

**Differentielle Effekte von Ceramiden  
auf verschiedene Isoformen  
der Adenylyl Cyclase**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biochem. Angela Bösel**

geboren am 15. Februar 1967 in Celle

**2000**

Referent: Prof. Dr. W. H. Müller

Korreferent: Prof. Dr. K. Resch

Tag der Promotion: 28. November 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1995 bis März 1999 am Institut für Physiologische Chemie II in den Medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Prof. Dr. T. Pfeuffer durchgeführt.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen habe ich nicht benutzt. Diese Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form weder als Diplomarbeit verwendet noch bei einer anderen Institution eingereicht.

Hannover, im März 2001

---

## Abstract

Adenylyl cyclases from higher organisms are regulated inter alia by phosphorylation via protein kinase C and A. Ceramides, recently discovered as lipid second messengers, are reported to stimulate different effector systems, e.g. a concentration and time dependent increase of the intracellular cAMP level has been shown. A proline directed protein kinase (CAP kinase), a serine/threonine protein phosphatase (CAP phosphatase) and protein kinase C  $\zeta$  have been identified as direct targets of ceramides. Experiments concerning the development of a test system and investigation of a possible signalling pathway regarding the stimulation of adenylyl cyclase type II by ceramide yielded the following results:

After stimulation with exogenous ceramide HEK 293 cells, stably expressing adenylyl cyclase type II (AC II), showed an enhanced activity of AC II more than 100-fold (max. after 8 hours). The stimulatory effect was dependent on the chain length of the ceramide derivatives. The naturally occurring ceramide derivative (a mixture of C<sub>18</sub> and C<sub>24</sub> ceramides) was the most potent analog, whereas short-chain ceramides (e.g. C<sub>2</sub>) were almost without effect. Long-chain fatty acids and -amides led to enhanced activity of AC II as well. Unexpectedly, the dihydroxy derivatives of ceramides, generally serving as non-activating controls, exhibited only slightly lower stimulation than the ceramides themselves (60 to 80 %). The stimulatory effect of ceramide was not restricted to AC II, although the type I and type V enzymes were effected less dramatically.

Additionally, activation of AC II was achieved by increasing the endogenous ceramide level, on the one hand by addition of a sphingolmyelinase to the culture medium (7.4-fold stimulation), on the other hand by use of the ceramidase inhibitor D-*e*-MAPP (2.7-fold stimulation).

Furthermore, ceramides and the phorbol ester TPA operated synergistically regarding activation of AC II. While the PKC inhibitor BIM was without effect on the ceramide-induced increase of AC II activity, staurosporine, an inhibitor of PKC as well, further enhanced enzymatic activity. These results suggest that classical and novel PKC subforms are probably not involved in the effect of ceramides on adenylyl cyclase type II.

The action of ceramides on AC II was at least partially inhibited (40 – 70 %) by ocadaic acid (inhibitor of protein phosphatase type 2A), suggesting involvement of a protein phosphatase 2A in the investigated reaction. Using suitable *inhibitors* involvement of a protein phosphatase type 2B (*Cyclosporin A*) and a protein Tyrosine phosphatase (*Na-o-Vanadat*) resp. could largely be excluded.

Key words: Adenylyl cyclase type II, Ceramide, Phorbol ester, Ocadaic acid

---

## Zusammenfassung

Adenylyl Cyclasen höherer Organismen werden u.a. durch Phosphorylierung verschiedener Kinasen wie den Proteinkinasen C und A reguliert. Der in jüngerer Zeit entdeckte „Lipid-Second-Messenger“ Ceramid stimuliert verschiedene Effektorsysteme, u.a. konnte ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels gezeigt werden. Als direkte Zielproteine von Ceramid sind bisher eine Prolin-, „directed“ Proteinkinase (CAP Kinase), eine Serin/Threonin Proteinphosphatase (CAP Phosphatase) und die Proteinkinase C  $\zeta$  bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Etablierung eines Testsystems und Untersuchung eines möglichen Signalweges bei der Wirkung von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II erbrachten folgende Resultate:

Stabil in HEK 293 Zellen exprimierte Adenylyl Cyclase Typ II (AC-II) zeigte nach Stimulation mit exogen zugeführtem Ceramid eine über 100fach erhöhte Aktivität (Maximum nach 8 h). Dieser stimulatorische Effekt war von der Kettenlänge des Ceramids abhängig. Das Gemisch natürlicher Ceramide ( $C_{18/24}$ ) löste die stärkste Aktivierung der AC-II aus, wohingegen kurzkettige Ceramide ( $C_2$ ) nahezu ohne Effekt waren. Ebenso wurde die ACII-Aktivität auch durch langkettige Fettsäuren sowie Fettsäureamide stimuliert. Entgegen der Erwartung zeigten Dihydro-Ceramide, die u.a. als Negativkontrollen bezüglich Ceramid-vermittelter Effekte eingesetzt werden, einen nur wenig geringeren Effekt als ihre ungesättigten Gegenstücke (60-80 % der Aktivität). Zusätzlich zur AC-II wurden ebenfalls die Isoformen I und V, wenn auch in wesentlich geringerem Maße, durch Ceramid stimuliert.

Die Aktivierung der AC-II konnte ebenfalls durch Anhebung des endogenen Ceramid-Spiegels erreicht werden, zum einen durch Zugabe von Sphingomyelinase zum Kulturmedium (7,4fache Stimulation gegenüber Kontrollzellen), zum anderen durch Einsatz des Ceramidase-Inhibitors D-e-MAPP (2,7fache Stimulation).

Der Phorbolster TPA führte mit Ceramid zu einer synergistischen Aktivierung der AC-II. Der PKC-Inhibitor BIM hatte auf die Ceramid-vermittelte Erhöhung der ACII-Aktivität keinen Einfluß, wohingegen durch Staurosporin, ebenfalls ein Inhibitor der Proteinkinase C, die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II weiter potenziert wurde. Diese Ergebnisse lassen die Beteiligung klassischer oder neuer PKC's an der Übermittlung des stimulierenden Effektes von Ceramid auf die AC-II eher unwahrscheinlich erscheinen.

Die Ceramid-vermittelte Aktivierung der AC-II konnte durch Okadainsäure (Inhibitor der Proteinphosphatase 2A) partiell inhibiert werden (40 – 70 %), was darauf schließen läßt, daß eine PP2A an der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Reaktion zumindest teilweise beteiligt ist. Durch Einsatz geeigneter *Inhibitoren* konnte die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2B (*Cyclosporin A*) bzw. einer Tyrosinphosphatase (*Na-o-Vanadat*) weitgehend ausgeschlossen werden.

Schlagworte: Adenylyl Cyclase Typ II, Ceramid, Phorbolster, Okadainsäure

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Signaltransduktion.....	1
1.2	Der „second messenger“ cAMP.....	1
1.3	Der Adenylyl Cyclase Komplex.....	2
1.3.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	3
1.3.2	Heterotrimere G-Proteine .....	3
1.3.3	Katalytische Untereinheit .....	5
1.4	Signaltransduktion durch Phospholipide.....	7
1.5	Ausgangslage und Ziel der Arbeit.....	12
2	Material und Methoden .....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Chemikalien und Geräte .....	13
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	15
2.1.3	Radiochemikalien .....	16
2.1.4	Enzyme .....	16
2.1.5	Biologisches Material .....	16
2.1.5.1	Zelllinien.....	16
2.1.5.2	Antikörper.....	17
2.1.5.3	Gewebe .....	17
2.1.5.4	Bakterienstamm .....	17
2.1.6	Vektor und cDNA-Klone.....	17
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Methoden der Zellkultivierung .....	17
2.2.1.1	Adhäsionskulturen .....	17
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	18
2.2.1.3	Bestimmung von Zellzahl und -vitalität .....	19
2.2.2	Stimulation von Zellen .....	19
2.2.3	Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität <i>in vitro</i> .....	19
2.2.3.1	Membranpräparation von HEK 293 Zellen.....	19
2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	20
2.2.3.3	Aktivitätstest.....	21

2.2.4	Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität in permeabilisierten HEK 293 Zellen	22
2.2.4.1	Vortest zur Permeabilisierung	22
2.2.4.2	Zellpermeabilisierung und Aktivitätstest	23
2.2.5	Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität <i>in vivo</i>	24
2.2.5.1	Tritium-Adenin-Test	24
2.2.5.2	Herstellung von [ <sup>32</sup> P]cAMP	25
2.2.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.2.7	Westernblot	27
2.2.7.1	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen	27
2.2.7.2	Immunologischer Nachweis durch Chemilumineszenz	27
2.2.7.3	Färbung von Westernblots mit Ponceau Rot	29
2.2.8	Bestimmung des Einbaus von [ <sup>32</sup> P]-ortho-Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II	29
2.2.8.1	Markierung von HEK 293 ACII Zellen mit [ <sup>32</sup> P]H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	29
2.2.8.2	Solubilisierung der markierten HEK 293 ACII Zellen und DNA-Abbau	30
2.2.8.3	Immunpräzipitation von Adenylyl Cyclase Typ II nach Lyse der Zellen	31
2.2.8.3.1	Kovalente Vernetzung von BBC-4 an Pansorbin	31
2.2.8.3.2	Immunpräzipitation von Adenylyl Cyclase Typ II unter denaturierenden Bedingungen	32
2.2.8.4	Bestimmung der spezifischen Aktivität von [ <sup>32</sup> P]ATP	33
2.2.8.4.1	Vortest zur Bestimmung der Sättigungsbedingungen	34
2.2.8.4.2	Proteinkinase-Test zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von [ <sup>32</sup> P]ATP	34
2.2.8.5	Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung	35
2.2.9	Nachweis von Apoptose mit Hilfe des Anti-PARP-Antiserums	36
2.2.10	Heterologe Expression in HEK 293 Zellen	37
2.2.10.1	Transfektion von HEK 293 Zellen über Lipofektion	37
2.2.10.2	X-gal Färbung von pXMD-gal-transformierten HEK 293 Zellen	38
2.2.10.3	Herstellung einer stabilen Adenylyl Cyclase Typ V Linie in HEK 293 Zellen	38
2.2.11	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.11.1	Molekularbiologische Standardverfahren	39
2.2.11.2	Klonierungstechniken	39
2.2.11.2.1	Restriktionsverdau	39
2.2.11.2.2	5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	39
2.2.11.2.3	Ligation	40

2.2.11.2.4	Herstellung kompetenter Zellen .....	40
2.2.11.2.5	Transformation durch Elektroporation .....	40
2.2.11.3	Nukleinsäurepräparationen .....	42
2.2.11.3.1	Plasmid-DNA-Minipräparation .....	41
2.2.11.3.2	Plasmid-DNA-Maxipräparation .....	41
2.2.11.3.3	DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen .....	42
2.2.11.4	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren .....	42
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Stimulierung der Adenylyl Cyclasen Typ I, II und V durch Ceramid.....	43
3.1.1	Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid <i>in vivo</i> .....	43
3.1.1.1	Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II.....	43
3.1.1.2	Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid <i>in vivo</i> ...	47
3.1.1.3	Einfluß von Ceramid auf die Zellvitalität von HEK 293 ACII Zellen .....	48
3.1.1.3.1	Nachweis von Zelltod mittels Trypanblaufärbung .....	48
3.1.1.3.2	PARP-Antikörper zur Indikation von Apoptose .....	49
3.1.1.4	Wirkung des Phosphodiesterasehemmers IBMX auf die Ceramid stimulierte cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen.....	51
3.1.2	Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch verschiedene Ceramid- und Dihydroceramid-Derivate .....	53
3.1.3	Ausweitung der Ergebnisse auf weitere Subtypen der Adenylyl Cyclase.....	54
3.1.3.1	Herstellung einer stabilen ACV Zelllinie in HEK 293 .....	55
3.1.3.2	Einfluß von Ceramid auf die basale sowie die Forskolin-stimulierte Aktivität verschiedener Adenylyl Cyclasen <i>in vivo</i> .....	57
3.1.4	Einfluß von Ceramid auf die Hormon-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität .....	58
3.2	Einfluß von C <sub>18/24</sub> -Ceramid auf die <i>in vitro</i> Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II.....	59
3.3	Stimulation der HEK 293 ACII Aktivität durch C <sub>18/24</sub> -Ceramid in permeabilisierten Zellen .....	61
3.3.1	Vortest zur Permeabilisierung .....	62
3.3.2	Zellpermeabilisierung von mit Ceramid stimulierten HEK 293 ACII Zellen und anschließende Bestimmung der ACII-Aktivität .....	63
3.4	Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch endogen gebildetes Ceramid .....	64
3.4.1	Untersuchung des Effektes von bakterieller Sphingomyelinase auf die Aktivität der AC-II.....	64
3.4.2	Einfluß des Ceramidase-Inhibitors MAPP auf die HEK 293 ACII Aktivität.....	68



3.5	Wirkung von langkettigen Fettsäuren und Fettsäureamiden auf die HEK 293 ACII Aktivität .....	69
3.6	Einfluß verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität.....	72
3.6.1	Betrachtung von Isotypen der Proteinkinase C in HEK 293 ACII Zellen.....	72
3.6.1.1	Nachweis endogen vorkommender Isoformen der PKC in HEK 293 ACII Zellen über Westernblot.....	72
3.6.1.2	Ceramid-induzierte Translokation von PKC $\iota$ und $\lambda$ ins Cytosol .....	74
3.6.2	Synergismus der Stimulation der HEK 293 ACII Aktivität zwischen Ceramid und Staurosporin.....	75
3.6.3	Einfluß des Proteinkinase C Inhibitors Bisindolylmaleimid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität.....	77
3.6.4	Synergistische Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch Ceramid und Phorbol ester .....	79
3.7	Wirkung unterschiedlicher Protein-Phosphatase-Inhibitoren auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II.....	81
3.7.1	Partielle Hemmung der Wirkung von Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II durch Inhibitoren der ProteinPhosphatase 2A .....	81
3.7.1.1	Okadainsäure .....	82
3.7.1.2	Calyculin A.....	84
3.7.2	Einfluß des Protein-Phosphatase-2B Inhibitors Cyclosporin A auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII-Aktivität .....	85
3.7.3	Wirkung des Tyrosin Phosphatase Inhibitors Na- <i>o</i> -Vanadat auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II .....	87
3.8	Einfluß weiterer Effektoren auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität .....	89
3.8.1	Wirkung von Cycloheximid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität..	89
3.8.2	Untersuchungen zum Einfluß von H-89 auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität .....	90
3.8.3	Wirkung von Pertussistoxin auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation mit Ceramid .....	92
3.9	Partielle Stimulierung des Einbaus von [ $^{32}$ P]- <i>ortho</i> -Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation durch Ceramid .....	93
3.9.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität von [32P]-ATP.....	94
3.9.2	Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung .....	95

4	Diskussion.....	97
4.1	Aktivierung der Adenylyl Cyclase durch Ceramid.....	97
4.1.1	Ceramid aktiviert die AC-II.....	97
4.1.2	Aktivierung der AC-II durch endogen gebildetes Ceramid.....	100
4.1.3	Ceramid stimuliert die AC-Isoformen I und V.....	102
4.1.4	Ceramid induziert Zelltod.....	103
4.1.5	Weitere Testsysteme.....	105
4.2	Ceramid und die Proteinkinase C.....	106
4.2.1	PKC $\zeta$ .....	106
4.2.2	Getrennte, aber gleichgerichtete Signalwege von Ceramid und Proteinkinase C....	107
4.3	Beteiligung einer Proteinphosphatase an der Ceramid-vermittelten Aktivierung der AC-II?.....	110
4.4	Aktivierung der AC-II durch langkettige Fettsäuren und Fettsäureamide.....	113
4.5	Beteiligung neu synthetisierter Proteine an der Ceramid-vermittelten Aktivierung der AC-II?.....	115
4.6	Ausblick.....	116
5	Zusammenfassung.....	118
6	Abkürzungen.....	120
7	Literaturverzeichnis.....	123

# 1 Einleitung

## 1.1 Signaltransduktion

Die Bildung vielzelliger Organismen machte es notwendig, Mechanismen der Kommunikation zwischen Zellen zu entwickeln. Zellen empfangen extrazelluläre Signale und verarbeiten sie zu intrazellulären Informationen. Die Signalübertragung ins Innere der Zelle erfolgt in Kaskaden, deren Einzelreaktionen in der Regel sequentiell ablaufen und an denen mehrere Signalproteine beteiligt sind. Im wesentlichen sind hier drei verschiedene Signaltransduktionsmechanismen zu unterscheiden.

