PKC-Translokation als Reaktion auf seinen Modulator Ceramid als auch auf verschiedene andere Stimuli, die den SM-Signalweg aktivieren, direkt zu untersuchen. Bis zur Entwicklung dieser GFP-Fusions-Methode gab es keinen experimentellen Zugang, in lebenden Zellen dynamische Prozesse wie die PKC-Translokation unter physiologischen Bedingungen in Echtzeit zu verfolgen. Eine Ausnahme bildet lediglich die Anwendung von fluoreszenzmarkierten Verbindungen, die allerdings erstens die Aktivität der Phosphotransferase durch Bindung an die PKC verändern konnten, zweitens oft Probleme bezüglich der Membrangängigkeit aufwiesen und drittens als proteinbindende fluorophormarkierte Verbindungen eine veränderte Kinetik besitzen konnten [155]. Desweiteren können mit dem entwickelte Testsystem die durch Ceramid ausgelösten Wirkungen direkt untersucht werden. Andere Methoden wie die Bestimmung der Caspasenaktivierung, die Messung der proteolytischen Spaltung des Enzyms PARP oder die Messung der Apoptoseauslösung durch Anfärbung und/oder Auszählung der apoptotischen Zellen sind Testsysteme, bei denen Ceramidwirkungen lediglich indirekt anhand der ausgelösten Zellantworten gemessen werden. Dies bedeutet, dass diese Testsysteme immer auf biofunktionellen Prozessen beruhen, bei denen weitere Signalkaskaden und Interaktionen mit zusätzlichen zellulären Komponenten eine Rolle spielen. Das in dieser Dissertationsschrift etablierte Testmodell bietet damit zusammenfassend die folgenden Vorteile: Erstens bildet es ein hoch PKC-Isoenzym-spezifisches Messsignal ab, zweitens ermöglicht es eine sehr frühe und direkte Visualisierung der PKC- α Aktivierung *via* Translokation ohne Zellyse und eine Beobachtung dynamischer zellulärer Phänomene unter physiologischen Bedingungen und drittens kann es eine schnelle, effektive Testung und biologische Bewertung neuer Ceramid-analoger Verbindungen einschließlich anderer Stimuli und Inhibitoren des SM-Signalwegs

möglich machen. Durch diese Möglichkeit der detaillierten Untersuchung von Ceramid-vermittelten Effekten konnten wir ein tiefergehendes Verständnis in die Funktion des Lipidmediators Ceramid gewinnen, Ceramidanaloga testen und Inhibitoren des SM-Signalwegs charakterisieren (siehe Kapitel 5.2). Zudem wurden alle über das Testmodell erhaltenen Ergebnisse mittels Referenzmethoden (Western Blot und anerkannte Apoptose-Modelle) verifiziert.

5.2 Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift

5.2.1 Wirkung des Ceramids auf sein Targetprotein PKC- α

Der Abbau des membranintegrierten SM spielt eine wichtige Rolle für die Ceramid-vermittelte intrazelluläre Signalübertragung. Zahlreiche Studien zeigen, dass Ceramid, ein Produkt der SMase-Reaktion, als intrazellulärer *Second Messenger* fungiert und auch extrazelluläre Signale über die Aktivitätsveränderung verschiedener Targetproteine bis in den Zellkern transduziert. Eine Anzahl dieser Targetproteine wurde mit aufwendigen immunochemischen Methoden mit Hilfe fotolabiler Ceramidanaloga identifiziert [74, 83, 84, 156]. Als eines dieser spezifischen Targetproteine (Ceramid-bindende Proteine) gilt die Proteinkinase C [85, 86].

Bei der Untersuchung extrazellulärer Stimulanzen auf die PKC-Aktivität ist zum einen stets das Ausmaß der Translokation und zum anderen der Phosphorylierungsstatus als Anzeichen für den Aktivierungsstatus der jeweiligen Phosphotransferase zu berücksichtigen. Es ist unbestritten, dass der Regulation der Phosphorylierung und der Translokation eine wichtige Bedeutung für die PKC-Aktivität und deren Signaltransduktion zukommt [131]. So wird angenommen, dass eine Aktivierung der PKC durch eine direkte Translokation vom Zytosol an die Membran eingeleitet wird, wo sie durch ihren natürlichen Stimulator DAG aktiviert wird [103]. Man würde folglich erwarten, dass eine Aktivierung des Enzyms mit einer Translokation in Verbindung steht [85]. Dennoch ist es auch in Kenntnis detaillierter Arbeiten unklar, welcher Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsstatus der Kinase und deren Translokationsprozess besteht [131]. Dies zeigt die widersprüchliche Diskussion hinsichtlich der Wirkung des Ceramids auf die Aktivität seines Targetproteins PKC zum einen und dessen Translokation zum anderen.

Bezüglich der Wirkung auf die Aktivität berichten Studien von einer Inhibierung der PKC- α Aktivität durch kurzkettige Ceramide [131, 134]. Sie zeigen mittels PKC- α

Immunopräzipitation und anschließenden Western-Blot-Analysen bzw. Kinaseassays, dass eine *in-vivo* Behandlung von Molt-4 und L929 Zellen mit C₆-Ceramid über einen indirekten Mechanismus eine Dephosphorylierung mit nachfolgender Inaktivierung der PKC- α bewirkt, und führen dies auf eine Aktivierung der Ceramid-aktivierten Proteinphosphatasen (CAPP vgl. Einleitung 1.1.4) zurück, die eine Dephosphorylierung der PKC zur Folge haben. Andere Forschergruppen hingegen zeigten mittels Fotoaffinitätsmarkierungs-Tests, dass Ceramid *in-vivo* in intakten Mesangial-Zellen direkt an die PKC- α und PKC- δ bindet und deren Aktivität unterschiedlich beeinflusst: Sie bestätigten zuerst die Bindungsaffinität *in-vitro* an rekombinanter PKC- α und PKC- δ und bewiesen unter diesen Bedingungen zusätzlich, dass die PKC- β , - γ , - ϵ , und - ζ Isoenzyme keine direkten Targetproteine des Ceramids darstellen [85]. In diesem Zusammenhang konnten sie weiter durch *in-vitro* Kinaseaktivitätsmessungen zeigen, dass Ceramid eine Aktivitätssteigerung der rekombinanten PKC- α bewirkt. Diese Aktivitätssteigerung durch Ceramid und Phosphatidylserin (PS) als Kofaktor ist vergleichbar mit der des DAG und PS. Die Aktivität der PKC- δ , - ϵ und - ζ Isoenzyme allerdings wurde von Ceramid nicht verändert und die PKC- δ zeigte *in-vitro* durch die Einwirkung von Ceramid sogar eine Abnahme des Autophosphorylierungsstatus [85]. Müller und Kollegen dagegen postulierten, dass Ceramid die PKC- ζ aktiviert. Sie untersuchten dies an U-937 Zellen und demonstrierten, dass Ceramid *in-vivo* und *in-vitro* die Phosphorylierung und Autophosphorylierung der PKC- ζ stimuliert und zeigten gleichzeitig mittels eines [¹⁴C]Ceramid-*in-vitro*-Bindungsassays, dass dies auf eine direkte Bindung des Ceramids an die PKC- ζ zurückzuführen ist [86].

Demgegenüber wird auch der Effekt des Ceramids auf die Translokation der PKC-Isoformen unterschiedlich diskutiert. So zeigen *in-vivo* Studien mit HL-60, U-937 und HPB-ALL Zelllinien nach Auswertung der fraktionierten Zelllysate mittels Western-Blot-Analyse, dass Ceramid eine Translokation der PKC- δ und PKC- ϵ von der Membran ins Zytosol induziert und dass diese Translokation auch durch endogene Ceramidgenerierung durch Behandlung der Zellen mit bakterieller SMase oder externen Stimuli (TNF- α , anti-Fas Antikörper) erzielt wird [125]. Studien von Galve Roperh und Kollegen mit Primärkulturen von Astrozyten ergaben für Ceramid mittels immunozytochemischen Nachweisen eine Induktion der PKC- ζ Translokation in Zellkernnähe [157]. Andere Studien widerlegen die Ergebnisse beider Forschergruppen und zeigen durch Konfokallaserscanmikroskop-Untersuchungen mit GFP-fusionierter PKC- δ , PKC- ϵ und PKC- ζ in HeLa Zellen bzw. CHO-K1 Zellen, dass die Isoformen δ und ϵ nach C₂-Ceramid bzw. C₆-Ceramidbehandlung im Bereich des Golgi-

Apparats akkumulieren [143,158] und die PKC- ζ auch nach 60-minütiger Inkubation mit Ceramid keinerlei Änderung ihrer Translokation zeigt [143].