Beim ersten binden die extrazellulären Signalmoleküle wie niedermolekulare Botenstoffe oder Proteine (z.B. Hormone und Neurotransmitter) an spezifische Rezeptorproteine, die vorwiegend integrale Bestandteile der Plasmamembran sind. Die Signalweiterleitung von Transmembranrezeptoren ins Innere der Zelle erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen. Manche Transmembranrezeptoren besitzen eine Tyrosin-Kinase-Aktivität und sind so in der Lage, ihre Zielproteine spezifisch an Tyrosin-Resten zu phosphorylieren (z.B. der Insulinrezeptor). Andere wiederum wie der nicotinische Acetylcholinrezeptor fungieren als Ionenkanal und sind an der Weiterleitung elektrischer Signale beteiligt.

Einen zweiten Weg stellen die lipophilen und damit membrangängigen Steroid- und Schilddrüsenhormone dar, die im Cytosol an spezifische Rezeptoren binden.

Die dritte Möglichkeit bilden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. der  $\beta$ -adrenerge Rezeptor). Diese Familie der 7-Helix-Transmembranrezeptoren leitet ein extrazellulär ankommendes Signal (Hormon) über ein intrazelluläres GTP-bindendes Protein (G-Protein) an einen Effektor weiter. Wichtige Effektormoleküle sind Adenylyl Cyclasen, Phospholipasen sowie cGMP-spezifische Phosphodiesterasen. Die Aktivierung dieser Enzyme führt zur Konzentrationserhöhung bzw. -erniedrigung von „second messenger“-Molekülen wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Diacylglycerol (DAG), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die weitere spezifische Reaktionen auslösen.

## 1.2 Der „second messenger“ cAMP

Im weiteren soll das im Rahmen dieser Arbeit besonders interessierende Effektorsystem der Adenylyl Cyclase eingehender behandelt werden. Die Adenylyl Cyclasen katalysieren die Bildung von 3'-5'-cyclischem AMP (cAMP) aus intrazellulärem ATP. Das cAMP als Prototyp

eines „second messenger“ wirkt über die Aktivierung von Proteinkinasen des Typs A und ist auf diese Weise an der Regulation einer großen Anzahl von Hormonantworten und vielen anderen Stoffwechselprozessen wie z.B. der Kontraktionskraft und -frequenz des Herzmuskels, der Rückresorption von Wasser in der Niere, der Aggregation von Thrombozyten oder auch der Glykogenolyse und Lipolyse beteiligt. Eine andere Funktion von cAMP besteht in der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Durchtritts durch Kationenkanäle (z.B. bei der Geruchswahrnehmung in Säugern). Der cAMP-Synthese durch die Adenylyl Cyclase steht der Abbau bzw. die Inaktivierung durch Phosphodiesterasen gegenüber.

Die Aktivierung von Proteinkinasen des Typs A (PKA) durch cAMP beruht auf folgendem Mechanismus: Die PKA besteht aus vier Untereinheiten, zwei regulatorischen und zwei katalytischen, die im nicht aktivierten Zustand als Tetramer vorliegen. Ein Anstieg der cAMP-Konzentration bewirkt eine erhöhte Bindung von cAMP an spezifische Bindungsstellen auf den regulatorischen Untereinheiten der PKA. Die inhibitorisch wirkenden regulatorischen Untereinheiten dissoziieren daraufhin vom Tetramer ab. Die beiden katalytischen Untereinheiten sind nun in der Lage, Substratproteine an bestimmten Serin- und Threoninresten zu phosphorylieren und dadurch bestimmte Stoffwechselwege zu initiieren. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß aktivierte PKA die Funktion bestimmter nuklearer Faktoren reguliert, die an DNA-Sequenzen in Promoter-Regionen von cAMP-induzierbaren Genen binden. Die meisten dieser Gene besitzen eine oder mehrere cAMP-sensitive Elemente (cAMP-responsive elements, CREs) (Comb *et al.*, 1986; Montminy *et al.*, 1986; Borelli *et al.*, 1992). Alle bislang identifizierten CRE-bindenden Proteine (cAMP-responsive element binding proteins, CREBs) gehören zur bZip-Familie (basische Region/Leucin-Zipper) DNA-bindender Proteine und besitzen eine Reihe essentieller Phosphorylierungsstellen.

### 1.3 Der Adenylyl Cyclase Komplex

Das hormonsensitive Adenylyl Cyclase System besteht aus drei essentiellen, membran-gebundenen Komponenten, die gemeinsam eine Enzymkaskade bilden. Diese Kaskade besteht aus heptahelicalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für eine große Anzahl an Hormonen, Neurotransmittern und „autacoids“, stimulatorischen und inhibitorischen heterotrimeren G-Proteinen und der katalytischen Untereinheit selbst (Helmreich & Pfeuffer, 1985; Gilman, 1997).

### 1.3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

cAMP-regulierende Rezeptoren gehören der großen Genfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an, von denen bisher mehr als 300 Mitglieder identifiziert bzw. annähernd 200 vollständig oder fast vollständig sequenziert sind (Gudermann *et al.*, 1996). Die 400-600 Aminosäuren umfassenden Rezeptoren bestehen aus einer glykosylierten Polypeptidkette und besitzen als gemeinsames Strukturmotiv sieben hydrophobe,  $\alpha$ -helicale Transmembrandomänen (Dohlman *et al.*, 1991; Strader *et al.*, 1994).

Nach der Bindung von verschiedenen Neurotransmittern wie Adrenalin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin, aber auch von Peptidhormonen wie Somatostatin, Glucagon, Interleukin-8 oder verschiedener Cytokine, Prostanoiden und anderen Regulationsfaktoren (z.B. Thrombin) an die jeweiligen Rezeptoren wird das Signal über die Aktivierung eines G-Proteins in das Zellinnere übertragen. Neben den Adenylyl Cyclasen findet hier jedoch auch eine Interaktion mit anderen Effektorsystemen wie Phospholipase C und Kalium- oder Calciumkanälen statt (Stadel & Lefkowitz, 1989; Birnbaumer *et al.*, 1989).

Die Diversität und Selektivität der Rezeptor-G-Protein-Interaktion ist für die Vielfalt der vermittelten Signale verantwortlich. So konnten Rodbell *et al.* 1970 zeigen, daß die gleichen Adenylyl Cyclasen durch unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden können. Ebenso ist es möglich, daß derselbe Rezeptor verschiedene Signalwege aktiviert. Hierbei bindet er entweder an verschiedene G-Proteine (Offermanns *et al.*, 1994) oder aber an ein definiertes G-Protein, wobei die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins jeweils unterschiedliche Effektoren stimulieren (Gudermann *et al.*, 1996). Im ersteren Fall wird die Spezifität der Signalübertragung und das Hervorrufen verschiedener intrazellulärer Antworten dadurch erreicht, daß die unterschiedlichen Rezeptoren bestimmte Isoform-Kombinationen der G-Protein-Untereinheiten präferieren (Schmidt *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1993), deren Vorkommen in den verschiedenen Zelltypen stark variieren kann.

### 1.3.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: eine  $\alpha$ -Untereinheit von 39-52 kDa, eine  $\beta$ -Untereinheit von 35-39 kDa und eine  $\gamma$ -Untereinheit von 8 kDa, wobei die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten eine so hohe Affinität zueinander aufweisen, daß sie als funktionelle Einheit fungieren. Alle drei Untereinheiten zeigen eine große Diversität. So sind bei Säugetieren zur Zeit

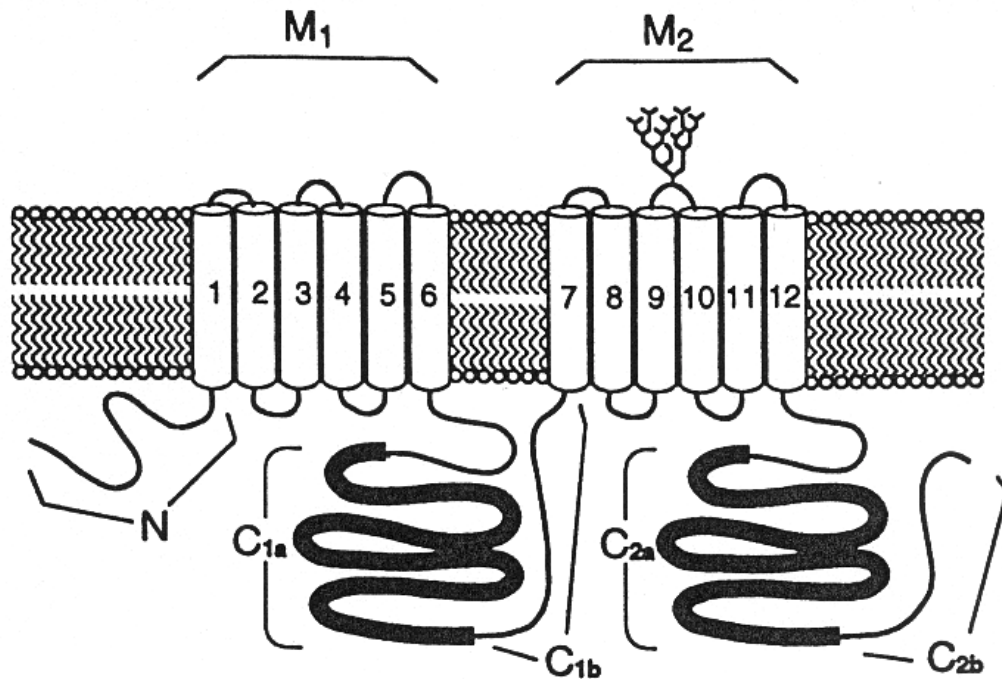
20 verschiedene Gene für  $\alpha$ -Untereinheiten, 6 für  $\beta$ -Untereinheiten und 12 für  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt (Clapham & Neer, 1997). Im Gegensatz zu den  $\gamma$ -Untereinheiten, die in ihrer Primärsequenz stark variieren (Cali *et al.*, 1992), ist die Sequenzhomologie bei den  $\alpha$ - (56-95 %) und  $\beta$ -Untereinheiten (ca. 80 %) sehr hoch (Levine *et al.*, 1990).

Nach Bindung eines Liganden an seinen korrespondierenden Rezeptor vermitteln G-Proteine die Aktivierung oder Inhibition der Adenylyl Cyclasen. Als eines der wichtigsten Hormone, welches die Produktion von cAMP anregt, ist das Adrenalin zu nennen. Nach Aktivierung eines G-Proteins durch einen Agonist-gebundenen Rezeptor erfolgt die Freisetzung von GDP aus der  $\alpha$ -Untereinheit (Mitglied der Familie der GTPasen) im Austausch mit GTP. Die Bindung von GTP führt ihrerseits zu Konformationsänderungen, die in der Dissoziation der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins von GTP- $\alpha$  resultieren. Auf diese Weise werden zwei makromolekulare Komplexe freigesetzt, die in der Lage sind, „downstream“-Effektoren zu regulieren.

Die wesentlichen Funktionen der Signalübertragung durch G-Proteine werden von den  $\alpha$ -Untereinheiten wahrgenommen. Anhand der Sequenzen dieser Untereinheiten lassen sich die G-Proteine in vier Subfamilien einteilen, die als  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  bezeichnet werden (Hepler & Gilman, 1992). Neben seiner Wirkung auf andere Effektoren wie z.B. Calciumkanäle oder calciumabhängige Kaliumkanäle (Hartzell & Fischmeister, 1992; Birnbaumer, 1993) vermittelt das stimulatorische G-Protein  $G_s$  in allen Geweben die Aktivierung der Adenylyl Cyclase. Das nachgeschaltete Signalprotein der  $G_q$ -Subfamilie ist überwiegend die Phospholipase C (Smrcka *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1992), welche durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) die Bildung der „second messenger“ Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ ) induziert. Die Mitglieder der  $G_i$ -Subfamilie zeigen die größte Vielfalt an regulierten Effektoren. Die inhibitorischen G-Proteine ( $G_i$ ) wurden als erstes mit der Inhibition einiger Isoformen der Adenylyl Cyclase in Verbindung gebracht. Desweiteren sind Isoformen der  $G_i$ -Proteine u.a. in der Lage, über die Stimulation der cGMP Phosphodiesterase die Signaltransduktion des Sehvorganges (Transducin –  $\alpha_t$ ) zu vermitteln (Stryer, 1991). Sie sind auch an der Geschmackswahrnehmung von Süß- und Bitterstoffen (Gustducin -  $\alpha_{gust}$ ) beteiligt (McLaughlin *et al.*, 1992). Für die Gruppe der  $G_{12}$ -Proteine ist eine Aktivierung durch Thromboxan- und Thrombin-Rezeptoren beschrieben. Die Effektormoleküle sind hier noch unbekannt.

Die regulatorischen Funktionen der  $\beta\gamma$ -Untereinheit wurden erst kürzlich beschrieben. Da die  $\gamma$ -Untereinheit isoprenyliert vorliegt, glaubte man, die Verankerung des G-Proteins in der

Plasmamembran sei ihre einzige Aufgabe. Heute weiß man jedoch, daß die durch die Aktivierung von G-Proteinen freigesetzten  $\beta\gamma$ -Untereinheiten u.a. sowohl bei der Stimulation als auch bei der Inhibition von Adenylyl Cyclasen eine wesentliche Rolle spielen (Tang & Gilman, 1991; Gao & Gilman 1991; Übersichtsartikel Clapham & Neer, 1993; Neer, 1995).



**Abb. 1** **Struktur der Adenylyl Cyclasen.** Die schematische Darstellung basiert auf Hydrophobizitätsanalysen der Aminosäuresequenzen. Die fettgedruckten Linien zeigen Bereiche hoher Homologie aller Isoformen aus Säugern an. N, aminoterminaler Abschnitt; M<sub>1</sub>, 1. transmembrane Region mit den Transmembranhelices 1-6; M<sub>2</sub>, 2. transmembrane Region mit den Transmembranhelices 7-12; C<sub>1a</sub>+C<sub>1b</sub>, 1. cytosolischer Loop; C<sub>2a</sub>+C<sub>2b</sub>, 2. Cytosolische Domäne (entnommen aus Taussig & Gilman, 1995).

### 1.3.3 Katalytische Untereinheit

Alle neun bislang klonierten Isoformen von Adenylyl Cyclasen in Säugetieren (Typ I-IX; 110 - 150 kDa) weisen eine hohe Sequenzhomologie (ca. 50 – 60 %) auf (Übersicht: Taussig & Gilman, 1995; Sunahara *et al.*, 1996). Die bisher aus Hydrophobizitätsanalysen ihrer Aminosäuresequenzen abgeleitete Topologie der Adenylyl Cyclasen zeigt einen kurzen cytoplasmatischen N-terminalen Abschnitt, gefolgt von sechs durch kurze Loops verbundene Transmembranhelices (M<sub>1</sub>) und einer großen, zum Teil stark konservierten cytoplasmatischen

Domäne (C1; ca. 40 kDa). Dieses Strukturmotiv wiederholt sich, so daß eine zweite Transmembrandomäne (M2) und eine zweite cytoplasmatische Domäne (C2) unterscheidbar sind (s. Abb. 1). Sowohl die enzymatische Aktivität der Adenylyl Cyclasen als auch die Bindung von ATP, der  $\alpha$ - bzw.  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine oder  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin sind den bisherigen Daten zufolge auf den beiden cytoplasmatischen Domänen lokalisiert.

Obwohl die komplizierte Struktur Ähnlichkeiten mit der von bestimmten Kanälen und ATP-abhängigen Membrantransportsystemen wie dem P-Glycoprotein aufweist, konnte eine Transportfunktion aber bis heute für die Adenylyl Cyclasen nicht nachgewiesen werden. Es hat jedoch Hinweise auf einen Kaliumkanal bei einer Adenylyl Cyclase aus *Paramecium* gegeben (Schultz *et al.*, 1992).

Die verschiedenen Isoformen der Adenylyl Cyclase Familie unterscheiden sich sehr stark in ihrer Regulierbarkeit. Gemeinsames Merkmal ist lediglich die Stimulierung der enzymatischen Aktivität durch die GTP-gebundene Form der  $\alpha$ -Untereinheiten der stimulatorischen G-Proteine und durch das Diterpen Forskolin (nicht AC-IX; Hacker *et al.*, 1998) sowie die Inhibition durch sogenannte „P-site“-Analoge (Adenosin). Darüber hinaus besitzen jedoch alle Isoformen auch typspezifische Regulationsmechanismen (s. Tab. 1).

Hervorzuheben ist die Regulierbarkeit der AC-Isoformen I, III und VIII durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin. Diese drei Subtypen werden durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen, stimuliert (Tang *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1992), wohingegen die Isoformen V und VI, auch in Abwesenheit von Calmodulin, durch submikromolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gehemmt werden (Yoshimura & Cooper, 1992; Krupinski *et al.*, 1992; Wallach *et al.*, 1994). Da cAMP den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Ionenkanäle fördert (Di Francesco & Tortora, 1991), könnten diese hauptsächlich im Herzmuskel anzutreffenden  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibierbaren Subformen über einen negativen „feedback“-Mechanismus an der Regulation von Stärke und Frequenz der Herzmuskelkontraktion beteiligt sein (Yoshimura & Cooper, 1992; Krupinski *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1993; Wallach *et al.*, 1994).

Die Regulierbarkeit einiger AC-Isoformen durch den  $\beta\gamma$ -Komplex ist ein weiterer interessanter Aspekt der Funktion der Adenylyl Cyclasen: Während die vorwiegend im Zentralnervensystem vorkommende AC-I durch  $\beta\gamma$ -Untereinheiten inhibiert wird, werden die Isoformen AC-II und AC-VI bei gleichzeitiger Stimulation über  $G_{s\alpha}$  zusätzlich stimuliert (Tang & Gilman, 1991; Gao & Gilman, 1991). Die  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_{i/o}$ -Gruppe inhibieren in unterschiedlichem Ausmaße AC-I, AC-V und AC-VI (Taussig *et al.*, 1993; Taussig *et al.*, 1994).



**Tab. 1** Regulation der Säugetier Adenylyl Cyclasen. (in Anlehnung an Hülster, 1997).

Regulator	Effekt	Adenylyl Cyclase Isoformen	Kommentar
Forskolin	Stimulation	alle außer AC-IX	Synergismus mit $G_{s\alpha}$ bei AC-II, IV, V, VI; nicht bei AC-I
$G_{s\alpha}$	Stimulation	alle	Synergismus mit Forskolin bei AC-II, IV, V, VI; nicht bei AC-I; Synergismus mit $Ca^{2+}$ /Calmodulin bei AC-I, III, VIII
$G_{i\alpha}$	Inhibition	AC-I, V, VI	bei AC-I nur Hemmung wenn mit $Ca^{2+}$ /Calmodulin aktiviert
$G_{z\alpha}$	Inhibition	AC-I, V, VI	
$G_{o\alpha}$	Inhibition	AC-I	nur wenn mit $Ca^{2+}$ /Calmodulin aktiviert
$G_{\beta\gamma}$	Inhibition Stimulation	AC-I, V AC-II, IV	nur bei Kostimulation mit $G_{s\alpha}$
$Ca^{2+}$ /Calmodulin	Stimulation	AC-I, III, VIII	Synergismus mit $G_{s\alpha}$ ; bei AC-II nur bei Kostimulation mit Forskolin oder $G_{s\alpha}$
$Ca^{2+}$	Inhibition	AC-V, VI	
„P-site“ Analoge	Inhibition	alle	
PKC	Stimulation	AC-II, V	
PKA	Inhibition	AC-V, VI	
Calcineurin	Inhibition	AC-IX	

Durch Stimulation verschiedener AC-Isoformen mit Kombinationen unterschiedlicher Regulatoren (z.B.  $G_{s\alpha}$  und CaM,  $G_{s\alpha}$  und Forskolin) kommt es zu Synergieeffekten (Übersichtartikel: Taussig & Gilman, 1995). Die Fähigkeit der Adenylyl Cyclasen, gleichzeitig auf verschiedene an der Zelle ankommende Signale zu reagieren, weist ihnen eine zentrale Funktion bei der Integration von Informationen sowie beim „cross-talk“ zwischen unterschiedlichen Signalwegen zu (Sunahara *et al.*, 1996).

## 1.4 Signaltransduktion durch Phospholipide

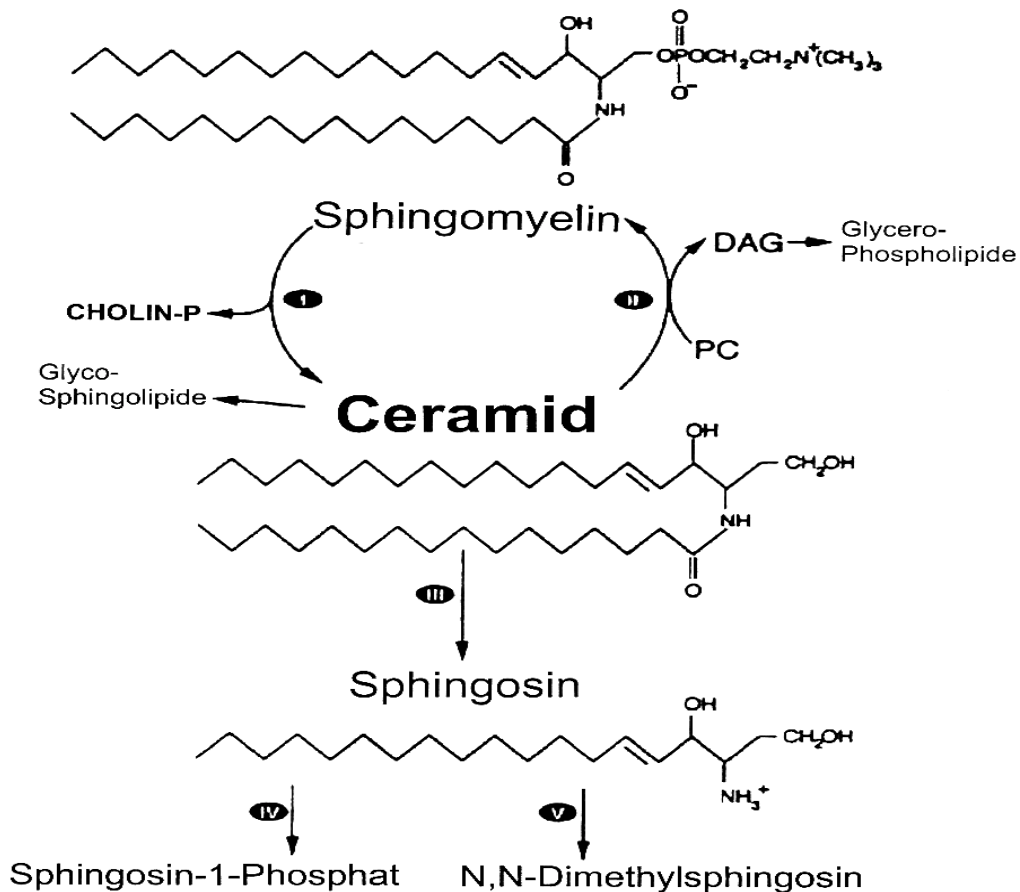
Phospholipide als integrale strukturelle Komponenten von Zellmembranen besitzen die Fähigkeit, spontan Lipid-Doppelschichten zu bilden, die eine Permeabilitätsbarriere zwischen

extra- und intrazellulären Kompartimenten darstellen und essentiell für das Überleben der Zellen sind. Eine zweite wichtige Rolle der Phospholipide, besonders der Glycerolipide, ist jedoch das Generieren eines weiten Spektrums von bioaktiven Molekülen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli (Liscovitch & Cantley, 1994).

Es gibt zwei Hauptklassen von Phospholipiden in eukaryontischen Zellembanen, Glycero- und Sphingophospholipide (Quest *et al.*, 1996). Die Verteilung dieser Lipide variiert zwischen verschiedenen subzellulären Kompartimenten ebenso wie zwischen den beiden Plasmamembranen und verschiedenen Zelltypen. Die extrazelluläre Plasmamembran beinhaltet vorwiegend Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM), während Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und höchstwahrscheinlich auch Phosphatidylinositol (PI) in der inneren (cytoplasmatischen) Plasmamembran vorkommen (Devaux, 1991; Quest *et al.*, 1996).

Von den o.g. Phospholipiden sind hauptsächlich Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin in das Zell-, „Signalling“ involviert. Die hierbei vorwiegend produzierten Lipid-, „second messenger“ sind Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA). Phosphatidylinositol wird durch Phospholipase C (PLC) zu wasserlöslichen Inositolen und DAG hydrolysiert (Liscovitch & Cantley, 1994; Lee & Severson, 1994). Die durch Phospholipase D (PLD) katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylcholin resultiert in der Produktion von Phosphatidsäure (Exton, 1997).

Über den Metabolismus der Sphingolipide ist relativ wenig bekannt. Ceramid bildet das strukturelle Rückgrat der Sphingolipide, analog dem Diacylglycerol in Glycerolipiden (s. Abb. 2, Bishop & Bell, 1988). Die Biosynthese von Sphingolipiden beginnt mit der Kondensation von Serin und PalmitoylCoA zu 3-Ketosphingosin, das seinerseits zu Dihydrosphingosin reduziert wird. Nach Addition eines Fettsäurerestes über eine Amidbindung entsteht Dihydroceramid, welches anschließend über die Einführung einer *trans*-4,5-Doppelbindung direkt in Ceramid, dem biosynthetischen Vorläufer aller Sphingolipide, überführt wird (Merrill & Jones, 1990). Durch die Einführung verschiedener Kopfgruppen erhält man komplexere Sphingolipide. Sphingomyelin wird z.B. durch den Transfer eines Phosphorylcholinrestes von Phosphatidylcholin auf Ceramid durch die Sphingomyelin-Synthase gebildet (Merrill & Jones, 1990). Durch die Addition verschiedener Glycosylgruppen können mehr als 300 verschiedene Cerebroside, Sulphatide und Ganglioside generiert werden (Sweely, 1991).



**Abb. 2 Ceramid-Metabolismus: Die zentrale Rolle von Ceramid im Metabolismus der Sphingolipide.** Folgende Enzyme sind am Ceramid-Metabolismus beteiligt: I, SMase; II, Phosphatidylcholin:Ceramid Cholin Phosphotransferase; III, Ceramidase; IV, Sphingosin-1-Kinase; V, Transmethylase (entnommen aus Ballou *et al.*, 1996).

Sphingolipide werden durch eine Anzahl von Enzymen metabolisiert, welche die verschiedenen Kopfgruppen spezifisch abspalten. Sphingomyelin wird durch verschiedene Sphingomyelinase-Isoformen (Sphingomyelin-spezifische PLCs), von denen zur Zeit fünf bekannt sind, zu Ceramid und Phosphorylcholin hydrolysiert. Eine dritte Möglichkeit, Ceramid zu generieren, besteht im Abbau von Glycosphingolipiden durch verschiedene Hydrolasen. Die Regulation dieser Enzyme durch bestimmte Stimuli wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben (Mathias *et al.*, 1998).

Desweiteren wird Ceramid durch Ceramidasen katabolisiert, welche die Amid-gebundene Fettsäure abspalten und Sphingosin freisetzen. Dieses kann über einen Signaltransduktionsweg, der die Phosphorylierung durch die Sphingosin-Kinase katalysiert, weiter zu Sphingosin-1-Phosphat metabolisiert werden. Ebenso ist eine Ceramid-Kinase bekannt, die Ceramid zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert (Merrill *et al.*, 1997).

Zur Zeit sind eine Reihe von extrazellulären Stimuli der Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid bzw. der Akkumulation von Ceramid identifiziert. Zu ihnen gehören 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Endotoxin, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-1 (IL-1), Fas-Liganden, CD 28, Dexamethason, Nerven-Wachstumsfaktor (NGF, nerve growth factor), Retinsäure, Progesteron, ionisierende Strahlung, chemotherapeutische Agentien (Cisplatin etc.) und Wärme (Hannun *et al.*, 1994; Saba *et al.*, 1996; Kolesnick *et al.*, 1994). Die Konzentration von Ceramid stieg ebenfalls in Zellen, die mit dem HI-Virus (human immunodeficiency virus) infiziert worden waren (Van Veldhoven *et al.*, 1992; De Simone *et al.*, 1996). Auch in alternden Fibroblasten konnte der gleiche Anstieg beobachtet werden (Venable *et al.*, 1995).

Werden die regulatorischen Funktionen von Ceramid auf zellulärer Ebene betrachtet, so ist Ceramid für die Modulation der Aktivität bzw. Funktion von bestimmten für die zelluläre Regulation wichtiger Proteine oder Enzyme verantwortlich. So wurde die Dephosphorylierung des Retinoblastoma-Genproduktes (Rb), das die Effekte von Ceramid auf den Zellzyklus-Arrest vermittelt, und die Aktivierung von Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzym-(ICE)-ähnlichen Proteasen, die die Effekte von Ceramid auf den Zelltod vermitteln, gezeigt. Als direkte Ziele von Ceramid konnten eine Prolin-„directed“ Proteinkinase (CAP Kinase) (Mathias *et al.*, 1991; Joseph *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994), eine Serin/Threonin Proteinphosphatase (CAP Phosphatase) (Dobrowsky & Hannun, 1992; Hannun, 1996), Raf (Huwiler *et al.*, 1996) und PKC  $\zeta$  (Lozano *et al.*, 1994) identifiziert werden. Andere intrazelluläre Effekte von Ceramid beinhalten die Inhibition von PKC  $\alpha$  (Jones & Murray, 1995), die Inhibition der PLD (Jones & Murray, 1995; Gomezmunoz *et al.*, 1994; Abousalham *et al.*, 1997), erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung der FAK („p125 focal adhesion kinase“) und Paxillin (Sasaki *et al.*, 1996) sowie die Inhibition/Aktivierung von Raf (Yao *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1998). Desweiteren ist Ceramid u.a. verantwortlich für die Aktivierung der c-jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase / Stress-aktivierten Proteinkinase (JNK/SAPK) (Westwick *et al.*, 1995; Shirakabe *et al.*, 1997), die Inhibition der Endozytose, die Modulierung der Peroxid-Bildung und die Beeinflussung einer Anzahl von Genprodukten einschließlich c-jun, c-myc, Interleukin-6, Cyclooxygenase und  $\alpha$ -B Crystallin (Hannun, 1996; Spiegel *et al.*, 1996a; Liu *et al.*, 1997).