Auch die Erkenntnisse bezüglich der Ceramidwirkung auf die Translokation der PKC- α sind kontrovers. Ein Hauptziel dieser vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe des etablierten *in-vivo* Testsystems zu untersuchen, in welcher Beziehung der Lipidmediator Ceramid und sein Effektorprotein PKC- α stehen. Während *in-vivo* Studien mit Mesangial-Zellen und anschließende Untersuchung der fraktionierten Zelllysate mittels Western Blot eine durch C₁₆-Ceramid induzierte Translokation der PKC- α vom Zytosol an die Membran postulierten [85], erhielten wir unter Anwendung des in dieser Arbeit etablierten *in-vivo* Modells an HepG22a1 Zellen folgendes Ergebnis: Weder C₁₆-Ceramid noch das kurzkettige C₆-Ceramid zeigten einen Effekt auf die Translokation des PKC- α -EGFP Fusionsproteins (vgl. Ergebnisse 3.2.2 Abb. 11). Diese Beobachtung konnte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops für eine Inkubationsdauer von 4 h festgestellt werden. Auch die von uns durchgeführten Western-Blot-Versuche zeigten dazu analoge Resultate (vgl. Ergebnisse 3.2.2 Abb. 12). Zur Untersuchung und Bestätigung der mikroskopisch erhaltenen Ergebnisse wählten wir in diesem Fall die Western-Blot-Methodik, da diese eine verlässliche Methode darstellt, Proteine mittels verschiedener Extraktionsmethoden nach ihrem Vorkommen in bestimmten Zellkompartimenten semiquantitativ zu bestimmen. Dazu wurde die zur Trennung des Zytosol- und Membranextrakts angewandte Methode nochmals verfeinert, indem ein zusätzlicher Waschschrift vor der Gewinnung der Proteine aus dem Membranextrakt eingeführt wurde. Dadurch waren die Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Extrakten deutlich differenziert sichtbar, da eine Verschleppung einer zu großen Menge an zytosolischem Protein in den Membranextrakt keine Eindeutigkeit der verschiedenen Bandenstärken bedeutet hätte (vgl. Ergebnisse 3.2.1 Abb. 10). Ähnliche Ergebnisse, hinsichtlich des Effekts des Ceramids auf die Translokation der PKC- α , erhalten auch andere Forschergruppen: Sawai und Kollegen zeigten durch Western-Blot-Analyse, dass HL-60 Zellen nach *in-vivo* Behandlung mit C₂-Ceramid keinerlei Änderung bezüglich der subzellulären Verteilung der cPKC (α , β II und γ) zeigen [125] und Kajimoto et al. wiesen mittels Mikroskopie und Immunocytochemie an HeLa Zellen nach, dass C₂-Ceramid die zelluläre Lokalisation eines PKC- α -GFP Fusionsproteins nicht beeinflusst [143].

Diese widersprüchlichen Ergebnisse hinsichtlich der Ceramidwirkung auf Aktivität und Translokation der PKC lassen sich vermutlich nicht nur auf unterschiedliche experimentelle Rahmenbedingungen und Versuchsmethoden zurückführen, sondern eventuell auch auf die gewählten Zeitpunkte und die analysierten Zelltypen. So zeigt eine kürzlich erschienene

Studie, dass C₂-Ceramid in CHO (*Chinese hamster ovary*) Zellen, aber nicht in MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) Zellen die Bindung der PKC- α an die Membranen verhindert [159]. Weiterhin berichten Signorelli und Kollegen [160], dass der von Lee et al. [131, 134] festgestellte inhibitorische Effekt des Ceramids auf die PKC- α Aktivität nur bei Langzeitbehandlung der Zellen mit C₆-Ceramid über mehrere Stunden nachzuweisen ist, dass C₆-Ceramid aber bei kurzzeitiger Behandlung weder die PKC inaktiviert noch eine Dephosphorylierung der für die Autophosphorylierung verantwortlichen Aminosäureteilsequenz (Thr⁵⁰⁰) verursacht.

Hinsichtlich der kontrovers diskutierten Interaktion zwischen dem Lipidmediator Ceramid und seinem Targetprotein PKC- α erhielten wir durch unsere Versuche im *in-vivo* Testmodell mit HepG22a1 Zellen folgendes Ergebnis: Ceramid führt zu einer reversen Translokation einer durch PMA translozierten PKC- α , indem es ein Ablösen der an die Membran gebundenen PKC- α induziert (vgl. Ergebnisse 3.3 Abb. 13). Den Mechanismus für diese Beobachtung versuchten wir mit den in der Literatur bereits beschriebenen Kenntnissen zu vereinen bzw. zu diskutieren: Keranen und Kollegen zeigten, dass das membrangebundene Enzym an drei Positionen phosphoryliert ist: Thr⁵⁰⁰ auf der Aktivierungsschleife (befähigt die PKC zur Autophosphorylierung), Thr⁶⁴¹ am Carboxylterminus (erhält die Autophosphorylierungsfähigkeit aufrecht), Ser⁶⁶⁰ am Carboxylterminus (reguliert die Assoziation der PKC an die Membran und spielt eine wichtige Rolle für die Membranaffinität) [161]. Da Lee und Kollegen [131] berichteten, dass C₆-Ceramid zu einer Dephosphorylierung und Inaktivierung der PKC- α führt und dafür eine Änderung des Phosphorylierungsstatus u. a. in Position Thr⁵⁰⁰ und Ser⁶⁶⁰ postulieren, könnte die Induktion der reversen Translokation der PKC- α durch die veränderte Affinität des Enzyms zur Membran erklärt werden. Allerdings untersuchten Signorelli und Kollegen [160], dass für eine durch C₆-Ceramid induzierte reverse Translokation sowohl eine aktive Kinase als auch eine Phosphorylierung in Position Thr⁶⁴¹ und Ser⁶⁶⁰ des Carboxylterminus vorliegen muss, wie sie an Studien mit Kinaseinhibitoren und nichtphosphorylierbaren PKC-Mutanten zeigten. Sie erklärten diesen Widerspruch zu Lee und Kollegen damit, dass Ceramid nur unter Langzeitbehandlung über mehrere Stunden (Lee und Kollegen inkubierten C₆-Ceramid für 14 h) zu einer Inaktivierung und Änderung des Phosphorylierungsstatus der PKC- α führt und dass dies bei Kurzzeitbehandlung, wie es zur Induktion der reversen Translokation ausreicht, nicht der Fall ist.

Unsere Ergebnisse und diese Erkenntnisse von Signorelli et al. deuten darauf hin, dass der Mechanismus, über den Ceramid auf sein Targetprotein PKC- α wirkt und damit zu einer

reversen Translokation führt, weitaus komplexer ist als der einfache Zusammenhang zwischen nicht mehr vorhandener Kinaseaktivität und Verlust des Autophosphorylierungsstatus, der die Assoziation des Enzyms an die Plasmamembran reguliert. So wäre es denkbar, dass die Bindung der PKC an die Membran eine zusätzliche Interaktion mit einem weiteren Proteinpartner erfordert, der durch die phosphorylierte und aktivierte PKC selbst phosphoryliert wird (oder auch nicht) und beide oder aber der Proteinpartner allein ein neues Target für die Ceramid-induzierte reverse Translokation geworden sind [160]. Für diese Hypothese käme eine Interaktion des Ceramids mit den so genannten RACKs in Frage (vgl. Einleitung 1.2.2), von denen angenommen wird, dass sie an die aktive Konformation der PKC binden und sie damit an der Membran verankern.

Um den Effekt des Ceramids auf die reverse Translokation der PKC- α weiter zu diskutieren, zogen wir außerdem eine Wirkung des Ceramids durch Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Erwägung. Es ist unbestritten, dass ein lokaler Anstieg an intrazellulären, freien Ca^{2+} -Ionen eine schnelle Translokation der PKC- α an die Membran nach sich zieht und dass diese Translokation im Gegensatz zur PMA-induzierten Translokation mit Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reversibel ist [127, 123] (vgl. Ca^{2+} -Bindedomäne (C2) der cPKC, Einleitung 1.2.1 Abb. 4). Sollte Ceramid eine reverse Translokation der PKC- α über eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirken, müsste es zu einer Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen postulieren allerdings, dass kurzkettige Ceramide über verschiedene Wege (Hemmung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers, Steigerung der Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) Konzentration oder Beeinflussung des Ryanodinrezeptor-regulierten Ca^{2+} -Speichers) zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen [162, 163, 164]. Darios und Kollegen inkubierten dafür mit C_2 -Ceramid mehrere Stunden und beobachteten einen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Peak etwa 1,5 h nach Beginn der Inkubation [164]. Ausgehend von den Erkenntnissen aus der vorliegenden Dissertationsschrift, dass Ceramid zu keiner Translokation der PKC- α vom Zytosol an die Membran führt (vgl. Ergebnisse 3.2.2 Abb. 11 und 12), lässt sich schlussfolgern, dass der Effekt des Ceramids auf den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für unsere Versuchsbedingungen nicht ausreicht, um eine Translokation der PKC- α an die Membran hervorzurufen, und dass die reverse Translokation nicht durch die Vermutung erklärt werden kann, Ceramid wirke über eine Absenkung der freien $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Als Ergebnis dieses Teils der vorliegenden Dissertationsschrift kann zusammengefasst werden: Ceramid aktiviert sein Targetprotein PKC- α nicht direkt zur Translokation, sondern löst vielmehr eine reverse Translokation eines bereits translozierten Enzyms aus, was

bedeutet, dass es durch Verdrängung der an die Membran gebundenen PKC- α in der Lage ist, Wirkungen bzw. Signaltransduktionen zu verhindern, die über die PKC- α vermittelt werden. Diese Erkenntnis kann bei noch tieferem Verständnis über die durch die PKC- α ausgelösten zellulären Prozesse möglicherweise bei der Konzeption neuer therapeutischer Ansätze und Definition interessanter Zielstrukturen genutzt werden.