Zusammengenommen zeigen diese Daten die komplexe Rolle von Ceramid als intrazellulärem Mediator einer Anzahl von extrazellulären Agentien, die Stress oder Verletzungen für die Zelle bedeuten. Betrachtet man die Natur der Stimuli der Ceramid-Bildung und das Spektrum der

Ceramid-vermittelten Antworten, läßt sich eine Funktion von Ceramid innerhalb der Stressantworten und Wachstums-Suppression der Zellen ableiten.

Zur Zeit gibt es drei Kandidaten, die als direkte Zielproteine von Ceramid in Frage kommen:

1) Ceramide Activated Protein Phosphatase (CAPP)

Ceramid aktiviert *in vitro* eine heterotrimere Serin-Threonin-Phosphatase. Diese gehört zur PP2A Familie der Protein Phosphatasen und wird *in vitro* durch Okadainsäure, einem Inhibitor der PP2A, inhibiert (Dobrowsky & Hannun, 1992; Dobrowski *et al.*, 1993; Law & Rossie, 1995, Dobrowsky & Hannun, 1993). CAPP wird durch Ceramide mit unterschiedlichen Acylgruppen, nicht aber durch andere Sphingolipide oder neutrale Lipide aktiviert.

Es gibt mehrere Hinweise darauf, daß CAPP für die Vermittlung einiger der zellulären Ceramidaktivitäten eine Rolle spielt (Wolff *et al.*, 1994; Dobrowsky & Hannun, 1992; Dobrowski *et al.*, 1993; Law & Rossie, 1995, Dobrowsky & Hannun, 1993; Nickels & Broach, 1996; Fishbein *et al.*, 1993). Zum einen werden einige der Ceramideffekte (wie Apoptose und „down“-Regulation der c-myc Protooncogene) durch geringe Konzentrationen an Okadainsäure inhibiert und zum anderen wird CAPP *in vitro* zwar durch D-erythro-Ceramid, nicht aber durch D-erythro-Dihydroceramide aktiviert. D-erythro-Dihydroceramide sind natürlich vorkommende Ceramide, denen bei beibehaltener stereochemischer Konfiguration die 4-5-trans-Doppelbindung fehlt. Ihre Aufnahme in die Zelle und ihr Metabolismus sind denen der D-erythro-Ceramide sehr ähnlich.

Desweiteren wurde in Studien mit *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, daß Hefezellen, denen verschiedene Untereinheiten von CAPP fehlten, resistent gegen die Effekte von Ceramid waren. Physiologisch relevante Substrate von CAPP konnten noch nicht ermittelt werden.

2) Protein Kinase C  $\zeta$  (PKC  $\zeta$ )

Die zur Gruppe der atypischen, nicht durch DAG oder Phorbolster aktivierbaren Isoformen gehörende Proteinkinase C  $\zeta$  spielt wahrscheinlich bei einigen biologischen Aktivitäten von Ceramid ebenfalls eine Rolle. Stimulation von U 937 Zellen oder NIH 3T3 Fibroblasten mit TNF- $\alpha$ , SMase oder Ceramid-Analoga erhöht die Phosphorylierung und Aktivität der PKC  $\zeta$ . Radioaktiv markiertes Ceramid bindet an und aktiviert die PKC  $\zeta$  in zwei Phasen. Ceramid-Konzentrationen bis zu 0,5 nM führen zu einem vierfachen Anstieg der Autophosphorylierung von PKC  $\zeta$ , wohingegen Konzentrationen über 60 nM die „down“-Regulation des Enzyms auslösen (Müller *et al.*, 1995). PKC  $\zeta$  scheint in einigen Zellen ein Schlüsselmolekül für die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B via SMase zu sein, da PKC  $\zeta$  ohne Kinase-Aktivität

die SMase-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in NIH 3T3 Fibroblasten blockiert (Lozano *et al.*, 1994). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß die PKC  $\zeta$  als Antwort auf erhöhte intrazelluläre Ceramid-Level in den Zellkern wandert. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, daß durch Ceramid-„Signalling“ auch der Transkriptionsapparat reguliert werden könnte (Bertolaso *et al.*, 1998).

### 3) *Ceramide Activated Protein Kinase (CAPK)*

CAPK ist eine 97 kDa große Serin/Threonin-Proteinkinase, die ausschließlich membranassoziiert vorliegt (Mathias *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1994). Ihre Aktivität wird durch Stimuli wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Ceramid-Analoga und bakterielle Sphingomyelinase erhöht (Spiegel *et al.*, 1996). Zhang *et al.* (1997) verglichen die CAP Kinase biochemisch mit KSR, dem kürzlich klonierten Kinase Suppressor von Ras, und kamen zu dem Schluß, daß beide identisch seien. Über die biochemischen Eigenschaften von KSR ist jedoch noch relativ wenig bekannt. KSR beinhaltet ein CRD (Cystein-reiche Domäne) (Therrien *et al.*, 1995) und liegt in genetischen Screenings entweder „upstream“ oder parallel zu Raf (Downward, 1995). In Cos-7-Zellen erhöhen TNF- $\alpha$  oder Ceramid-Analoga die Autophosphorylierung von KSR und damit dessen Fähigkeit, mit Raf zu komplexieren, es zu phosphorylieren und zu aktivieren (Zhang *et al.*, 1997). Raf ist ein „upstream“-Regulator der MAPK Signaltransduktionskaskade und seine Aktivierung ist an der inflammatorischen Antwort auf TNF- $\alpha$  beteiligt.

## 1.5 Ausgangslage und Ziel der Arbeit

In früheren Untersuchungen an Choleratoxin-behandelten „Air-Smooth-Muscle“-Zellen konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von kurzkettigen Ceramiden (C<sub>2</sub>- und C<sub>6</sub>-Ceramid) einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Folge hat (Pyne & Pyne, 1995). Über einen möglichen Signalweg, der zu einer Ceramid-stimulierten Aktivierung der Adenylyl Cyclase führt, war jedoch nichts bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Modell/Testsystem zur Untersuchung des aktivierenden Effektes von Ceramid auf die cAMP-Bildung in der Zelle gefunden werden. Der Schwerpunkt der Experimente lag in der Aufklärung des möglichen Signalweges von Ceramid, z.B. durch Einsatz bekannter Stimulatoren und Inhibitoren der Adenylyl Cyclase.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Geräte

Acetylsalicylsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Kodak, (über Integra Bioscience, Fernwald)
Aluminiumoxid	Merck, Darmstadt
Anti-PARP-Antiserum	Boehringer, Mannheim
ATP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Benzamidin-Hydrochlorid	Aldrich, Steinheim
Benzethoniumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bisindolylmaleimid	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Brutschrank	Heraeus, Düsseldorf
BSA	Serva, Heidelberg
Calyculin A	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
cAMP	Pharma Waldhof, Düsseldorf
C <sub>18</sub> /C <sub>24</sub> Ceramid (Typ III)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
C <sub>16</sub> Ceramid	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
C <sub>2</sub> Ceramid	Biomol
C <sub>16</sub> Dihydroceramid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
C <sub>2</sub> Dihydroceramid	Biomol
CMF-PBS	Gibco
Creatinphosphat	Boehringer, Mannheim
CSPD	Tropix (über Serva, Heidelberg)
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cyclosporin A	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
DMSO	Fluka Chemie, Buchs, CH
DNase I	Boehringer, Mannheim
DOSPER	Boehringer, Mannheim
Dowex 50x8 (H <sup>+</sup> )	Bio-Rad Laboratories, Richmond

DTT	Merck, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt
Elektroporationsapparatur (Gene Pulser)	Bio-Rad Laboratories, Richmond
Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät (1214)	Wallac, Freiburg
Forskolin	Dr. Heinz Metzger (Hoechst AG, Frankfurt)
FCS	Boehringer, Mannheim
G418	Boehringer, Ingelheim
Geltrockner (Model 543)	Bio-Rad Laboratories, Richmond
Glutaraldehyd 25%, f. d. Mikroskopie	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
H-89	Biomol, Hamburg
Histon H1	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
IBMX	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
I-Light-Block	Tropix (über Serva, Heidelberg)
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Isoproterenol	Serva, Heidelberg
Kühlzentrifuge (Universal 30 RF)	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge (Sigma 3K30)	Sigma, Osterode/Harz
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MAPP	Biomol, Hamburg
Minimum essential medium	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Molekulargewichtsstandard (Protein)	Amersham Buchler, Braunschweig
Molekulargewichtsstandard (DNA)	Pharmacia Biotech, Freiburg
NaF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nervensäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Netzgerät (Model 200 / 2.0 Power Supply)	Bio-Rad Laboratories, Richmond
Nitroblock	Tropix (über Serva, Heidelberg)
Okadainsäure	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pansorbin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
<i>para</i> -Nitrophenylphosphat	Merck, Darmstadt
Pertussistoxin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden



Phenol, equilibriert	Carl Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinkinase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rotiszint 2211	Carl Roth, Karlsruhe
Spektrophotometer (DU-40)	Beckmann, München
Sphingomyelinase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Staurosporin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Szintillator für wässrige Proben	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Theophyllin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Biofuge A)	Heraeus, Hanau
TLCK	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TPA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TPCK	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trasylol	Bayer, Leverkusen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2xYT-Medium (Kapseln)	Bio101 (über Dianova, Hamburg)

Alle weiteren, nicht aufgeführten Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad eingesetzt.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bakteriologische Kulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten	Costar Corporation, Cambridge, USA
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories, Richmond
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier 3 MM	Whatman, Maidstone, UK
Filterpapier DE 81	Whatman, Maidstone, UK
Gewebekulturplatten	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Immobilon PVDF-Membran	Millipore, Neu-Isenburg
Röntgenfilme HR-10 medical	Konica, Tokyo
Röntgenfilme Biomax MS	Kodak (über Integra Biosciences, Fernwald)

Sterilfilter (0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Szintillationsgefäße aus Polyethylen	Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt

### 2.1.3 Radiochemikalien

[2, 8- <sup>3</sup> H]Adenin, 1,63 TBq/mmol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
[α- <sup>32</sup> P]ATP, 29,6 TBq/mmol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
[γ- <sup>32</sup> P]ATP, 29,6 TBq/mmol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
[ <sup>32</sup> P]H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 1,85 GBq/mmol	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
[8- <sup>3</sup> H]cAMP, 0,7-1,1 TBq/mmol	Amersham Buchler, Braunschweig

### 2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Creatinkinase	Boehringer, Mannheim
DNase I	Boehringer, Mannheim
Proteinkinase A (katal. Untereinheit)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Restriktionsenzyme	Pharmacia Biotech, Freiburg
RNase A	Serva, Heidelberg
T4 DNA-Ligase	USB Amersham Life Science, Braunschweig

### 2.1.5 Biologisches Material

#### 2.1.5.1 Zelllinien

HEK 293 Zellen	Dr. M. Staufenbiel (Sandoz, Basel, CH)
HEK 293 ACI Zellen	Dr. A. Hülster, Düsseldorf
HEK 293 ACII Zellen	Dr. A. Hülster, Düsseldorf

### 2.1.5.2 Antikörper

BBC-2 (monoklonaler anti-AC <sub>common</sub> -AK)	(Mollner & Pfeuffer, 1988)
BBC-2-AP	Dr. S. Mollner, Düsseldorf
BBC-4	Dr. S. Mollner, Düsseldorf

### 2.1.5.3 Gewebe

Membranen humaner Thrombozyten	Dr. P. Ferreira, Düsseldorf
--------------------------------	-----------------------------

### 2.1.5.4 Bakterienstamm

<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	(Hanahan, 1983)
----------------------------	-----------------

### 2.1.6 Vektor und cDNA-Klone

#### Vektor

pcDNA3	Invitrogen, Leek, NL
--------	----------------------

#### cDNA-Klone

pXMD-ACV	(Wallach <i>et al.</i> , 1994)
pXMD-gal	(Kluxen & Lübbert, 1993)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Methoden der Zellkultivierung

#### 2.2.1.1 Adhäsionskulturen

Die HEK 293 Zelllinie wurde durch Transfektion von humanen embryonalen Nierenzellen mit Scherkräfte-fragmentierter DNA von Adenovirus Typ 5 hergestellt (Graham *et al.*, 1977). Sie

enthält 4-5 Kopien vom linken Ende (transkriptionell aktiv) und 1 Kopie vom rechten Ende des viralen Genoms.

Zur Kultivierung wurden die HEK 293 Zellen als Adhäsionskultur im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit in folgendem Medium gehalten: MEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS). Das Medium der Zelllinien, in denen Adenylyl Cyclase Subtypen stabil überexprimiert worden war, wurde zusätzlich mit 400-500 µg G418/ml zur Selektion versetzt. Die Zellen wiesen eine Populationsverdoppelungszeit von etwa 36 bis 48 h auf und wurden daher alle 2-3 Tage mit 1 mM EDTA in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS (CMF-PBS) gewaschen, abgelöst und anschließend 1:2 bis 1:3 in frisches Medium verdünnt.

### 2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Pro Portion wurden 8x10<sup>6</sup> Zellen vorsichtig abzentrifugiert (250 g, 5 min, 4°C) und in 1 ml Kultivierungsmedium resuspendiert, dem statt 10 % hier 20 % FCS sowie zusätzlich 10 % DMSO zugefügt wurden.

Die Aufbewahrung erfolgte in Kryoröhrchen, die sofort in die auf 4°C vorgekühlte, mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gestellt und mitsamt dieser in einen auf -70°C temperierten Gefrierschrank überführt wurden. Über Nacht kühlte sich das Isopropanol nur langsam ab (ca. 1°C pro min), was gemeinsam mit der Benutzung von DMSO ein Entstehen von größeren Eiskristallen in den Zellsuspensionen verhinderte und somit ein schonendes Einfrieren der Zellen ermöglichte. Zur längeren Lagerung wurden die Kryoröhrchen am nächsten Tag in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewar-Gefäß umgesetzt.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese dem flüssigen Stickstoff entnommen und die Röhrchen in der Hand solange vorgewärmt, bis ein Eisklumpen in etwas Flüssigkeit vorlag. Dieser wurde in ein Zentrifugationsröhrchen gegossen, tropfenweise insgesamt 15 ml eiskaltes Kultivierungsmedium zugefügt und vorsichtig resuspendiert. Nach zügigem Abzentrifugieren (250 g, 5 min, 4°C) und Dekantieren des für die Zellen in Kultur giftigen DMSO wurden 8x10<sup>6</sup> Zellen in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und etwa 3 bis 4 Tage im Brutschrank ruhen gelassen. Nach dieser Anlaufphase begannen sie zu proliferieren und konnten im weiteren wie üblich kultiviert werden.

### 2.2.1.3 Bestimmung von Zellzahl und -vitalität

Ein Teil der Zellsuspension wurde mit einem Teil Trypanblau (0,08 % in PBS) gemischt und in einer Neubauerkammer gezählt. Der Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran hindurch in die Zelle. Lebende Zellen können ihn aktiv ausscheiden; tote oder geschädigte Zellen hingegen vermögen dies nicht mehr und bleiben somit blau gefärbt.

### 2.2.2 Stimulation von Zellen

Zur Stimulation der Signaltransduktion in HEK 293 Zellen wurden verschiedene Aktivatoren eingesetzt. 20 h vor Beginn eines Experiments wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $2,2 \times 10^5$  Zellen/24er „multiwell“ bzw.  $1,3 \times 10^7$  Zellen/15 cm Platte in MEM mit 10 % (v/v) FCS, 0,4 mg/ml G418 ausgesät.

Zur Stimulation wurden die Aktivatoren der Adenylyl Cyclase in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Proben wurden kurz geschwenkt und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung für die angegebene Reaktionszeit im Brutschrank belassen. Inhibitoren wurden, wenn nicht anders angegeben, 1 h vor Beginn der Stimulation zugesetzt. Mit den auf diese Weise stimulierten Zellen wurde entweder die AC-Aktivität *in vivo* mit dem Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) bestimmt oder es erfolgte zwecks Western Blot Analyse (s. 2.2.7) oder Bestimmung der AC-Aktivität *in vitro* (s. 2.2.3) eine Membranpräparation (s. 2.2.3.1). Ebenso wurde auch die AC-Aktivität in permeabilisierten Zellen bestimmt (s. 2.2.4.2).

Häufig verwendete Agentien im Tritium-Adenin-Test:

20 $\mu$ M Ceramid	(Kontrolle: Ethanol/2 % Dodecan, 1:100)
10 $\mu$ M Forskolin	(Kontrolle: DMSO, 1:10.000)
1 $\mu$ M TPA	(Kontrolle: DMSO, 1:1.000)

### 2.2.3 Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität *in vitro*

#### 2.2.3.1 Membranpräparation von HEK 293 Zellen

HEK 293 Zellen (Wildtyp oder transfizierte Zellen) wurden nach Stimulation (s. 2.2.2) einmal mit CMF-PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 1 mM EDTA in CMF-PBS (pro 15 cm

Platte) abgelöst. Nach dem Überführen der Zellsuspension in ein Falconröhrchen wurde für 5 min bei 250 g und 4°C zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (pro 15 cm Platte) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch zweimaliges „freeze-thaw“ (Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C) erfolgte die Lyse der Zellen. In einer ersten Zentrifugation wurden Zellkerne und -trümmer entfernt (600 g, 4°C, 10 min), in einer zweiten (30.000 g, 4°C, 20 min) pelletierten die Membranen. Das überständige Cytosol wurde abgenommen und die Membranen wurden in Membranpuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Sowohl die Membranen als auch das Cytosol wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Lysepuffer:            10 mM Tris-HCl, pH 7,4  
                             1 mM EDTA

Membranpuffer:      12 mM Tris-HCl, pH 7,4  
                             1 mM EDTA  
                             2 mM MgCl<sub>2</sub>  
                             10 % (v/v) Glycerin

Proteaseinhibitoren: 0,5 mM PMSF  
                             0,5 mM DTT  
                             1 mM Benzamidin-Hydrochlorid  
                             0,1 mM Benzethoniumchlorid  
                             22 µg/ml TLCK  
                             88 µg/ml TPCK  
                             2,8 µg Trasylol  
                             3,2 µg/ml STI  
                             0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

### 2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden nach der für Mikrotiterplatten modifizierten Bradford-Methode durchgeführt (Bradford, 1976, Redinbaugh, 1985).

0,1 ml Proteinlösung wurden mit 0,1 ml Farbstofflösung (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) gemischt und nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm ermittelt.

In der Zeit zwischen 5 und 20 min besitzt das Absorptionsspektrum des zwischen Farbstoff und freien Aminogruppen in den Proteinen gebildeten Komplexes eine Plateauphase. Danach erfolgt sehr langsam eine Bildung von Aggregaten.

Als Standardprotein mit bekannter Konzentration wurde BSA eingesetzt.

### 2.2.3.3 Aktivitätstest

Die Methode von Salomon zur Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität *in vitro* (Salomon *et al.*, 1974) beruht auf der Abtrennung des aus  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  gebildeten  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  von anderen radioaktiv markierten Adennukleotiden. Das durch zwei aufeinander folgende Chromatographien an Dowex 50X8  $[\text{H}^+]$ -Austauscherharz und Aluminiumoxid isolierte  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  wird anschließend im Szintillationszähler quantifiziert. Als interner Standard wird  $[\text{}^3\text{H}]\text{cAMP}$  verwendet, um Ausbeuteunterschiede verschiedener Säulen zu kompensieren.

Während des enzymatischen Testes kann es zum Abbau von ATP durch ATPasen kommen. Aus diesem Grund wird die Konzentration von ATP durch ein regenerierendes System aus Creatinphosphat und Creatinkinase konstant gehalten.

ATP-Lösung:	0,66 mM ATP 1-3 x 10 <sup>6</sup> cpm $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ / Testansatz
Creatinphosphat-Lösung:	20 mg/ml Creatinphosphat 120 mM MOPS, pH 7,4 20 mM MgCl <sub>2</sub> 18 mM Theophyllin
Creatinkinase-Lösung:	20 mg/ml Creatinkinase in Creatinphosphat-Lösung
Probe:	Membranen oder permeabilisierte Zellen

Regulatoren:	(Endkonzentration im Test): 100 $\mu$ M Forskolin; 20 $\mu$ M Ceramid
Stop-Lösung:	2 % (w/v) SDS 0,1 mM cAMP 20.000 cpm/ml [ $^3$ H]cAMP

Die Vorbereitung aller Testansätze und benötigten Lösungen erfolgte auf Eis. Zunächst wurden 50  $\mu$ l Probe mit den jeweiligen Regulatoren vorgelegt und anschließend mit 50  $\mu$ l ATP-Mix, der sich aus jeweils 1 Volumenanteil ATP-Lösung und Creatinphosphat-Lösung sowie 0,1 Volumenanteil Creatinkinase-Lösung zusammensetzt, verdünnt. Durch Transfer der Ansätze in ein auf 30°C temperiertes Wasserbad wurde die Reaktion gestartet. Nach 20 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml Stop-Lösung gestoppt.

Zur Trennung von cAMP und ATP wurden die Testansätze auf mit 1 M HCl regenerierte und mit H<sub>2</sub>O neutral gewaschene Dowex Säulen (ca. 1 ml Bettvolumen) gegeben und zweimal mit jeweils 1 ml H<sub>2</sub>O nachgespült. Das cAMP wurde mit 5 ml H<sub>2</sub>O auf regenerierte (0,1 M Imidazol, pH 7,4) Aluminiumoxidsäulen transferiert und anschließend mit 2 ml 0,1 M Imidazol, pH 7,4 von diesen eluiert. Nach Zugabe von 12,5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint) erfolgte die Quantifizierung des [ $^{32}$ P]cAMP / [ $^3$ H]cAMP Verhältnisses im Flüssigszintillationspektrometer. Die spezifische Aktivität [cAMP / mg x min<sup>-1</sup>] errechnet sich wie folgt:

$$\{ \text{cpm} ([^{32}\text{P}]\text{cAMP} / [^3\text{H}]\text{cAMP}) \times \text{ATP}_{\text{eingesetzt}} \} / \{ \text{cpm}_{\text{eingesetzt}} [^{32}\text{P}]\text{ATP} \times \text{mg Protein} \times \text{min} \}$$

## 2.2.4 Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität in permeabilisierten HEK 293 Zellen

### 2.2.4.1 Vortest zur Permeabilisierung

Je nach Zellsorte und Permeabilisierungsreagenz unterscheiden sich die Reaktionsbedingungen zur Permeabilisierung von Zellen. In einem Vortest wurden die optimalen Bedingungen für HEK 293 Zellen und das Permeabilisierungsreagenz L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin (LPC) ermittelt.

War der Permeabilisierungszustand der Zelle nicht ausreichend, konnten die außen angebotenen Komponenten des AC-Tests nicht oder nur in sehr geringem Maße in die Zelle eindringen. Bei zu starken Bedingungen wurde die Zelle, oder sogar zusätzlich der Zellkern lysiert.



Gewaschenen, mit (bzw. als Kontrolle ohne) Permeabilisierungsreagenz versehenen Zellen wurde Paranitrophenylphosphat (pNPP) in einer Konzentration von 1 mM angeboten. Es erfolgte bei verschiedenen Konzentrationen von LPC bei 30°C eine Inkubation, die über einen Zeitraum von 10 min beobachtet wurde.

Cytosolische Phosphatasen spalten vom pNPP ein Phosphat ab, wobei *p*-Nitrophenolat entsteht. Dieses besitzt eine starke Absorptionsbande bei  $\lambda = 400$  nm. Im alkalischen Milieu ist die unprotonierte Form existent, die den charakteristischen Gelbton aufweist.

Färbte sich die Zellsuspension gelb, konnten entweder cytosolische Phosphatasen in das Außenmedium übergetreten oder aber das pNPP in die Zelle gelangt sein. In beiden Fällen war die Zelle permeabilisiert. Anhand der Gelbfärbung konnte der Permeabilisierungszustand der Zelle abgeschätzt und zusätzlich anhand ausfallender DNA der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Zelle lysiert war.

### 2.2.4.2 Zellpermeabilisierung und Aktivitätstest

Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^7$  HEK 293 ACII Zellen eingesetzt. Mit Ceramid stimulierte bzw. Kontrollzellen wurden mit CMF-PBS/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst, abzentrifugiert (250 g, 7 min, RT), einmal mit CMF-PBS/EDTA gewaschen, gezählt und anschließend bei Raumtemperatur in einer Zelldichte von  $10 \times 10^7$  Zellen/ml in ATP-Mix resuspendiert.

Zur Herstellung des ATP-Mix siehe 2.2.3.3. L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin (LPC, Stammlösung 10 mg/ml in Chloroform:Methanol, 2:1) wurde im Stickstoffstrom vom Lösungsmittel befreit, in CP-Puffer in einer Konzentration von 200  $\mu$ g/ml aufgenommen und zwecks vollständigem Resuspendieren in ein Ultraschallbad (10 min, RT) gegeben. Nach Zugabe der weiteren Bestandteile des ATP-Mixes wurden die Zellen in diesem resuspendiert, so daß während des Permeabilisierungsvorganges und des Aktivitätstestes eine Zelldichte von  $10 \times 10^7$  c/ml und eine finale LPC-Konzentration von 100  $\mu$ g/ml vorlag und anschließend für 30 min in einem 30°C warmen Wasserbad inkubiert (10 min Permeabilisierungsvorgang + 20 min Aktivitätstest). Für das weitere Vorgehen und die Auswertung des Aktivitätstests s. 2.2.3.3.

### 2.2.5 Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität *in vivo*

Im Gegensatz zur Bestimmung der AC-Aktivität *in vitro*, die an Membranen vorgenommen wurde, erfolgte die Bestimmung der AC-Aktivität *in vivo* an lebenden Zellen mit dem Tritium-Adenin-Test.

#### 2.2.5.1 Tritium-Adenin-Test

(Federman *et al.*, 1992)

Im 24er „multiwell“ ausgesäte HEK 293 Wildtyp oder transfizierte (stabil bzw. transient) Zellen (s. 2.2.10.1) wurden 24 h nach Aussäen bzw. 48 h nach Transfektion für die angegebenen Zeiten mit verschiedenen Ceramiden oder entsprechenden Derivaten bzw. einer Lösungsmittelkontrolle (Ethanol mit 2 % Dodecan) in einem Gesamtvolumen von 500 µl Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde zur Hemmung von Phosphodiesterasen für 10 min 1 mM IBMX zugegeben. Zum Aufbau von tritiiertem ATP wurden die Zellen für 60 min mit 2 µCi [2,8-<sup>3</sup>H]Adenin/500 µl Medium versetzt, gefolgt von einer weiteren Zugabe von Stimulatoren der Adenylyl Cyclase zu den angegebenen Zeiten. Vor dem Stoppen der Reaktion wurde die Zellsuspension der einzelnen „wells“ in Reaktionsgefäße pipettiert und einmal in CMF-PBS gewaschen, um das überständige <sup>3</sup>H-Adenin wegzuwaschen (Zentrifugation: 400 g, 5 min, RT). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 1/6 Volumen Stopmix pro Reaktionsgefäß gestoppt.

Die Trennung von [<sup>3</sup>H]ATP und [<sup>3</sup>H]cAMP erfolgte nach der Methode von Salomon *et al.* (1974) durch zwei aufeinanderfolgende Chromatographien an DOWEX 50X8 [H<sup>+</sup>]-Austauscherharz und Aluminiumoxid. Um die Ausbeuteunterschiede der verschiedenen Säulen zu kompensieren, wurden als interne Standards [<sup>32</sup>P]ATP und [<sup>32</sup>P]cAMP (Herstellung s. 2.2.5.2) über den Stopmix zugegeben. Durch die Optimierung des Waschverfahrens der Säulen während der Experimente kam es zu einer Erhöhung der Stimulationswerte um den Faktor 10.

Die Zellysate in den Reaktionsgefäßen wurden für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden auf mit 5 M HCl regenerierte und mit bidest. H<sub>2</sub>O neutral gewaschene Dowex Säulen (ca. 1 ml Bettvolumen) gegeben, und das ATP wurde mit zweimal 1 ml bidest. H<sub>2</sub>O eluiert. Das cAMP wurde mit 5 ml bidest. H<sub>2</sub>O auf regenerierte (0,1 M Imidazol, pH 7,4) Aluminiumoxidsäulen transferiert und anschließend mit 6 ml 0,1 M Imidazol, pH 7,4 von diesen eluiert. Nach Zugabe von jeweils 12,5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint) zum eluierten ATP

und eluierten cAMP erfolgte die Quantifizierung des [<sup>3</sup>H]ATP/[<sup>32</sup>P]ATP und [<sup>3</sup>H]cAMP/[<sup>32</sup>P]cAMP Verhältnisses im Flüssigszintillationsspektrometer.

Die Konversionsrate [cAMP / ATP + cAMP] in Prozent [%] errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\{ \text{cpm } ([^3\text{H}]\text{cAMP}/[^{32}\text{P}]\text{cAMP}) \times [^{32}\text{P}]\text{cAMP}_{\text{Standard}} \} \times 100}{\{ \text{cpm } ([^3\text{H}]\text{ATP}/[^{32}\text{P}]\text{ATP}) \times [^{32}\text{P}]\text{ATP}_{\text{Stand}} \} + \{ \text{cpm } ([^3\text{H}]\text{cAMP}/[^{32}\text{P}]\text{cAMP}) \times [^{32}\text{P}]\text{cAMP}_{\text{Stand}} \}}$$

Stop-Mix:                    30 % (v/v) TCA  
                                  10 mM cAMP  
                                  10 mM ATP  
                                  5000 cpm [<sup>32</sup>P]ATP  
                                  5000 cpm [<sup>32</sup>P]cAMP

### 2.2.5.2 Herstellung von [<sup>32</sup>P]cAMP

Die Herstellung von [<sup>32</sup>P]cAMP erfolgte mit Hilfe der Adenylyl Cyclase aus humanen Thrombozyten-Membranen, die mir von Dr. P. Ferreira zur Verfügung gestellt wurden.

1 mg Membranen wurden in einem Volumen von 500 µl unter den in 2.2.3.3 aufgeführten Bedingungen für 30 min bei 30°C inkubiert, um eine möglichst quantitative Umsetzung des eingesetzten [<sup>32</sup>P]ATPs zu [<sup>32</sup>P]cAMP zu erhalten. Die Adenylyl Cyclase wurde mit 100 µM Forskolin stimuliert. Abweichend zu 2.2.3.3 enthielt der Ansatz 1x10<sup>8</sup> cpm [<sup>32</sup>P]ATP. Die Reaktion wurde durch eine 10 minütige Inkubation bei 95°C gestoppt, und nach Zentrifugation (10.000 g, 10 min, RT) wurde der Überstand auf eine mit 40 mM Tris-HCl, pH 7,4 equilibrierte Aluminiumoxidsäule gegeben. Das gebildete [<sup>32</sup>P]cAMP wurde in 10 Fraktionen zu jeweils 500 µl mit 40 mM Tris-HCl, pH 7,4 von der Aluminiumoxidsäule eluiert. [<sup>32</sup>P]cAMP-haltige Fraktionen wurden vereinigt und bei -20°C eingefroren.

### 2.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die in Laemmli-Puffer aufgekochten Proben (15 min, 50°C) enthalten in SDS eingehüllte Proteine, sind somit negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld zur Anode.