5.2.2 Biologische Evaluierung des Scyphostatin-Analogons, eines nSMase-Inhibitors

Die Bestimmung und Untersuchung der biologischen Aktivität des Scyphostatin-Analogons, das im Unterschied zu seiner natürlichen Verbindung Scyphostatin eine vereinfachte Fettsäure besitzt und dem die Epoxidgruppe fehlt (Abb. 33), ergab folgendes Ergebnis.

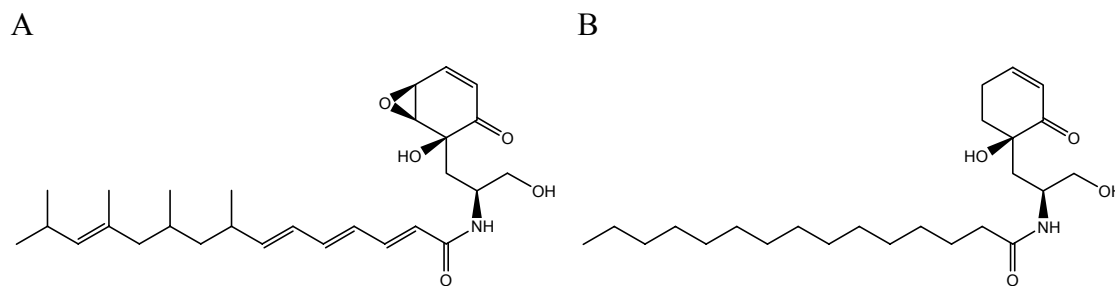


Abb.33 Strukturformeln des Scyphostatins (A) und Scyphostatin-Analogons (B).

Wir konnten zeigen, dass das Scyphostatin-Analogon nicht zytotoxisch ist und antiapoptotische Aktivität aufweist und dass seine Wirkungen Mg^{2+} -abhängig durch die nSMase vermittelt werden.

Den Nachweis, dass die Wirkungen des Scyphostatin-Analogons Mg^{2+} -abhängig durch die nSMase mediiert sind, erhielten wir zum einen mittels *in-vivo* Versuchen an M Φ und zum anderen mit dem in der vorliegenden Dissertationsschrift etablierten *in-vivo* Modell an transfizierten HepG2 Zellen. Das Scyphostatin-Analogon führte in M Φ zu einer Erniedrigung der endogenen Ceramidfreisetzung nach vorheriger Stimulation der nSMase-Aktivität durch Zusatz von mmLDL (vgl. Ergebnisse 3.5.2 Abb. 21). Um dies zu messen, bestimmten wir die intrazellulären Lipidkonzentrationen (SM und Cer) nach Extraktion mit der dafür gängigen Methode nach Bligh and Dyer [142]. Durch eine vorherige Inkubation der Zellen mit fluorophormarkiertem SM anhand der nach Martin et al. [141] etablierten Methode war erreicht worden, einen gewissen Prozentsatz an endogenem SM durch das fluoreszierende SM zu ersetzen, so dass eine einfache Auswertung der gewonnenen Lipidkonzentrationen mittels

HPLC und nachgeschaltetem Fluoreszenzdetektor möglich war. In einem zweiten *in-vivo* Versuch, ebenfalls an MΦ, konnten wir zeigen, dass das Scyphostatin-Analogon diese endogene Erniedrigung des Ceramidspiegels über die spezifische Inhibierung der nSMase erzielt (vgl. Ergebnisse 3.5.4 Abb. 24 und 25). Dafür lysierten wir zuvor mit dem Scyphostatin-Analogon behandelte MΦ unter für die nachfolgende SM-Hydrolyse spezifizierten Bedingungen. Im resultierenden Lysat konnten wir nach Zusatz eines fluorophormarkierten SM als Substrat für das Enzym die nSMase-Aktivität am Umsetzungsverhältnis SM/Cer mittels HPLC-Methodik messen. Die Verwendung eines nSMase-Reaktions- und Lysepuffers (10mM MgCl₂, pH 7,5) stellte sicher, dass der Umsatz von SM zu Cer lediglich auf die sphingolytische Aktivität der Mg²⁺-abhängigen nSMase zurückzuführen war. Diese spezifische Inhibierung des Scyphostatin-Analogons hinsichtlich der Mg²⁺-abhängigen nSMase konnten wir auch im HepG22aI Zellmodell bestätigen. Das Scyphostatin-Analogon vermochte Mg²⁺-abhängig die reverse Translokation der PKC-α zu hemmen, was darauf schließen lässt, dass es durch Hemmung der nSMase die endogene Ceramidgenerierung und damit die Ceramidwirkung auf die PKC-α verhindert (vgl. Ergebnisse 3.5.7 Abb. 29).

Zum Nachweis der antiapoptotischen Aktivität des Scyphostatin-Analogons nutzten wir anerkannte PCD (*programmed cell death*) Modelle [26]. Es gilt als erwiesen, dass die Aktivierung der SMasen genauso wie die *de novo* Synthese von Ceramid zu einer Steigerung des endogenen Ceramidspiegels führt und dies die Induzierung des Zelltods zur Folge hat [16, 70, 165]. So wirken Zytostatika nach diesem Mechanismus, sie induzieren Apoptose durch eine Steigerung der Ceramidgenerierung [166, 167]. Dabei wird angenommen, dass die nSMase bei der Zellantwort, insbesondere der Apoptose, eine essentielle Rolle spielt [69]. Die Anwendung von Testsystemen zur Apoptosemessung ist damit geeignet, die potentielle inhibitorische Wirkung des Scyphostatin-Analogons auf die nSMase und damit die Ceramidgenerierung zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass das Scyphostatin-Analogon sowohl die durch mmLDL als auch die durch TNF-α induzierte Apoptose zu hemmen vermag (vgl. Ergebnisse 3.5.3 Abb. 22 und 23). TNF-α und mmLDL gelten als potente Stimulatoren der nSMase und damit als Auslöser für Apoptoseprozesse [140].

Mit diesen Ergebnissen war das Scyphostatin-Analogon wie sein natürliches Derivat eindeutig als Inhibitor der nSMase charakterisiert. Durch ergänzende Versuche zur Untersuchung des Hemmmechanismus postulierten wir dafür eine direkte reversible Inhibierung des Enzyms. Dies leiteten wir daran ab, dass das Scyphostatin-Analogon *in-vitro* die Aktivität eines rohen Zellextrakts humaner Monozyten (SM-Umsatz 16,8 %) auf

vergleichbare Werte abzusenken vermochte, unabhängig davon, ob es zur Inhibierung vorinkubiert (SM-Umsatz 5,9 %) oder erst zusammen mit dem Substrat auf die Zellen gegeben wurde (SM-Umsatz 6,7 %). Das Scyphostatin-Analogon muss nach diesen Ergebnissen reversibel mit der aktiven Bindungsstelle des Enzyms interagieren. Bei einem irreversiblen Hemmmechanismus hätte eine Vorinkubation des Inhibitors zu einer stärkeren Absenkung der Aktivität führen müssen verglichen mit dem Aktivitätsverlust, der sich ohne Vorinkubation ergab. Um in diesem Versuchsansatz die Spezifität der Aktivitätsmessung auf die Mg^{2+} -abhängige nSMase sicherzustellen, wurden Mg^{2+} -Ionen zugesetzt, die zu einem fünffach gesteigerten SM-Umsatz des unbehandelten Rohextrakts führten (16,8 % vs. 3,2 %) und die Beteiligung der Mg^{2+} -abhängige nSMase an der gemessenen sphingolytischen Aktivität bewiesen (vgl. Ergebnisse 3.5.6 Abb. 27).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die fehlende Epoxidgruppe am Carbonring des Scyphostatin-Analogons für dessen biologische Wirkung auf die nSMase keine wesentliche strukturelle Voraussetzung darstellt und dass auch eine strukturelle Änderung der Fettsäureseitenkette ohne Verlust der inhibitorischen Aktivität möglich ist. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die erst kürzlich von einer Arbeitsgruppe berichtet wurden, die ebenfalls epoxidfreie Derivate des Scyphostatins als potente Inhibitoren für die aus Rattenhirnen isolierte nSMase untersuchten [168]. Sie postulieren für ihre Verbindungen allerdings einen irreversiblen Mechanismus und zeigen durch Einführen verschiedener Fettsäureseitenketten, dass eine ungesättigte Seitenkette die Affinität des Inhibitors gegenüber dem Enzym erhöht. Der Verzicht auf die Epoxidgruppierung kann zu chemisch stabilen Verbindungen führen, die möglicherweise eine gesteigerte metabolische Stabilität besitzen, so dass diese Verbindungen als pharmakophore Substanzen mit neuem Wirkprinzip nutzbar gemacht werden können bzw. *in-vivo* für die inhibitorische Wirkung ausreichend hohe Plasmaspiegel erreichbar sind, um die Rolle des Enzyms in *in-vivo* Experimenten noch näher zu charakterisieren.

5.2.3 Biologische Evaluierung verschiedener Ceramidanaloga

Ziel dieser Untersuchung sollte es weiterhin sein, Beiträge zu einer mutmaßlichen, aktiven Konformation des Lipidmediators Ceramid zu definieren und die biologische Aktivität abhängig von der Konformation zu analysieren. Die Ergebnisse würden rückschließend bestimmte biologische Aktivitäten zu definierten Ceramidkonformationen zuordnen lassen und zusätzliche Kenntnisse über die konformationsabhängige Signaltransduktion des Ceramids liefern, da über die konformationelle Kontrolle der biomolekularen Funktionen des

flexiblen Lipids nichts bekannt ist. Desweiteren sind Ceramidanaloga von besonderem Interesse, da sie für die Krebstherapie z. B. zur Apoptoseinduktion in Leukämiezellen [169] oder als Chemotherapeutika gegen Brustkrebs [170] eingesetzt werden und die Suche nach potentiellen proapoptisch wirkenden Ceramidanaloga wachsende Bedeutung erfährt [171, 172]. Für unsere Untersuchungen wurden im Rahmen einer bereits abgeschlossenen Dissertation an diesem Institut über 30 neue, heterozyklische, konformationell eingeschränkte Ceramidanaloga synthetisiert. Anhand des in dieser Dissertationsschrift aufgebauten und optimierten *in-vivo* Modells steht nun ein neues Testsystem zur Verfügung, ausgewählte Analoga schnell und leistungsfähig auf ihre Aktivität zu testen. Die dabei prototypisch getesteten Substanzen 36N, 39N, 40N als Diastereomerenmisch und dessen Diastereomere 40SS und 40SR sind in Abb. 34 dargestellt.

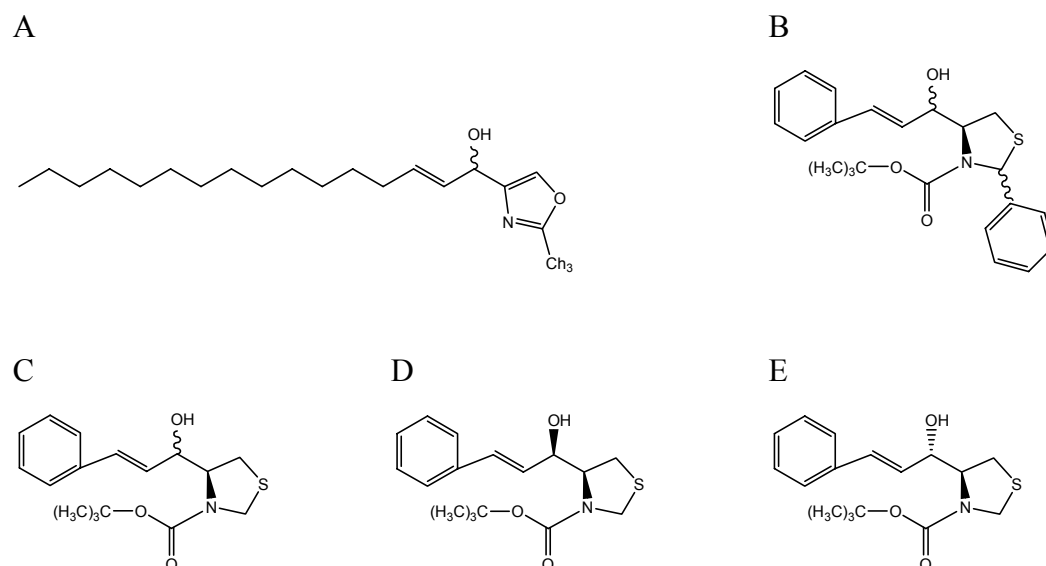


Abb.34 Strukturformeln der Ceramidanaloga 36N (A), 39N (B), 40N (C), 40SR (D), 40SS (E).

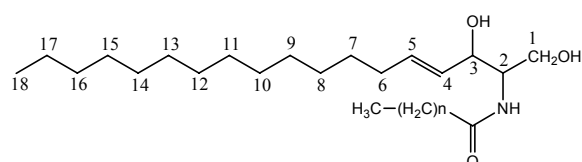


Abb.35 Strukturformel des Ceramidgrundgerüsts.

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität der Ceramidanaloga setzten wir diese nicht nur in dem von uns etablierten *in-vivo* Testsystem ein, sondern untersuchten zusätzlich deren Fähigkeit entsprechend den vielfältigen Ceramidwirkungen, Apoptose auszulösen.

Wir konnten zum einen zeigen, dass die Substanzen 36N und 39N im etablierten Testsystem dosisabhängig zu einer reversen Translokation der PKC- α vom membrangebundenen Zustand ins Zytosol führen, während 40N sowohl als Diastereomeregemisch als auch getrennt in die Diastereomere 40SS und 40SR keinen Ceramideffekt zeigte (vgl. Ergebnisse 3.4.1 Abb. 15). Diese Beobachtung konnte durch Western-Blot-Versuche bestätigt werden (vgl. Ergebnisse 3.4.1 Abb. 16). Zur Untersuchung der Analoga auf Apoptoseinduktion setzten wir, wie bereits für die Untersuchung des Scyphostatin-Analogons auf nSMase-Hemmung, das PCD-Modell an M Φ ein. Wir stellten fest, dass nur die Verbindungen 36N und 39N zu einer signifikanten Apoptoseinduktion vergleichbar mit der des Ceramids führten, wobei 39N einen um fast das zweifache gesteigerten Effekt ausübte (vgl. Ergebnisse 3.4.2 Abb. 18).

Diese Ergebnisse liefern einen Ansatz für Struktur-Wirkungs-Beziehungen: Es konnte bestätigt werden, dass die Amidgruppe des Ceramidgrundgerüsts (Abb. 35) für die Apoptoseinduktion nicht gefordert ist [173], da 36N diese funktionelle Gruppe nicht besitzt, in seiner Fähigkeit Apoptose auszulösen mit 183 % vs. 175 % für Ceramid (Apoptoserate der Kontrolle 100 % gesetzt, vgl. Ergebnisse 3.4.2 Abb. 18) allerdings nicht eingeschränkt ist. Zudem scheint die C(4)-C(5) Doppelbindung des Ceramids für die biologische Aktivität essentiell zu sein [174]. Dies ist konform mit den Untersuchungen von Struckhoff und Kollegen [170]. Sie verwendeten die Cytochrom C Freisetzung, den Verlust der Membranasymmetrie und die Veränderung des Membranpotentials als apoptoseinduzierende Prozesse, um die Effektivität verschiedener Ceramidanaloga zu analysieren. Sie konnten nachweisen, dass eine zusätzlich eingeführte C(6)-C(7) Doppelbindung zu einem sehr effektiven Ceramidanalogen führt, dass allerdings eine ledigliche Doppelbindungsverschiebung nach Pos. 6 und 7 einen Aktivitätsverlust gegenüber Ceramid bedeutet. Ein ebenfalls gegenüber Ceramid effektiveres Analogon erhielten sie durch Einführung einer C(4)-C(5) Dreifachbindung und Hydroxylierung in Pos. 6. Diese Ergebnisse würden schlussfolgern lassen, dass eine eingeschränkte Konformation des Ceramidgrundgerüsts eine Aktivitätssteigerung bezüglich Apoptoseinduktion bedeutet. Die Einführung eines zusätzlichen Phenylrings in Pos. 7 allerdings führte trotz Vorhandensein der 4,6-Dienstruktur zu einer gegenüber Ceramid stark verringerten Aktivität (ca. 50% des Ceramideffekts bei gleicher Konz.), so dass die C(4)-C(5) Doppelbindung nicht allein für die Aktivität verantwortlich gemacht werden kann. Dies ist wiederum konform mit unseren

Untersuchungen, da Substanz 40N über diese beiden Strukturelemente (Phenylring, C(4)-C(5) Doppelbindung) im Ceramidgrundgerüst verfügt, aber ebenfalls eine gegenüber Ceramid schwächere Apoptoseaktivität aufweist (153 % vs. 175 % Ceramid, Apoptoserate der Kontrolle 100 % gesetzt, vgl. Ergebnisse 3.4.2 Abb. 18). Im Widerspruch dazu steht demnach die von uns getestete Verbindung 39N. Sie besitzt wie Substanz 40N beide Strukturelemente, Phenylring in Pos. 5 und C(4)-C(5) Doppelbindung, zeigt allerdings in unserem angewandten PCD-Modell eine gegenüber Ceramid stark gesteigerte Aktivität (327 % vs. 175 % Ceramid, Apoptoserate der Kontrolle 100 % gesetzt, vgl. Ergebnisse 3.4.2 Abb. 18). In diesem Fall muss der zweite Phenylring am Fünfring der Substanz 39N die entscheidende Rolle für eine derart zu beobachtende Wirksamkeit spielen. Um allerdings definitive Aussagen machen zu können, müssen noch weitere derart konformationseingeschränkte Analoga nach dem gleichen Prinzip untersucht werden, da van Overmeire und Kollegen ebenfalls Ceramidanaloga mit aromatischen Ringen testeten und diese als sehr effektiv bezeichneten [175].