Zur Trennung der Adenylyl Cyclase waren 5 – 15 %ige PA-Gradientengele am besten geeignet. Das Verhältnis von Acrylamid : Bisacrylamid betrug 37,5 : 1 (w/w). Weiterhin enthielten die Trenngele 0,1 % (w/v) SDS und 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8. Sie wurden in einer Dicke von 2 mm gegossen, wobei 0,05 % Ammoniumpersulfat und 0,05 % TEMED als radikalbildendes System zum Auspolymerisieren zugegeben wurden. Während dieses etwa 30minütigen Vorganges wurde das Trenngel mit H<sub>2</sub>O-gesättigtem 2-Butanol überschichtet, um eine glatte Grenzschicht zu erhalten.

Nach erfolgter Polymerisation wurde die Trenngeloberfläche mehrmals mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült und das Sammelgel (3 % (w/v) Acrylamid und 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; Rest analog zum Trenngel) gegossen.

Vor dem Auftragen wurden alle Taschen mit Elektrophorese-Puffer (s.u.) gespült, um Acrylamid-Reste zu entfernen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1 Vol reduzierendem Laemmli-Puffer (4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8) versetzt und für 15 min bei 50°C erhitzt. Diese schonende Behandlung der Adenylyl Cyclase erfolgte, um eine Aggregationsbildung zu vermeiden.

In einem vertikalen Elektrophorese-System wurden die Proben zunächst bei 80 V const. (max. 280 mA) im Sammelgel fokussiert und dann im Trenngel bei 120 – 130 V const. (max. 280 mA) aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele entweder direkt in eine Western Blot-Apparatur überführt oder in Schrumpfungslösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 3 % (v/v) Glycerin) bei RT leicht geschüttelt. Nach 30 min wurden die Gele dann in einem Gel Trockner unter Vakuum innerhalb 3 h getrocknet.

Radioaktive Gele wurden einer anschließenden Autoradiographie mit Kodak X-Omat-Filmen unterzogen.

Elektrophorese-Puffer:        25 mM Tris-HCl  
    0,192 M Glycin  
    0,1 % (w/v) SDS

### 2.2.7 Westernblot

(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

Bei dieser Methode werden die in Polyacrylamidgelen getrennten Proteine (s. 2.2.6) elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert.

#### 2.2.7.1 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Proteine wurden unter dem in 2.2.6 beschriebenen Verfahren in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde stets Rainbow Marker (Amersham Buchler) verwendet, da dieser aufgrund der gefärbten Eichproteine darüberhinaus die Kontrolle des Proteintransfers auf die Membran zulässt.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 10 min in Transfer-Puffer unter leichtem Schütteln equilibriert. Die Vorbereitung der PVDF-Membran (Millipore) erfolgte durch sukzessives Überführen von 100 % auf 10 % Methanol und anschließender Äquilibrierung in Transfer-Puffer. Das Gel wurde luftblasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und der Transfer erfolgte zwischen zwei mit Transfer-Puffer getränkten Filterpapieren (Schleicher & Schüll) und Schaumstoffmatten in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Blot-Kammer für 4 – 5 h bei 70 V mit max. 280 mA bei 4°C.

Transfer-Puffer:                    25 mM Tris-HCl  
    0,192 M Glycin  
    10 % (v/v) Methanol  
    0,025 % (w/v) SDS

#### 2.2.7.2 Immunologischer Nachweis durch Chemilumineszenz

(Bronstein *et al.*, 1992)

Die hier beschriebene Chemilumineszenz ist eine schnelle und extrem sensitive Methode zur Detektion von trägergebundenen Proteinen. Sie beruht in der vorliegenden Arbeit auf dem Zerfall

von CSPD nach Umsatz mit alkalischer Phosphatase und der daraus resultierenden Lichtemission, die auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden kann.

Durchführung:

Alle Inkubationen und Waschschritte erfolgten in Glas- oder Plastikschalen unter leichtem Schütteln bei RT.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran zunächst 2 x 5 min mit CMF-PBS und 2 x 10 min mit CMF-PBS/Tween gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in I-Light Block inkubiert und erneut 2 x 5 min mit CMF-PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem Antikörper (Antikörper verdünnt in I-Light Block, z.B. BBC-2-AP-gekoppelt 1 : 10.000 verdünnt) inkubiert und nicht gebundener Antikörper durch 4 x (5, 10, 15 und 30 min) Waschen mit CMF-PBS/Tween entfernt.

Nach Inkubation mit dem AP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran 1 x 15 min in Assay-Puffer inkubiert, anschließend in eine für diesen Behandlungsschritt separate Schale transferiert und 5 min in Nitroblock geschüttelt. Nach erneuter Inkubation für 2 x 5 min in Assay-Puffer wurde die Membran 5 min mit Substrat behandelt, anschließend auf ein mit Assay-Puffer befeuchtetes Filterpapier in eine Klarsichthülle gegeben und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit betrug wenige Sekunden bis max. 20 min.

CMF-PBS:                    137 mM NaCl  
                                  2,7 mM KCl  
                                  4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                  pH 7,3

CMF-PBS/Tween:        CMF-PBS  
                                  0,3 % (v/v) Tween 20

I-Light Block:            CMF-PBS  
                                  0,2 % (w/v) I-Light Block  
                                  0,1 % (v/v) Tween 20

Assay-Puffer:	0,1 M Diethanolamin 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,02 % Azid pH 10,0 (mit HCl), filtrieren
Nitroblock:	1 : 20 verdünnt in Assay-Puffer
Substrat:	8 µl CSPD / ml Assay-Puffer

### 2.2.7.3 Färbung von Westernblots mit Ponceau Rot

(Kohn, 1958)

Im Anschluß an einen Western Blot (s. 2.2.7.1) und Chemilumineszenznachweis (s. 2.2.7.2) wurde die Membran für 5 – 10 min mit Ponceau Rot Lösung (0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma), 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure, 3 % (w/v) Trichloressigsäure) unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfernung des Farbstoffes erfolgte durch mehrmaliges Waschen der Membran mit bidest. H<sub>2</sub>O.

### 2.2.8 Bestimmung des Einbaus von [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II

Zur Bestimmung des Einbaus von [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid war es erforderlich, den ATP-Pool in HEK 293 ACII Zellen vor der Stimulation radioaktiv zu markieren.

#### 2.2.8.1 Markierung von HEK 293 ACII Zellen mit [<sup>32</sup>P]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

20 h vor Beginn eines Experiments wurden pro Ansatz 4 Schalen HEK 293 ACII Zellen in einer Zelldichte von 1,3x10<sup>7</sup> Zellen/15 cm Platte in MEM (10 % (v/v) FCS, 0,3 mg/ml G418) ausgesät. Nach einem Mediumwechsel auf MEM ohne Phosphat (10 % dialysiertes FCS, 25 mM HEPES (pH 7,3) 2 mM L-Glutamin, 0,3 mg/ml G418; 10 ml/Platte) wurden die Zellen für 90 min bei 37°C gehungert. Für eine weitere Stunde wurden zum Aufbau des radioaktiv markierten ATP-Pools 0,05 mCi/ml [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat hinzugefügt. Die Stimulation erfolgte

durch Zugabe von 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid in Ethanol (2 % Dodecan), welches gleichzeitig als Kontrolle fungierte. Eine Stunde vor Zugabe des Ceramids wurde ein Ansatz mit 50 nM Okadainsäure inkubiert. Nach einer 6stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Ablösen vom Plattenboden geerntet (15 min vor dem Ernten der Zellen wurde ein Ansatz mit 1  $\mu$ M TPA versetzt) und jeweils in 50 ml Falconröhrchen pro Ansatz vereinigt.

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des [<sup>32</sup>P]ATP-Pools wurde pro Ansatz ein Aliquot von 5 ml (1/8 Vol) Zellsuspension abgenommen und in Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellen (300 g, 5 min, RT) wurden diese in je 1 ml eiskaltem CMF-PBS resuspendiert und in EppendorfgefäÙe überführt. Zur weiteren Durchführung s. 2.2.8.4.

### 2.2.8.2 Solubilisierung der markierten HEK 293 ACII Zellen und DNA-Abdau

Die unter 2.2.8.1 erhaltene Zellsuspension wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von Protease Inhibitoren (1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF) in Polypropylenröhrchen á 17,5 ml überführt. Diese wurde bei 18.000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge). Die Pellets wurden pro Ansatz in je 20 ml 0,65 % SDS (50°C) resuspendiert und zur Solubilisierung in 50 ml Falconröhrchen überführt.

Nach dem Abkühlen des Solubilises (15 min, Eis) wurde jeder Ansatz mit 5 ml 5fach RIPA-Puffer (ohne SDS, mit 5 x PMSF) zur „Entschärfung“ des SDS-Solubilises für den DNA-Abdau versetzt. Darauf folgte die Zugabe von 320 U DNase I/ml und 1/33 Volumen 100 mM MgCl<sub>2</sub>. Die Solubilise wurden unter gelegentlichem Schütteln für 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Solubilisieren und dem Abdau der DNA wurden nicht gelöste Zellbestandteile durch Zentrifugation (2.000 g, 4°C, 10 min) vom Solubilise abgetrennt. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation der AC-II aus dem Solubilise (s. 2.2.8.3.2).

RIPA-Puffer (5fach, ohne SDS):      25 mM Natriumphosphat  
   375 mM NaCl  
   1,25 mM PMSF  
   2,5 % Triton X-100  
   2,5 % Natriumdesoxycholat  
   pH 7,4



### 2.2.8.3 Immunpräzipitation von Adenylyl Cyclase Typ II nach Lyse der Zellen

Die Immunpräzipitation der Adenylyl Cyclase Typ II aus HEK 293 ACII Membranen erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper BBC-4 (Bovine Brain Cortex). Der Antikörper vom Typ IgG<sub>1</sub> wurde nach Immunisierung von Mäusen (BALB/c) gegen die gereinigte Calmodulin-sensitive Adenylyl Cyclase aus Rinderhirn-Membranen gewonnen und erlaubt die Immunpräzipitation der AC-II sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen (Mollner & Pfeuffer, 1988).

Als Ausgangsmaterial diente BBC-4 aus Ascitesflüssigkeit von Balb/c Mäusen. Als Protein A Matrix wurden *Staphylococcus aureus* Zellhüllen (Pansorbin) verwendet.

#### 2.2.8.3.1 Kovalente Vernetzung von BBC-4 an Pansorbin

(Mollner *et al.*, 1991b)

5 ml Pansorbin (10 % (v/v)) wurden in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben und für 10 min bei 1.260 g (3.500 rpm, Hettich Zentrifuge, RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde je zweimal mit 15 ml 0,9 % (w/v) NaCl bzw. Bindepuffer gewaschen und anschließend in 4,5 ml Bindepuffer resuspendiert.

Die Bindung der Antikörper an Pansorbin erfolgte nach Zugabe von 1 ml Antikörper-Lösung (BBC-4) unter Drehen für 3 h bei RT. Danach wurde für 10 min bei 1.260 g (RT) zentrifugiert und in 5 ml Bindepuffer resuspendiert. Nach dem Aufteilen der Suspension auf 5 Eppendorfgefäße á 1 ml wurden die Pellets zweimal in je 1 ml Bindepuffer gewaschen (Biofuge, 8.000 rpm, 4 min, RT). Beim letzten Waschen wurden die Proben halbiert und auf 10 Eppendorfgefäße aufgeteilt und noch einmal mit je 1 ml Triethanolamin-Puffer (TEA, pH 8,2) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in je 1 ml 50 mM Dimethylpimelimidat (DMP) in TEA-Puffer resuspendiert und unter Drehen für 1 h bei RT inkubiert (chemische Kopplung). Nach Zusatz von je 500 µl 50 mM Tris-Puffer (pH 8,8) zum Stoppen der Reaktion und einer 10 minütigen Zentrifugation (s.o.), wurden die Pellets in 1 ml Tris-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C gedreht. Der kovalent an das Pansorbin gekoppelte Antikörper wurde zweimal mit je 1 ml CMF-PBS (pH 7,4) gewaschen, vereinigt und abschließend in 5 ml CMF-PBS mit 0,02 % (w/v) NaN<sub>3</sub> zu einer 10 %igen Suspension resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Bindepuffer:                   0,1 M Borsäure  
                                  2 M NaCl  
                                  1 mM Benzamidin  
                                  1  $\mu$ M Benzethoniumchlorid  
                                  pH 8,9

TEA-Puffer:                   0,2 M Triethanolamin-HCl  
                                  2 M NaCl  
                                  pH 8,2

CMF-PBS:                    137 mM NaCl  
                                  2,7 mM KCl  
                                  4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                                  1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                  pH 7,3

### **2.2.8.3.2 Immunpräzipitation von Adenylyl Cyclase Typ II unter denaturierenden Bedingungen**

75  $\mu$ l nicht konjugiertes Pansorbin (10 % (v/v) pro Ansatz wurden einmal in RIPA-Puffer mit 1 mg/ml BSA und anschließend dreimal in RIPA-Puffer gewaschen, zu dem unter 2.2.8.2 erhaltenen Solubilisat gegeben und für 30 min bei 4°C gedreht („Pre-Clearing“). Die nach Zentrifugation (2.000 g, 4°C, 5 min) erhaltenen Überstände wurden jeweils mit 150  $\mu$ l BBC-4-Pansorbinkonjugat (s. 2.2.8.3.1), das in gleicher Weise vorbehandelt worden war, versetzt und zur Immunpräzipitation der AC-II unter Drehen über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erfolgter Bindung wurde für 5 min bei 2.000 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet viermal mit jeweils 600  $\mu$ l RIPA-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das BBC-4/AC-II Präzipitat in jeweils 90  $\mu$ l Lämmli-Puffer (s. 2.2.6) resuspendiert und für 15 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm, RT, 10 min) wurden die Überstände auf zwei SDS-Polyacrylamid-Gradientengele (5-15 %, 2 mm) verteilt.

20 % der Proben wurden zur Überprüfung der Proteinmengen elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.6), auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.2.7.1) und schließlich immunologisch über

Chemilumineszenz (s. 2.2.7.2) nachgewiesen. Die der AC-II zugeordneten schwarzen Flecken wurden eingelesen und ihr Schwärzungsgrad densitometrisch bestimmt.

Die restlichen 80 % der Proben wurden ebenfalls über Elektrophorese aufgetrennt. Nach Auftrennung der Proteine wurde das Gel in Schrumpfungspuffer für 30 min bei RT leicht geschüttelt und anschließend für 3 h bei 80°C getrocknet. Die AC-II wurde autoradiographisch lokalisiert, aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in einem  $\beta$ -Counter gegenüber dem Hintergrund gezählt.

RIPA-Puffer (2x):                    10 mM Natriumphosphat  
    150 mM NaCl  
    1 mM Benzamidin-HCl  
    10  $\mu$ M Benzethoniumchlorid  
    0,5 mM PMSF  
    1 % Triton X-100  
    1 % Natriumdesoxycholat  
    0,5 % SDS  
    pH 7,4

Schrumpfungspuffer:                47 % (v/v) H<sub>2</sub>O  
    40 % (v/v) Methanol  
    10 % (v/v) Essigsäure  
    3 % (v/v) Glycerin

### 2.2.8.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität von [<sup>32</sup>P]ATP

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von [<sup>32</sup>P]ATP erfolgte anhand eines *in vitro*-Proteinkinase-Tests, der auf Phosphorylierung von Histon-Proteinen durch die PKA mit [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP beruht. Das Prinzip dieses Testes besteht in dem Vergleich eines Standards, dessen spezifische Aktivität bekannt ist, mit den zu untersuchenden Proben. Da der Proteinkinase-Assay unter ATP-gesättigten Bedingungen durchzuführen ist, wurden diese in einem Vortest ermittelt.