5.3 Fazit

Mit den gewonnenen Ergebnissen der vorliegenden Dissertationsschrift konnten wir die bereits vorhandenen Kenntnisse über den SM-Signaltransduktionsweg durch neue Einblicke in die durch den Lipidmediator Ceramid ausgelösten zellulären Prozesse erweitern und ein leistungsfähiges *in-vivo* Testsystem zur Verfügung stellen, mit dessen Hilfe die Ceramid signaltransduktion hinsichtlich extrazellulärer Stimulanzien, potentieller Inhibitoren oder zur Testung neuer Ceramidanaloga untersucht werden kann. Damit konnten und können neue Informationen erzielt werden, die die Rolle des Ceramids in den zahlreichen, von ihm modulierten, biologischen Effekten näher beleuchten und uns die Möglichkeit geben, auf welcher Stufe auch immer, durch Entwicklung neuer Substanzen modulierend in den Ceramidstoffwechsel einzugreifen. Dabei steht vor allem die durch Ceramid induzierte Apoptose im Blickpunkt, da sie die häufigste Zellantwort darstellt, die durch diesen Mediator vermittelt wird. Der programmierte Zelltod ist die häufigste Form des natürlichen Zelltods im Organismus ohne Entzündungsprozesse. Er dient der Beseitigung von Zellen, die ihre Aufgabe erfüllt haben, im Laufe der Embryonalentwicklung überflüssig geworden sind oder Fehler im Erbgut aufweisen. Ein Entgleisen aber des als Schutzmechanismus gedachten programmierten Zellsterbens liegt vielen Krankheiten zu Grunde und kann in zwei

Richtungen erfolgen: Erhöhte Apoptoseraten können zu unkontrolliertem Gewebsuntergang führen und werden z. B. bei Herzinfarkt, Schlaganfall, Rückenmarksläsionen, HIV-Infektionen oder neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson und Alzheimer beobachtet. Verminderte Apoptoseraten sind dagegen ein zentrales Problem von Krebs- und Autoimmunerkrankungen. Bei einem besseren Verständnis über die Mechanismen des molekularen Zelltods, bei dem Ceramid durch Auslösung der apoptogenen Kaskaden (Cytochrom C Freisetzung, Aktivierung von Caspasen, PARP-Spaltung, DNA-Abbau) zweifelsohne eine bedeutende Rolle spielt, könnte man in der Lage sein, in die jeweils andere Richtung gegenzusteuern, um so die aufgeführten Krankheiten besser behandelbar zu machen. Dies allein macht deutlich, wie wichtig und nötig es ist, die Signaltransduktionswege des Lipidmediators Ceramid und deren Gesetzmäßigkeiten besser zu verstehen und noch genauer zu untersuchen, ein Ziel, dem wir mit dieser vorliegenden Arbeit ein Stück näher gekommen sind: Wir konnten 1) den Signaltransduktionsweg des Ceramids hinsichtlich seiner Wirkung auf die PKC- α im HepG22aI Zellmodell näher charakterisieren und damit neue Ansätze für mögliche Interventionen in pathogene Prozesse liefern, die über die PKC- α transduziert werden, 2) konnten wir durch die Charakterisierung von Ceramidanaloga im *in-vivo* Zellmodell die Möglichkeit eröffnen, neuartige Verbindungen zu entdecken und zu entwickeln, die zur Induktion von Apoptose in Krebszellen eingesetzt werden und aggressives Tumorstadium verhindern könnten [170, 176] und 3) war es uns möglich, durch die Evaluierung eines nSMase-Inhibitors eine neue synthetische Verbindung zu charakterisieren, die aufgrund der offensichtlichen Beteiligung der nSMase an der intrazellulären Ceramidgenerierung eine neue Möglichkeit darstellt, in den Ceramid-signaltransduktionsweg hemmend einzugreifen und damit antiinflammatorisch, antineurodegenerativ oder antiapoptotisch zu wirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Kolter, T., and K. Sandhoff, Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen, 1999, *Angew. Chemie*, 111, 1632-1670
2. Kolesnick, R. N., and M. Krönke, Regulation of ceramide production and apoptosis, 1998, *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 643-665
3. Brann, A. B., R. Scott, Y. Neuberger, D. Abulafia, S. Boldin, M. Fainzilber, and A. H. Futerman, Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons, 1999, *J. Neurosci.*, 19, 8199-8206
4. Hannun, Y. A., The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 3125-3128
5. Hannun, Y. A., Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress, 1996, *Science*, 274, 1855-1859
6. Hannun, Y. A., and L. M. Obeid, The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 25847-25850
7. Jayadev, S., B. Liu, A. E. Bielawska, J. Y. Lee, F. Nazaire, M. Pushkareva, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Role for ceramide in cell cycle arrest, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 2047-2052
8. Obeid, L. M., C. M. Linardic, L. A. Karolak, and Y. A. Hannun, Programmed cell death induced by ceramide, 1993, *Science*, 259, 1769-1771
9. Okazaki, T., A. Bielawska, R. M. Bell, and Y. A. Hannun, Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha 25-dihydroxyvitamin d3-induced HL-60 cell differentiation, 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 15823-15831
10. Venable, M. E., J. Y. Lee, M. J. Smyth, A. Bielawska, and L. M. Obeid, Role of ceramide in cellular senescence, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 30701-30708
11. Kirtikara, K., S. J. Lauderkind, R. Raghov, T. Kanekura, and L. R. Ballou, An accessory role for ceramide in interleukin-1beta induced prostaglandin synthesis, 1998, *Mol. Cell. Biochem.*, 181 (1-2), 41-48
12. Jayadev, S., H. L. Hayter, N. Andrieu, C. J. Gamard, B. Liu, R. Balu, M. Hayakawa, F. Ito, and Y. A. Hannun, Phospholipase A2 is necessary for tumor necrosis factor alpha-induced ceramide generation in L929 cells, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272 (27), 17196-17203

13. Kolesnick, R., The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway, 2002, *J. Clin. Investig.*, 110, 3-8
14. Claus R., S. Russwurm, M. Meisner, R. Kinscherf, and H. P. Deigner, Modulation of the ceramide level, a novel therapeutic concept?, 2000, *Current Drug Targets*, 1, 185-205
15. Hannun, Y. A., C. Luberto, and K. M. Argraves, Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling, 2001, *Biochemistry*, 40 (16), 4893-4903
16. Mathias, S., L. A. Pena, and R. N. Kolesnick, Signal transduction of stress via ceramide, 1998, *Biochem. J.*, 335, 465-480
17. Cuvillier, O., G. Pirianov, B. Kleuser, P. G. Vanek, O. A. Coso, S. Gutkind, and S. Spiegel, Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate, 1996, *Nature*, 381 (6585), 800-803
18. Tavarini, S., L. Colombaioni, M. Garcia-Gil, Sphingomyelinase metabolites control survival and apoptotic death in SH-SY5Y neuroblastoma cells, 2000, *Neurosci. Lett.*, 285, 185-188
19. Levade, T., and J. P. Jaffrézou, Signaling sphingomyelinases: which, where, how and why?, 1999, *Biochem. Biophys. Acta*, 1438 (1), 1-17
20. Goni, F. M., and A. Alonso, Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity, 2002, *FEBS*, 531, 38-46
21. Simon, C. G., S. Chatterjee, and A. R. Gear, Sphingomyelinase activity in human platelets, 1998, *Thromb. Res.*, 90 (4), 155-161
22. Tabas, I., Secretory sphingomyelinase, 1999, *Chem. Phys. Lipids*, 102, 123-130
23. Lee, J. Y., L. G. Leonhardt, and L. M. Obeid, Cell-cycle-dependent changes in ceramide levels preceding retinoblastoma protein dephosphorylation in G₂/M, 1998, *Biochem. J.*, 334, 457-461
24. Xu, J., C.-H. Yeh, S. Chen, L. He, S. L. Sensi, L. M. T. Canzoniero, D. W. Choi, and C. Y. Hsu, Involvement of *de novo* ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 16521- 16526
25. Higuchi, M., S. Singh, J. P. Jaffrézou, and B. B. Aggarwal, Acidic sphingomyelinase-generated ceramide is needed but not sufficient for TNF-induced apoptosis and nuclear factor- κ B, 1996, *J. Immunol.*, 156, 297-304

26. Deigner, H. P., R. Claus, G. A. Bonaterra, C. Gehrke, N. Bibak, M. Blaess, M. Cantz, J. Metz, and R. Kinscherf, Ceramide induces aSMase expression: implications for oxLDL-induced apoptosis, 2001, *FASEB J.*, 15, 807-814
27. Liu, B., and Y. A. Hannun, Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 16281-16287
28. Marathe, S., S. L. Schissel, M. J. Yellin, N. Beatini, R. Mintzer, K. J. Williams, and I. Tabas, Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 4081-4088
29. Schissel, S. L., X. Jiang, J. Tweedie-Hardman, T. Jeong, E. H. Camejo, J. Najib, J. H. Rapp, K. J. Williams, and I. Tabas, Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 2738-2746
30. Schissel, S. L., J. Tweedie-Hardman, J. H. Rapp, G. Graham, K. J. Williams, and I. Tabas, Rabbit aorta and human atherosclerotic lesions hydrolyze the sphingomyelin of retained low-density lipoprotein. Proposed role for arterial-wall sphingomyelinase in subendothelial retention and aggregation of atherogenic lipoproteins, 1996, *J. Clin. Invest.*, 98 (6), 1455-1464
31. Takahashi, T., T. Abe, T. Sato, K. Miura, I. Takahashi, M. Yano, A. Watanabe, S. Imashuku, and G. Takada, Elevated sphingomyelinase and hypercytokinemia in hemophagocytic lymphohistiocytosis, 2002 Jun.-Jul., *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 24 (5), 401-404
32. Gorska, M., E. Baranczuk, and A. Dobrzyn, Secretory Zn^{2+} -dependent sphingomyelinase activity in the serum of patients with type 2 diabetes is elevated, 2003 Aug., *Horm. Metab. Res.*, 35 (8), 506-507
33. Okazaki, T., A. Bielawska, N. Domae, R. M. Bell, and Y. A. Hannun, Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269 (6), 4070-4077
34. Visnjic, D., D. Batinic, and H. Banfic, Different roles of protein kinase C α and δ isoforms in the regulation of neutral sphingomyelinase activity in HL-60 cells, 1999, *Biochem. J.*, 344, 921-928

35. Tomiuk, S., M. Zumbansen, and W. Stoffel, Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275 (8), 5710-5717
36. Tomiuk, S., K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, and W. Stoffel, Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (7), 3638-3643
37. Neuberger, Y., H. Shogomori, Z. Levy, M. Fainzilber, and A. H. Futerman, A lysoplatelet activating factor phospholipase C, originally suggested to be a neutral-sphingomyelinase, is located in the endoplasmic reticulum, 2000, *FEBS*, 469 (1), 44-46
38. Chatterjee, S., H. Han, S. Rollins, and T. Cleveland, Molecular cloning, characterization, and expression of a novel human neutral sphingomyelinase, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 37407-37412
39. Nara, F., M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, and T. Ogita, Scyphostatin a neutral sphingomyelinase inhibitor from a discomycete, *Trichopeziza mollissima*: Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation, and physico-chemical properties, 1999, *J. Antibiot.*, 52, 525-530
40. Arenz, C., M. Thutewohl, O. Block, H. Waldmann, H. J. Altenbach, and A. Giannis, Manumycin A and its analogues are irreversible inhibitors of neutral sphingomyelinase, 2001, *Chembiochem*, 2 (2), 141-143
41. Uchida, R., H. Tomoda, M. Arai, and S. Omura, Chlorogentisylquinone, a new neutral sphingomyelinase inhibitor, produced by a marine fungus, 2001, 54 (11), 882-889
42. Martin, S. F., C. Gomez-Diaz, P. Navas, and J. M. Villalba, Ubiquinol inhibition of neutral sphingomyelinase in liver plasma membrane: specific inhibition of the Mg^{2+} -dependent enzyme and role of isoprenoid chain, 2002, 297 (3), 581-586
43. Amtmann, E., W. Baader, and M. Zoller, Neutral sphingomyelinase inhibitor C11AG prevents lipopolysaccharide-induced macrophage activation, 2003, *Drugs Exp. Clin. Res.*, 29 (1), 5-13
44. Duan, R. D., T. Bergmann, N. Xu, J. Wu, Y. Cheng, J. Duan, S. Nelander, C. Palmberg, and A. Nilsson, Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family, 2003, *J. Biol. Chem.*, 278 (40), 38528-38536

45. Duan, R. D., Y. Cheng, G. Hansen, E. Hertervig, J. J. Liu, I. Syk, H. Sjostrom, and A. Nilsson, Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase, 2003, *J. Lipid Res.*, 44 (6), 1241-1250
46. Hertervig, E., A. Nilsson, J. Bjork, R. Hultkrantz, and R. D. Duan, Familial adenomatous polyposis is associated with a marked decrease in alkaline sphingomyelinase activity: a key factor to the unrestrained cell proliferation?, 1999, *Br. J. Cancer*, 81 (2), 232-236
47. Liu, B., L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Sphingomyelinases in cell regulation, 1997, *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 8 (3), 311-322
48. Linardic, C. M., and Y. A. Hannun, Identification of a distinct pool sphingomyelin involved in the sphingomyelin cycle, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 23530-23537
49. Liu, B., D. F. Hassler, G. K. Smith, K. Weaver, and Y. A. Hannun, Purification and characterization of a membrane bound neutral pH optimum magnesium-dependent and phosphatidylserin-stimulated sphingomyelinase from rat brain, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 34472-34479
50. Jayadev, S., C. M. Linardic, and Y. A. Hannun, Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor α , 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 5757-5763
51. Liu, B., N. Andrieu-Abadie, T. Lzhang, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 11313-11320
52. Tanaka, M., F. Nara, K. Suzuki-Konagai, T. Hosoya, and T. Ogita, Structural elucidation of scyphostatin, an inhibitor of membrane-bound neutral sphingomyelinase, 1997, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 7871-7872
53. Arenz, C., and A. Giannis, Synthesis of the first selektive irreversible Inhibitor of neutral sphingomyelinase, 2001, *Eur. J. Org. Chem.*, 137-140
54. Müller, Stefan, Synthese und Struktur-Wirkungs-Abhängigkeiten von therapeutisch interessanten Naturstoffanaloga wie Furanfettsäuren und Scyphostatin, Dissertation, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Chemie, Universität Heidelberg, 2000
55. Zhang, Y., P. Mattjus, P. C. Schmid, Z. Dong, S. Zhong, W. Y. Ma, R. E. Brown, A. M. Bode, H. H. Schmid, and Z. Dong, Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in UVA-induced apoptosis, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 11775-11782

56. Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. N. Kolesnick, Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis, 1996, *Nature*, 380, 75-79
57. Sturm, J. C., G. W. Small, S. B. Paug, and L. W. Daniel, 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 15493-15497
58. Bose, R., M. Verheij, A. Haimovitz-Friedman, K. Scotto, Z. Fuks, and R. Kolesnick, Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals, 1995, *Cell*, 82, 405-414
59. Kolesnick, R. N., A. Haimovitz-Friedman, and Z. Fuks, The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation, 1994, *Biochem. Cell. Biol.*, 72 (11-12), 471-474
60. Santana, P., L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks, and R. Kolesnick, Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis, 1996, *Cell*, 86, 189-199
61. Okazaki, T., R. M. Bell, and Y. A. Hannun, Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation, 1989, *J. Biol. Chem.*, 264, 19076-19080
62. Kim, M. Y., C. Linardic, L. Obeid, and Y. A. Hannun, Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 484-489
63. Dressler, K. A., S. Mathias, and R. N. Kolesnick, Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system, 1992, *Science*, 255, 1715-1718
64. Mathias, S., A. Younes, C. C. Kan, I. Orlow, C. Joseph, and R. N. Kolesnick, Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta, 1993, *Science*, 259, 519-522
65. Brann, A. B., R. Scott, Y. Neuberger, D. Abulafia, S. Boldin, M. Fainzilber, and A. H. Futerman, Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons, 1999, *J. Neurosci.*, 19, 8199-8206

66. Dobrowsky, R. T., M. H. Werner, A. M. Castellino, M. V. Chao, and Y. A. Hannun, Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor, 1994, *Science*, 265, 1596-1599
67. Cifone, M. G., R. De Maria, P. Roncaioli, M. R. Rippo, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni, and R. Testi, Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase, 1994, *J. Exp. Med.*, 180, 1547-1552
68. Tepper, A. D., J. G. Cock, E. de Vries, J. Borst, and W. J. van Blitterswijk, CD95/Fas-induced ceramide formation proceeds with slow kinetics and is not blocked by caspase-3/ CPP32 inhibition, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 24308-24312
69. Sawai, H., and Y. A. Hannun, Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses, 1999, *Chem. Phys. Lipids*, 102, 141-147
70. Hannun, Y. A., and C. Luberto, Ceramide in the eukaryotic stress response, 2000, *Trends Cell Biol.*, 10, 73-80
71. Kolesnick, R. N., F. M. Goni, and A. Alonso, Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects, 2000, *J. Cell. Physiol.*, 184, 285-300
72. Mathias, S., K. A. Dressler, and R. N. Kolesnick, Characterization of a ceramide-activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor α , 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10009-10013
73. Liu, J., S. Mathias, Z. Yang, and R. N. Kolesnick, Renaturation and tumor necrosis factor- α stimulation of a 97-kDa ceramide-activated protein kinase, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269, 3047-3052
74. Huwiler, A., J. Brunner, R. Hummel, M. Vervoordeldonk, S. Stabel, H. van den Bosch, and J. Pfeilschifter, Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6959-6963
75. Zhang, Y., B. Yao, S. Delikat, S. Bayoumy, X. H. Lin, S. Basu, M. McGinley, P. Y. Chan-Hui, H. Lichenstein, and R. Kolesnick, Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase, 1997, *Cell*, 89 (1), 63-72
76. Dobrowsky, R. T., and Y. A. Hannun, Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 5048-5051
77. Dobrowsky, R. T., C. Kamibayashi, M. C. Mumby, and Y. A. Hannun, Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 15523-15530