#### 2.2.8.4.1 Vortest zur Bestimmung der Sättigungsbedingungen

Zur Ermittlung der Standardbedingungen bzw. der ATP-Sättigung des Proteinkinase-Tests wurden verschiedene Konzentrationen an PKA, Histon, ATP und [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP in Reaktionsansätzen getestet. Die einzelnen Komponenten wurden bei 4°C in Eppendorfgläsern in Reaktionspuffer (Endvolumen 100  $\mu$ l) vorgelegt und mit [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP gestartet. Nach 20 sec Vortexen der Proben wurden diese für 15 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 75  $\mu$ l des Reaktionsansatzes auf mit 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> abgesättigten DE 81-Filter (Whatman) getropft (Kontrolle: 7,5  $\mu$ l des Reaktionsmixes) und zum Abstoppen der Reaktion kurz in eiskalte 10 %ige TCA-Lösung gehalten. Die Filter wurden auf eine große Nutsche gelegt und jeder Filter wurde unter Unterdruck mit 20 ml Waschlösung (15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen (Wegwaschen des überschüssigen radioaktiv markierten ATP's). Danach wurden die Filter kurz in 96 %igem Ethanol (4°C) geschwenkt und anschließend für 30 min im Trockenschrank getrocknet. Nach Zugabe von 12,5 ml Szintillationsflüssigkeit wurden die Filter im  $\beta$ -Counter gezählt. Die Auswertung erfolgte durch Auftrag der gemessenen Radioaktivität der Proben gegen die eingesetzte Menge an ATP.

Als Standard wurden für einen 100  $\mu$ l Reaktionsansatz folgende Bedingungen ermittelt: 100 ng PKA, 25  $\mu$ g Histon, 40  $\mu$ M ATP,  $6 \times 10^5$  cpm [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP, 15 min Inkubation bei 30°C

Reaktionspuffer (final):      80 mM HEPES  
   20 mM MgCl<sub>2</sub>  
   0,8 mM EGTA  
   pH 6,5

#### 2.2.8.4.2 Proteinkinase-Test zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von [<sup>32</sup>P]ATP

Die unter Punkt 2.2.8.1 zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des [<sup>32</sup>P]ATP-Pools in je 1 ml eiskaltem CMF-PBS resuspendierten HEK 293 ACII Zellen (ca.  $1 \times 10^7$ ) wurden abzentrifugiert (500 g, 4°C, 5 min) und erneut in je 40  $\mu$ l CMF-PBS resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit 125  $\mu$ l 2 M Perchlorsäure. Nach Neutralisation der Proben mit je 25  $\mu$ l 3 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und anschließender Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 10 min) wurden die radioaktiven, entweißten Überstände gewonnen. Die Konzentrationsbestimmung des ATP's

wurde mittels Photometer bei 259 nm vorgenommen. Der Anteil der ebenfalls bei dieser Wellenlänge gemessenen Nukleotide AMP und ADP wurde als vernachlässigbar angesehen.

Die spezifische Aktivität des [<sup>32</sup>P]ATP's der zu untersuchenden Proben erfolgte mit Hilfe des Proteinkinase-Tests bei einer ATP-Konzentration von 20 bzw. 40 μM ATP unter den unter Punkt 2.2.8.4.1 ermittelten Bedingungen (100 ng PKA, 25 μg Histon, 6x10<sup>5</sup> cpm [<sup>32</sup>P]-γ-ATP, 15 min Inkubation bei 30°C). Die spezifische Aktivität des [<sup>32</sup>P]ATP's der entweißten Proben läßt sich aus den experimentellen Daten wie folgt berechnen:

$$\text{spez. } [^{32}\text{P}]\text{ATP} = [\text{ATP}] \times U / B$$

[ATP]: ATP-Konzentration des Standards (cpm [<sup>32</sup>P] / pmol ATP)

U: cpm der unbekannt Probe

B: cpm der bekannten ATP-Konzentration

Die erhaltene spezifische Aktivität der Proben wurde anschließend anhand der Halbwertszeit von <sup>32</sup>Phosphor an den Versuchstag angepaßt.

### 2.2.8.5 Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung

Die Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung der Adenylyl Cyclase Typ II erfolgte in Anlehnung an Simmoteit (1990, Promotion) nach folgender Formel:

$$\text{mol } [^{32}\text{P}]/\text{mol AC-II} = \frac{\text{Faktor} \times W \times B}{A \times S \times P}$$

Faktor: % Fällung x % Solubilisierung (= 1,7)

W: Wechselzahl der gereinigten katalytischen Untereinheit aus Kaninchenherzen  
(= 1600/min)

B: gemessene Radioaktivität im Protein (cpm)

A: Forskolin-stimulierte Adenylyl Cyclase (Aktivität in pmol cAMP/min x mg)

S: spezifische Aktivität von [<sup>32</sup>P]ATP (cpm [<sup>32</sup>P]/pmol Enzym)

P: eingesetztes Membran-Protein (mg)

### 2.2.9 Nachweis von Apoptose mit Hilfe des Anti-PARP-Antiserums

Die Untersuchung auf Apoptose erfolgte anhand eines Western Blots apoptotischer Zellextrakte mit einem Antiserum gegen Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) (Anti-PARP, Boehringer Mannheim). PARP ist ein Enzym, das spezifisch an DNA-Bruchstellen bindet. Während der Apoptose wird PARP bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt durch bestimmte Caspasen (Caspasen -3 und -7) gespalten (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). Dabei entstehen aus dem 113 kDa großen Enzym zwei Fragmente mit den Größen 24 und 89 kDa. Die Detektion des 89 kDa PARP-Fragmentes mit dem Anti-PARP-Serum dient daher als ein Apoptose-Marker, das 24 kDa Fragment wird dagegen nicht erkannt.

HEK 293 ACII Zellen (pro Ansatz  $2 \times 10^7$  c) wurden für 6 h mit  $20 \mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durch dreimaliges „freeze-thaw“ lysiert (s. 2.2.3.1) und nach Abdau der DNA (Zugabe von 1/100 Vol DNase I (5 mg/ml) und 1/33 Volumen  $\text{MgCl}_2$ , Schütteln für 30 min bei  $30^\circ\text{C}$  im Wasserbad) über Nacht lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden in je  $200 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen, mit je  $200 \mu\text{l}$  Laemmli Auftragspuffer versetzt, über ein 5 – 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt ( $80 \mu\text{l} = 4 \times 10^6$  c, s. 2.2.6) und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.2.7.1). Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran zunächst  $2 \times 5$  min mit CMF-PBS und  $2 \times 10$  min mit CMF-PBS/Tween gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in I-Light Block inkubiert und erneut  $2 \times 5$  min mit CMF-PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 2 h mit dem Anti-PARP-Antiserum (verdünnt in I-Light Block 1 : 2.000) inkubiert und nicht gebundener Antikörper durch  $4 \times$  (5, 10, 15 und 30 min) Waschen mit CMF-PBS/Tween entfernt.

Nach weiterer Inkubation der Membran mit einem sekundären, AP-gekoppelten Antikörper (anti-rabbit IgG, 1 : 5.000 in I-Light Block verdünnt) für 2 h und anschließendem Waschen (5, 10, 15 und 30 min) mit CMF-PBS/Tween erfolgte die Detektion der Banden durch Chemilumineszenz (s. 2.2.7.2).

## 2.2.10 Heterologe Expression in HEK 293 Zellen

### 2.2.10.1 Transfektion von HEK 293 Zellen über Lipofektion

(Keown *et al.*, 1990)

Die Transfektion von HEK 293 Zellen erfolgte mit der Lipofektionsmethode. Diese wurde sowohl zur transienten Expression eingesetzt als auch zur Herstellung einer stabilen AC-V Zelllinie (s. 2.2.10.3). Parallel wurden HEK 293 Zellen mit pXMD-gal transfiziert, um anhand der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression die Transfektionseffizienz zu bestimmen (s. 2.2.10.2). Die Transfektion über Lipofektion führte zu Transfektionseffizienzen von 40 - 60 %.

Die Lipofektion wurde mit Hilfe der Liposomen-Präparation des polykationischen Lipids DOSPER (1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propyl-amid, Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Dieses Reagenz besteht aus einer sperminen Kopfgruppe und Fettsäureschwänzen. Die positiv geladene spermine Kopfgruppe ist in der Lage, an negativ geladene DNA-Moleküle zu binden. Dadurch erfolgt die Bildung von polykationischen Komplexen, die wiederum unspezifisch an die negativ geladene Oberfläche von zu transfizierenden Zellen bindet und auf diesem Wege von der Zelle aufgenommen wird.

24 h vor der Transfektion wurden HEK 293 Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/15 cm Platte (stabile Transfektion) bzw.  $2,2 \times 10^5$  Zellen/24er „multiwell“ (transiente Transfektion) in MEM mit 10 % (v/v) FCS/(G418) ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und 5 ml (15 cm Platte) bzw. 300  $\mu$ l (24er „multiwell“) frisches Medium ohne FCS/(G418) auf die Zellen gegeben.

Zur Herstellung des Liposomen-DNA Komplexes wurden im Falle der 15 cm Platte 13,5  $\mu$ g DNA (endofree) mit MEM ohne FCS auf 275  $\mu$ l aufgefüllt. Diese Lösung (Transfektionslösung A, s. Vorschrift Boehringer Mannheim) wurde anschließend zur Transfektionslösung B (110  $\mu$ l DOSPER + 165  $\mu$ l MEM ohne FCS) und mit der Pipette vorsichtig vermischt. Nach 15minütiger Inkubation bei RT zur Bildung des DNA-DOSPER-Komplexes wurde die Lösung in das Zellmedium getropft und durch vorsichtiges Schwenken verteilt. Für die Transfektion im 24er „multiwell“ wurden 9  $\mu$ l Transfektionslösung A (incl. 0,45  $\mu$ g DNA) mit 9  $\mu$ l Transfektionslösung B (3,6  $\mu$ l DOSPER + 5,4  $\mu$ l MEM ohne FCS) vermischt und pro „multiwell“ zugegeben. Die Transfektion erfolgte für 6 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden 5 ml (15 cm Platte) bzw. 300  $\mu$ l MEM mit 20 % FCS/(G418)

(24er „multiwell“) zum Medium dazugegeben. 24 h nach Beginn der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Im Fall der 24er „multiwell“ Platten (transiente Transfektion) wurde nach weiteren 24 h die Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität *in vivo* in ganzen Zellen durchgeführt (s. 2.2.5.1). Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie (15 cm Platte) wurden die Zellen in Antibiotika-haltigem Medium (MEM, 10 % (v/v) FCS, 0,5 mg/ml G418) selektiert, wobei alle drei Tage das Medium erneuert wurde. Nach 7-14 Tagen wurden positive Zellklone zu einer polyklonalen Zelllinie vereinigt.

### **2.2.10.2 X-gal Färbung von pXMD-gal-transformierten HEK 293 Zellen**

(Sanes *et al.*, 1986)

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte über den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in pXMD-gal-transfizierten Zellen. HEK 293 wurden wie unter 2.2.10.1 beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit CMF-PBS (Gibco) gewaschen und für 10 min mit 2 % (v/v) Formaldehyd und 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in CMF-PBS fixiert. Anschließend wurde zweimal mit CMF-PBS gewaschen und für 2-10 h bei 37°C in Färbelösung inkubiert.

Die Transfektionseffizienz errechnet sich aus der Anzahl der blau gefärbten Zellen / Anzahl der ausgesäten Zellen.

Färbelösung:            5,13 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$   
                              5,13 mM  $K_4[Fe(CN)_6]$   
                              2,05 mM  $MgCl_2$   
                              1 mg/ml X-gal  
                              in CMF-PBS

### **2.2.10.3 Herstellung einer stabilen Adenylyl Cyclase Typ V Linie in HEK 293 Zellen**

Die Herstellung der stabilen Adenylyl Cyclase Typ V Linie erfolgte durch Transfektion des Expressionsvektors pcDNA3-AC V in HEK 293 über Lipofektion (s. 2.2.10.1). Die „full length“-DNA für die AC-V aus Hasenherz (Wallach *et al.*, 1994) wurde zuvor mit Hilfe der



Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* aus dem Vektor pXMD-AC V herausgeschnitten und anschließend in den Vektor pcDNA3 hinein ligiert (s. 2.2.11.2).

Die Selektion positiver Zellklone nach der Transfektion wurde mit dem Antibiotikum G418 durchgeführt. G418 ist ein Aminoglycosid mit einer zu Neomycin ähnlichen Struktur, welches zur Blockierung der Proteinbiosynthese durch Interaktion mit der ribosomalen Funktion führt. Da bei der Herstellung der stabilen ACV-Linie mit pcDNA3 ein Expressionsvektor verwendet wurde, der das Gen für Aminoglycosid Phosphotransferase besitzt, welches Neomycinresistenz verleiht, können positive Zellklone das G418 detoxifizieren (Southern & Berg, 1982).

Die Analyse der stabil exprimierenden ACV-Zelllinie erfolgte einerseits durch PAGE, Western Blot und anschließender Chemilumineszenz mit AC-spezifischen Antikörpern (s. 2.2.6/2.2.7) und andererseits durch Bestimmung der AC-Aktivität *in vivo* (s. 2.2.5.1).

### **2.2.11 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.11.1 Molekularbiologische Standardverfahren**

Die Durchführung der molekularbiologischen Standardverfahren wie beispielsweise die Kultivierung von *E. Coli*, DNA-Fällung, Phenolextraktion und DNA-Mengenbestimmung erfolgte wie in den Methodenwerken von Sambrook *et al.*, (1990) und Ausubel *et al.*, (1987) beschrieben.

#### **2.2.11.2 Klonierungstechniken**

##### **2.2.11.2.1 Restriktionsverdau**

Der Restriktionsverdau von DNA wurde nach den Herstellerangaben für Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Bei dem Verdau von Plasmid-DNA (s. 2.2.10.3) wurde eine Enzymkonzentration von 0,5-1 U/ $\mu$ l gewählt.

##### **2.2.11.2.2 5'-Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase**

Zur Verhinderung der Rezirkularisierung von Klonierungsvektoren, die mit Restriktionsenzymen verdaut wurden, erfolgte eine Inkubation des Vektors mit alkalischer Phosphatase (CIP). Die

Behandlung mit CIP führt zur Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen der DNA-Enden. Die Dephosphorylierung erfolgte in Pufferbedingungen laut Herstellerangaben für zunächst 30 min bei 37°C mit 2 U CIP/μg DNA. Anschließend wurden erneut 2 U CIP/μg DNA zugegeben und für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 30minütige Inkubation bei 68°C gestoppt.

### **2.2.11.2.3 Ligation**

Vektor-DNA (grundsätzlich „geschnitten“ und 5' dephosphoryliert) und DNA-Fragmente wurden vor der Ligation zur Reinigung in Agarosegelen (s. 2.2.11.4) aufgetrennt und aus diesen isoliert (s. 2.2.11.3.3). Für die Ligation wurden 100 – 200 ng Vektor-DNA und ein zwei- bis fünffacher molarer Überschuss an Fragment-DNA sowie T4-Ligase und Ligationspuffer nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Reaktion wurde für 16 h bei 14°C durchgeführt.

### **2.2.11.2.4 Herstellung kompetenter Zellen**

1 l 2xYT-Medium wurde mit 10 ml einer stationären Kultur von DH5α (*E. coli*) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 220 rpm geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde 15 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 3000 g). Die pelletierten Bakterien wurden zunächst in 1 l bidest. H<sub>2</sub>O (4°C) gewaschen, zentrifugiert und dann in 500 ml bidest. H<sub>2</sub>O (4°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml 10 % Glycerin (4°C) resuspendiert, zentrifugiert und in ein Endvolumen von 2 ml 10 % Glycerin (4°C) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden zu jeweils 90 μl in Eppendorfgefäße aliquotiert, im flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.11.2.5 Transformation durch Elektroporation**

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte durch Elektroporation mit einem „Gene-Pulser“ (Biorad) unter folgenden Bedingungen: Elektrische Feldstärke: 25 μF, Parallelwiderstand: 200 Ohm, Spannung: 2,5 kV. Die Zeitkonstante sollte ca. 4,5 msec betragen.