78. Chalfant, C. E., K. Kishikawa, A. Bielawska, and Y. A. Hannun, Analysis of ceramide-activated protein phosphatases, 2000, *Methods Enzymol.*, 312, 420-428
79. Dbaibo, G. S., M. Y. Pushkareva, S. Jayadev, J. K. Schwarz, J. M. Horowitz, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1347-1351
80. Perry, D. K., and Y. A. Hannun, The role of ceramide in cell signaling, 1998, *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 233-243
81. Westwick, J. K., A. E. Bielawska, G. Dbaibo, Y. A. Hannun, and D. A. Brenner, Ceramide activates the stress-activated protein kinases, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22689-22692
82. Heinrich, M., M. Wickel, W. Schneider-Brachert, C. Sandberg, J. Gahr, R. Schwandner, T. Weber, P. Saftig, C. Peters, J. Brunner, M. Krönke, and S. Schütze, Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide, 1999, *EMBO J.*, 18 (19), 5252-5263
83. Huwiler, A., B. Johansen, A. Skarstad, and J. Pfeilschifter, Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A₂ and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release, 2001, *FASEB J.*, 15, 7-9
84. Elsen, L., R. Betz, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, and G. van Echten-Deckert, Identification of ceramide binding proteins in neuronal cells: a critical point of view, 2002, *Neurochem. Res.*, 27 (7-8), 717-727
85. Huwiler, A., D. Fabbro, and J. Pfeilschifter, Selective ceramide binding to protein kinase C- α and - δ isoenzymes in renal mesangial cells, 1998, *Biochem.*, 37, 14556-14562
86. Müller, G., M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro, and K. Pfizenmaier, PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid, 1995, *EMBO J.*, 14, 1961-1969
87. Lozano, J., E. Berra, M. M. Municio, M. T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz, and J. Moscat, Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269 (30), 19200-19202
88. Wickel, M., M. Heinrich, T. Weber, J. Brunner, M. Krönke, and S. Schütze, Identification of intracellular ceramide target proteins by affinity chromatography and TID-ceramide photoaffinity labelling, 1999, *Biochem. Soc. Trans.*, 27, 393-399

89. Smyth, M. J., D. K. Perry, J. Zhang, G. G. Poirier, Y. A. Hannun, and L. M. Obeid, prICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2, 1996, *Biochem J.*, 316, 25-28
90. Yoshimura, S., Y. Banno, S. Nakashima, K. Takenaka, H. Sakai, Y. Nishimura, N. Sakai, S. Shimizu, Y. Eguchi, Y. Tsujimoto, and Y. Nozawa, Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. Inhibitory effects of Bcl-2 on ceramide formation and caspase-3 activation, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273 (12), 6921-6927
91. Monney, L., R. Olivier, I. Otter, B. Jansen, G. G. Poirier, and C. Borner, Role of an acidic compartment in tumor-necrosis-factor-alpha-induced production of ceramide, activation of caspase-3 and apoptosis, 1998, *Eur. J. Biochem.*, 251 (1-2), 295-303
92. Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J.-L. Vayssière, and B. Mignotte, The biochemistry of programmed cell death, 1995, *FASEB J.*, 9, 1277-1287
93. Koopman, G., C. P. M. Reutelingsperger, G. A. M. Kuijten, R. M. J. Keehnen, S. T. Pals, and M. H. J. van Oers, Annexin V for flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis, 1994, *Blood*, 84, 1415-1420
94. Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzell, D. R. Green, and D. D. Newmeyer, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, 1997, *Science*, 275, 1132-1136
95. Carter, W. O., P. K. Narayanan, and J. P. Robinson, Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells, 1994, *J. Leukocyte Biol.*, 55, 253-258
96. Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T.-I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang, Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked, 1997, *Science*, 275, 1129-1132
97. Kumari, S. R., H. Mendoza-Alvarez, and R. Alvarez-Gonzalez, Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M_r 85,000 proteolytic fragment, 1998, *Cancer Res.*, 58, 5075-5078
98. Amato, A. A., C. E. Jackson, S. Lampkin, and K. Kagan-Hallet, Myofibrillar myopathy: no evidence of apoptosis by TUNEL, 1999, *Neurology*, 52 (4), 861-863

99. Deschesnes, R. G., J. Huot, K. Alerie, and J. Landry, Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation, 2001, *Mol. Biol. of the Cell*, 12, 1569-1582
100. Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka, Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters, 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (13), 7847-7851
101. Azzi, A., D. Boscoboinik, and C. Hensey, The protein kinase C family, 1992, *Eur. J. Biochem.*, 208 (3), 547-557
102. Newton, A. C., Protein kinase C: structure, function, and regulation, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 28495-28498
103. Newton, A. C., Regulation of protein kinase C, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 161-167
104. Johannes, F. J., J. Prestle, S. Eis, P. Oberhagemann, and K. Pfizenmaier, PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269 (8), 6140-6148
105. Mochly-Rosen, D., Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction, 1995, *Science*, 268, 247-251
106. Goodnight, J., H. Mischak, W. Kolch, and J. F. Mushinski, Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 Fibroblasts, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 9991-10001
107. Haller, H., J. I. Smallwood, and H. Rasmussen, Protein kinase C translocation in intact vascular smooth muscle strips, 1990, *Biochem. J.*, 270, 375-381
108. Kraft, A. S., W. B. Anderson, H. L. Cooper, and J. J. Sando, Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of ELA4 thymoma cells, 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, 13193-13196
109. Orr, J. W., L. M. Keranen, and A. C. Newton, Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol, 1992, 267 (22), 15263-15266
110. Schechtman, D., and D. Mochly-Rosen, Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction, 2001, *Oncogene*, 20 (44), 6339-6347
111. Mochly-Rosen, D., and A. S. Gordon, Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity, 1998, *FASEB J.*, 12, 35-42

112. Zegers, M. M. P., J. W. Kok, and D. Hoekstra, Use of photoactivatable sphingolipid analogues to monitor lipid transport in mammalian cells, 1997, *Biochem. J.*, 328, 489-498
113. Shimomura, O., F. H. Johnson, and Y. Saiga, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, 1962, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-227
114. Morin, J. G., and J. W. Hastings, Energy transfer in a bioluminescent system, 1971, *J. Cell. Physiol.*, 77 (3), 313-318
115. Morise, H., O. Shimomura, F. H. Johnson, and J. Winant, Intermolecular energy transfer on the bioluminescent system of *Aequorea*, 1974, 13 (12), 2656-2662
116. Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Wad, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, 1992, *Gene*, 111, 229-233
117. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, 1994, *Science*, 263, 802-805
118. Haseloff, J., and B. Amos, GFP in plants, 1995, *Trends Genet.*, 11, 328-329
119. Olson, K. R., J. R. McIntosh, and J. B. Olmstead, Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras, 1995, *J. Cell. Biol.*, 130, 639-650
120. Niswender, K. D., S. M. Blackman, L. Rohde, M. A. Magnuson, and D. W. Piston, Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits, 1995, *J. Microbiol.*, 180 (2), 109-116
121. Cormack, B. P., R. Valdivia, and S. Falkow, FACS-optimized mutants of green fluorescent protein (GFP), 1996, *Gene*, 173, 33-38
122. Yang, T. T., L. Cheng, and S. R. Kain, Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein, 1996, *Nucleic Acids Res.*, 24 (22), 4592-4593
123. Sakai, N., K. Sasaki, N. Ikegaki, Y. Shirai, Y. Ono, and N. Saito, Direct visualization of the translocation of the γ -subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein, 1997, *J. Cell. Biol.*, 139, 1465-1476
124. Wang, Q. J., D. Bhattacharyya, S. Garfield, K. Nacro, V. E. Marquez, and P. M. Blumberg, Differential localization of protein kinase C δ by phorbol esters and related

- compounds using a fusion protein with green fluorescent protein, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 37233-37239
125. Sawai, H., T. Okazaki, Y. Takeda, M. Tashima, H. Sawada, M. Okuma, S. Kishi, H. Umehara, and N. Domae, Ceramide-induced translocation of protein kinase C δ and ϵ to the cytosol, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 2452-2458
126. Wagner, S., C. Harteneck, F. Hucho, and K. Buchner, Analysis of the subcellular distribution of protein kinase C α using PKC-GFP fusion proteins, 2000, *Exp. Cell Res.*, 258, 204-214
127. Maasch, C., S. Wagner, C. Lindschau, G. Alexander, K. Buchner, M. Gollasch, F. C. Luft, and H. Haller, Protein kinase C α targeting is regulated by temporal and spatial changes in intracellular free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$, 2000, *FASEB J.*, 14, 1653-1663
128. Almholt, K., P. O. G. Arkhammar, O. Thastrup, and S. Tullin, Simultaneous visualization of the translocation of protein kinase C α -green fluorescent protein hybrids and intracellular calcium concentrations, 1999, *Biochem. J.*, 337, 211-218
129. Khalil, R. A., C. Lajoie, and K. G. Morgan, In situ determination of $[Ca^{2+}]_i$ threshold for translocation of the alpha-protein kinase C isoform, 1994, *Am. J. Physiol.*, 266, C1544-C1551
130. Trilivas, I., P. M. McDonough, and J. H. Brown, Dissociation of protein kinase C redistribution from the phosphorylation of its substrates, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 8431-8438
131. Lee, J. Y., Y. A. Hannun, and L. M. Obeid, Functional dichotomy of protein kinase C (PKC) in tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction in L929 cells, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 29290-29298
132. Bosca, L., and F. Moran, Circular dichroism analysis of ligand-induced conformational changes in protein kinase C. Mechanism of translocation of the enzyme from the cytosol to the membranes and its implications, 1993, *Biochem. J.*, 290, 827-832
133. Wang, Y. M., M. L. Seibenhener, M. L. Vandenplas, and M. W. Wooten, Atypical PKC zeta is activated by ceramide, resulting in coactivation of NF-kappaB/JNK kinase and cell survival, 1999, *J. Neurosci. Res.*, 55, 293-302
134. Lee, J. Y., Y. A. Hannun, and L. M. Obeid, Ceramide inactivates cellular protein kinase C alpha, 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 13169-13174

135. Luberto, C., D. S. Yoo, H. S. Suidan, G. M. Bartoli, and Y. A. Hannun, Differential effects of sphingomyelin hydrolysis and resynthesis on the activation of NF-kappa B in normal and SV40-transformed human fibroblasts, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 14760-14766
136. Lallena, M. J., M. T. Diaz-Meco, G. Bren, C. V. Paya, and J. Moscat, Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms, 1999, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2180-2188
137. Vertegaal, A. C., H. B. Kuiperij, S. Yamaoka, G. Courtois, A. J. van der Eb, and A. Zantema, Protein kinase C-alpha is an upstream activator of the IkappaB kinase complex in the TPA signal transduction pathway to NF-kappaB in U2OS cells, 2000, *Cell Signal*, 12, 759-768
138. Trushin, S. A., K. N. Pennington, A. Algeciras-Schimmich, and C. V. Paya, Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 22923-22931
139. Le, Huu Phuoc, Synthesen, chemische Reaktionen und Analytik Benzotriazolyl-Triazolylsubstituierter 2H-Aza-benzimidazole sowie Synthese und biologische Aktivität von konformationsstabilisierten Ceramid-Analoga, Dissertation, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Abteilung Chemie, Universität Heidelberg, 2001
140. Loidl, A., R. Claus, H. P. Daigner, and A. Hermetter, High-precision fluorescence assay for sphingomyelinase activity of isolated enzymes and cell lysates, 2002, *J. Lipid Res.*, 43, 815-823
141. Martin, O. C., and R. E. Pagano, Internalization and sorting of a fluorescent analogue of glucosylceramide to the golgi apparatus of human skin fibroblasts: utilization of endocytic and nonendocytic transport mechanisms, 1994, *J. Cell Biol.*, 125, 769-781
142. Bligh, E. G., and W. J. Dyer, Rapid method of total lipid extraction and purification, 1959, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917
143. Kajimoto, T., S. Ohmori, Y. Shirai, N. Sakai, and N. Saito, Subtype-specific translocation of the δ subtype of protein kinase C and its activation by tyrosine phosphorylation induced by ceramide in HeLa cells, 2001, *Mol. Cell. Biol.*, 21, 1769-1783

144. Sharma, R. P., Q. He, and V. J. Johnson, Deletion of IFN-gamma reduces fumonisin-induced hepatotoxicity in mice via alterations in inflammatory cytokines and apoptotic factors, 2003, *J. Interferon Cytokine Res.*, 2003, 23 (1),13-23
145. Hong, D. H., J. Huan, B. R. Ou, J. Y. Yeh, T. C. Saido, P. R. Cheeke, and N. E. Forsberg, Protein kinase C isoforms in muscle cells and their regulation by phorbol ester and calpain, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1267 (1), 45-54
146. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 1976, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
147. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, 1970, *Nature*, 227, 680-685
148. Burnette, W. N., "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, 1981, *Anal. Biochem.*, 112 (2), 195-203
149. Chung, B. H., T. Wilkinson, J. C. Geer, and J. P. Segrest, Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor, 1980, *J. Lipid Res.*, 21, 284-291
150. Himber, J., E. Buhler, D. Moll, and U. K. Moser, Low density lipoprotein for oxidation and metabolic studies. Isolation from small volumes of plasma using a tabletop ultracentrifuge, 1995, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 65, 137-142
151. Greenspan, P., and R. L. Gutman, Detection by Nile red of agarose gel electrophoresed native and modified low density lipoprotein, 1993, *Electrophoresis*, 14, 65-68
152. Rumsey, S. C., A. F. Stucchi, R. J. Nicolosi, H. N. Ginsberg, R. Ramakrishnan, and R. J. Deckelbaum, Human plasma LDL cryopreserved with sucrose maintains in vivo kinetics indistinguishable from freshly isolated human LDL in cynomolgus monkeys, 1994, *J. Lipid Res.*, 35, 1592-1598
153. Lowry, O. H., N. J. Rosenbourg, A. L. Farr, and R. J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, 1951, *J. Biol. Chem.*, 193, 165-175
154. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchonic acid, 1985, *Anal. Biochem.*, 150, 76-80

155. Chatelut, M., M. Leruth, K. Harzer, A. Dagan, S. Marchesini, S. Gatt, R. Salvayre, P. Courtoy, and T. Levade, Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue, 1998, *FEBS*, 426, 102-106
156. Schütze, S., M. Wickel, M. Heinrich, S. Winoto-Morbach, T. Weber, J. Brunner, and M. Krönke, Use of affinity chromatography and TID-ceramide photoaffinity labeling for detection of ceramide-binding proteins, 2000, *Enzymol.*, 312, 429-438
157. Galve-Roperh, I., A. Haro, and I. Diaz-Laviada, Ceramide-induced translocation of protein C zeta in primary cultures of astrocytes, 1997, *FEBS Lett.*, 415 (3), 271-274
158. Kashiwagi, K., Y. Shirai, M. Kuriyama, N. Sakai, and N. Saito, Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277 (20), 18037-18045
159. Abousalham, A., T. C. Hobman, J. Dewald, M. Garbutt, and D. N. Brindley, Cell-permeable ceramides preferentially inhibit coated vesicle formation and exocytosis in Chinese hamster ovary compared with Madin-Darby canine kidney cells by preventing the membrane association of ADP-ribosylation factor, 2002, *Biochem. J.*, 361, 653-661
160. Signorelli, P., C. Luberto, and Y. A. Hannun, Ceramide inhibition of NF- κ B activation involves reverse translocation of classical protein kinase C (PKC) isoenzymes: requirement for kinase activity and carboxyl-terminal phosphorylation of PKC for the ceramide response, 2001, *FASEB J.*, 15, 2401-2414
161. Keranen, L. M., E. M. Dutil, and A. C. Newton, Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations, 1995, *Curr. Biol.*, 5, 1394-1403
162. Condrescu, M., and J. P. Reeves, Inhibition of sodium-calcium exchange by ceramide and sphingosine, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276 (6), 4046-4054
163. Kobrinsky, E., A. I. Spielman, S. Rosenzweig, and A. R. Marks, Ceramide triggers intracellular calcium release via the IP₃ receptor in *Xenopus laevis* oocytes, 1999, *Am. J. Physiol.*, 277 (4 Pt 1), C665-672
164. Darios, F., N. Lambeng, J. D Troadec, P. P. Michel, and M. Ruberg, Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death, 2003, *J. Neurochem.*, 84 (4), 643-654
165. Irie, F., and Y. Hirabayashi, Application of exogenous ceramide to cultured rat spinal motoneurons promotes survival or death by regulation of apoptosis depending on its concentrations, 1998, *J. Neurosci. Res.*, 54, 475-485

166. Jaffrézou, J. P., T. Levade, A. Bettaieb, N. Andrieu, C. Bezombes, N. Maestre, S. Vermeersch, A. Rousse, and G. Laurent, Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis, 1996, *EMBO J.*, 15, 2417-2424
167. Zhang, J., N. Alter, J. C. Reed, C. Borner, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5325-5328
168. Pitsinos, E. N., V. Wascholowski, S. Karaliota, C. Rigou, E. A. Couladouros, and A. Giannis, Synthesis and evaluation of three novel scyphostatin analogues as neutral sphingomyelinase inhibitors, 2003, *ChemBioChem*, 4, 1223-1225
169. Kondo, T., T. Matsuda, T. Kitano, A. Takahashi, M. Tashima, H. Ishikura, H. Umehara, N. Domae, T. Uchiyama, and T. Okazaki, Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275 (11), 7668-7676
170. Struckhoff, A. P., R. Bittman, M. E. Burow, S. Clejan, S. Elliott, T. Hammond, Y. Tang, and B. S. Beckman, Novel ceramide analogs as potential chemotherapeutic agents in breast cancer, 2004, *J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, 309, 523-532
171. Chun, J., H. S. Byun, G. Arthur, and R. Bittman, Synthesis and growth inhibitory activity of chiral 5-hydroxy-2-N-acyl-(3E)-sphingenes: ceramides with an unusual sphingoid backbone, 2003, *J. Org. Chem.*, 68, 355-359
172. Macchia, M., S. Barontini, S. Bertini, V. Di Bussolo, S. Fogli, E. Giovannetti, E. Grossi, F. Minutolo, and R. Danesi, Design, synthesis, and characterization of the antitumor activity of novel ceramide analogues, 2001, *J. Med. Chem.*, 44, 3994-4000
173. Karasavvas, N., R. K. Erukulla, R. Bittman, R. Lockshin, Z. Zakeri, Stereospecific induction of apoptosis in U937 cells by N-octanoyl-sphingosine stereoisomers and N-octyl-sphingosine. The ceramide amide group is not required for apoptosis, 1996, *Eur. J. Biochem.*, 236, 729-737
174. Bielawska, A., H. M. Crane, D. Liotta, L. M. Obeid, and Y. A. Hannun, Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-dihydroceramide, 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 26226-26232
175. Van Overmeire, I., S. Boldin, K. Venkataraman, R. Zisling, S. De Jonghe, S. Van Calenbergh, D. De Keukeleire, A. Futerman, and P. Herdewijn, Synthesis and

- biological evaluation of ceramide analogues with substituted aromatic rings or an allylic fluoride in the sphingoid moiety, 2000, *J. Med. Chem.*, 43, 4189-4199
176. Selzner, M., A. Bielawska, M. A. Morse, H. A. Rüdiger, D. Sindram, Y. A. Hannun, and P. A. Clavien, Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer, 2001, *Cancer Res.*, 61, 1233-1240