1 μl DNA (20 – 30 ng in bidest. H<sub>2</sub>O) wurden mit 40 μl kompetenten *E. coli* Zellen (s. 2.2.11.2.4) vorsichtig in einer eisgekühlten Küvette (Biorad Pulser-cuvette) gemischt. Die Küvette wurde trockengewischt, in die Elektroporationsapparatur gestellt und die Zellen unter

den oben genannten Bedingungen transformiert. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml 2xYT-Medium auf die Zellen pipettiert, die Bakteriensuspension in Kulturröhrchen und für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden unterschiedliche Aliquots des Transformationsansatzes auf 2xYT-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Transformationseffizienz nicht eingefrorener kompetenter Zellen lag bei  $10^9$  Kolonien/ $\mu\text{g}$  „supercoiled“ Plasmid-DNA. Waren die kompetenten Zellen eingefroren, betrug die Effizienz  $10^8$  Kolonien/ $\mu\text{g}$ .

### **2.2.11.3 Nukleinsäurepräparationen**

#### **2.2.11.3.1 Plasmid-DNA-Minipräparation**

1,5 ml einer stationären *E. coli* Kultur wurden für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  TNE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) resuspendiert und für 10 min bei RT geschüttelt. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform (1:1) wurde mindestens 1 min kräftig durchmischt (vortexen) und anschließend zentrifugiert (15 min, RT, 10.000 g). 100  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  10 M Ammonium-Acetat und 250  $\mu\text{l}$  96 % EtOH (-20°C) erneut zentrifugiert (15 min, 4°C, 10.000 g). Das Pellet wurde in 70 % EtOH (4°C) gewaschen, getrocknet und in 50 – 100  $\mu\text{l}$  TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Entfernung der RNA erfolgte durch Inkubation mit 5  $\mu\text{g}$  RNase A für 30 min bei 37°C.

#### **2.2.11.3.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab und in hoher Reinheit wurde der „EndoFree Plasmid Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Ausgehend von 200 ml einer stationären *E. coli* Kultur konnten 500 – 1000  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA isoliert werden.

### **2.2.11.3.3 DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraktion Kits“ der Firma Qiagen durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, daß die Agarose nach dem Ausschneiden der Gelstücke mit den entsprechenden DNA-Fragmenten in Gegenwart eines chaotropen Salzes aufgelöst wird und die DNA durch Zusetzen einer Adsorptionsmatrix in Form einer Säule an diese gebunden wird. Nachfolgende Waschschriffe reinigen die DNA, anschließend kann sie in einem geeigneten Puffer oder in H<sub>2</sub>O eluiert werden.

### **2.2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Auftrennung von DNA erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden 0,8 - 2,0 %ige Agarosegele verwendet. Als Gel- und Laufpuffer diente TAE. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Vol Auftragspuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 2 – 5 V/cm. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE für 15 min gefärbt und anschließend für 15 min in dH<sub>2</sub>O wieder entfärbt. Die aufgetrennte DNA wurde mit einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

TAE:                    40 mM Tris-Acetat, pH 8,0  
                             1 mM EDTA

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stimulierung der Adenylyl Cyclasen Typ I, II und V durch Ceramid

Adenylyl Cyclasen von höheren Organismen werden u.a. durch Phosphorylierung verschiedener Kinasen wie z.B. der Proteinkinase C reguliert (Sunahara *et al.*, 1996). Sie generieren den „Second Messenger“ cAMP und stehen auf diese Weise mit anderen Signaltransduktionswegen in Verbindung. Während der „Second Messenger“ Diacylglycerol klassische (c) und neue (n) PKCs aktiviert, ist von Ceramid bekannt, daß es ein Stimulator der atypischen (a) PKC  $\zeta$  ist (Müller *et al.*, 1995).

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung (Böl *et al.*, 1997b) konnte durch punktgerichtete Mutagenese gezeigt werden, daß die Adenylyl Cyclase Typ II (AC-II) durch eine Phorbol-ester-stimulierte Proteinkinase C am Threonin 1057 phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. In dieser Arbeit sollte der Einfluß des „Second Messengers“ Ceramid auf die Aktivität von Adenylyl Cyclasen untersucht werden.

#### 3.1.1 Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid *in vivo*

Die Untersuchung eines möglichen Effektes von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase wurde in der Zelllinie HEK 293 (humane embryonale Nierenzellen) durchgeführt, in der verschiedene AC-Isoformen stabil und transient überexprimiert wurden. Eine erste Bestimmung der Aktivität nach Stimulation des Enzyms mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid erfolgte an der stabil in HEK 293 überexprimierten AC-Isoform II (Chen & Okayama, 1988; Hülster, 1997).

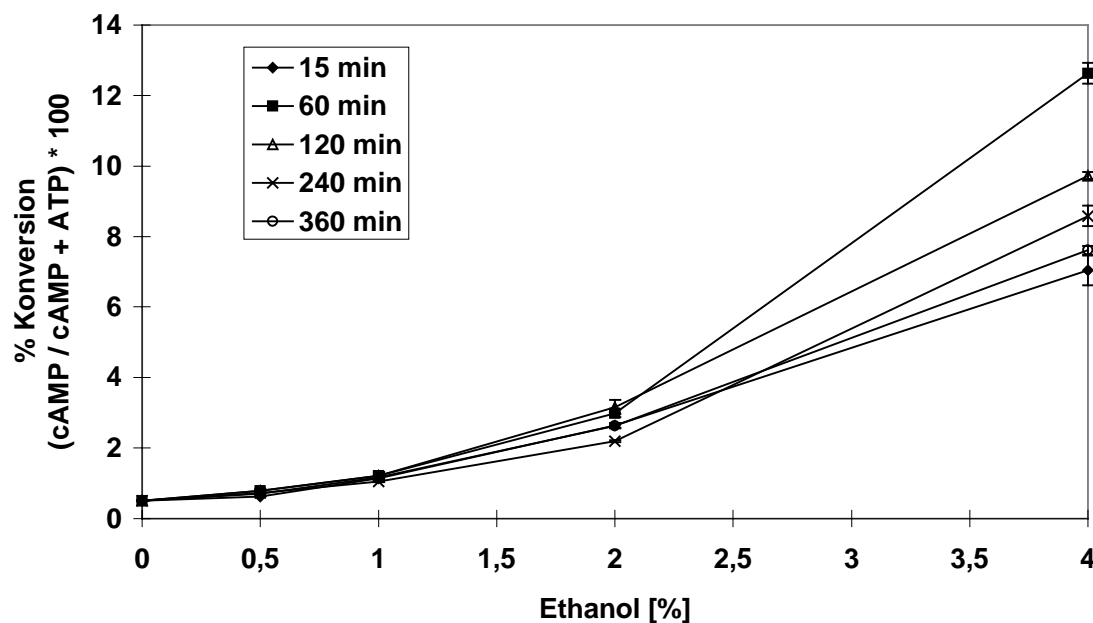
##### 3.1.1.1 Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II

Die Ceramide wurden zum Zweck der Stimulierung von Zellen in Kulturmedien im Verhältnis 98:2 in Ethanol und Dodecan gelöst. Ji *et al.* (1995) hatten für U 937 Zellen gezeigt, daß natürlich vorkommendes, ohne Zusätze in Ethanol gelöstes Ceramid nicht in der Lage ist, von den Zellen aufgenommen zu werden. Erst in Verbindung mit Dodecan kommt es zur Bildung Liposomen-ähnlicher Partikel aus Ethanol, Dodecan und Ceramid, die zu einer milchig-weißen Verfärbung der Flüssigkeit führen (Mollner, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse). Mit Hilfe von

„laser light scattering“ konnte ebenso gezeigt werden, daß sich ohne Ceramid keine dieser Partikel bilden. In Form dieser Partikel ist nun eine Aufnahme von Ceramid in die Zellen möglich.

Der Einsatz des Lösungsmittels Ethanol war nicht unproblematisch, da Hoffman *et al.* (1990) für verschiedene Gewebe und Zelllinien zeigen konnten, daß Ethanol in der Lage ist, die Aktivität cAMP-generierender Systeme zu stimulieren. Anhand unterschiedlicher Arbeiten zeigte sich, daß Ethanol die Halbwertszeit der Aktivierung der Adenylyl Cyclasen durch nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga herabsetzt. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß ein Teil der stimulatorischen Wirkung von Ethanol über eine Geschwindigkeitsänderung der G-Proteinaktivierung oder über eine Änderung im Kopplungsprozeß von G-Protein und Adenylyl Cyclase vermittelt wird (Rabin *et al.*, 1983; Luthin *et al.*, 1984; Saito *et al.*, 1985).

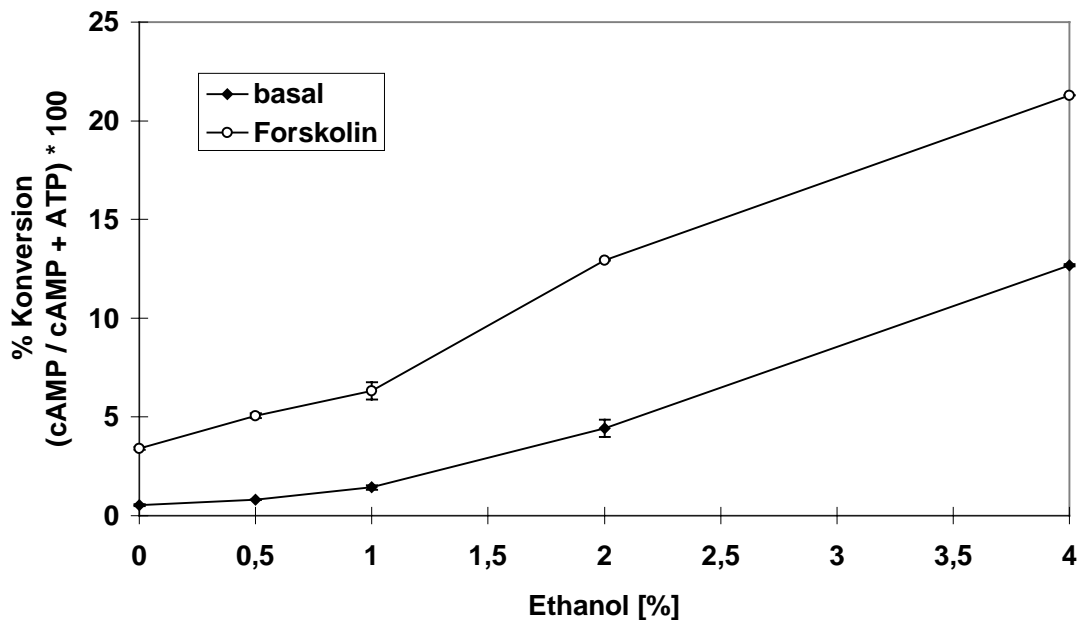
Um einen zu stark aktivierenden Effekt von Ethanol auf das Adenylyl Cyclase-System in dem gewählten Zellsystem ausschließen zu können, wurde zunächst die Wirkung von Ethanol auf die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Ethanol für variable Zeiten stimuliert. Im anschließenden Tritium-Adenin-Test wurde die AC-Aktivität bestimmt (s. 2.2.5.1).



**Abb. 3** Einfluß von Ethanol auf die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen. HEK 293 ACII Zellen wurden konzentrations- und zeitabhängig mit Ethanol stimuliert. Die ACII-Aktivität wurde nach den angegebenen Zeiten mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

In Abb. 3 ist die exponentielle Zunahme der cAMP-Bildung durch steigende Konzentrationen von Ethanol im Zellmedium dargestellt. Bei einer finalen Konzentration von 1 % Ethanol und einer Inkubationszeit von 60 min liegt der Stimulationsfaktor gegenüber Kontrollzellen ohne Ethanol bei 2,4. Wurden die Zellen mit 2 % Ethanol stimuliert, erhöht sich der Faktor auf 5,9 und bei 4 % Ethanol im Kulturmedium ergibt sich ein Faktor von 25,1.

Die unterschiedlichen Stimulationszeiten haben bei niedrigen Ethanolkonzentrationen bis 1 % Ethanol keinen signifikanten Einfluß auf die ACII-Aktivität. Bei einer Konzentration von 4 % Ethanol im Zellmedium zeigt sich jedoch, daß die cAMP-Bildung bis zu einem Peak bei 60 min ansteigt und dann kontinuierlich nach 6 h wieder fast bis zum 15 min-Wert abfällt.

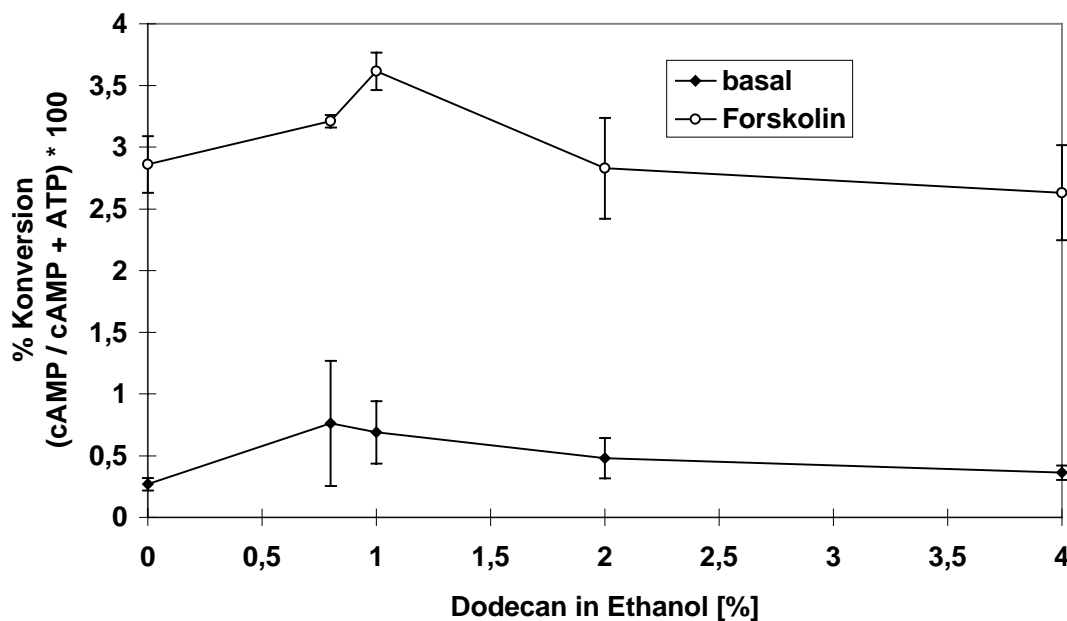


**Abb. 4** Einfluß von Ethanol auf die AC-Aktivität basaler und Forskolin-stimulierter HEK 293 ACII Zellen. HEK 293 ACII Zellen wurden konzentrationsabhängig mit Ethanol stimuliert. Nach 60 min wurde die ACII-Aktivität  $\pm 10 \mu\text{M}$  Forskolin für 10 min mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Abb. 4 zeigt den Einfluß von Ethanol auf das Stimulierungsverhältnis von unstimulierter (basaler) zu der mit dem pflanzlichen Diterpen Forskolin stimulierten ACII-Aktivität. Aus dieser Abb. läßt sich ersehen, daß die Forskolin-stimulierte ACII-Aktivität im Vergleich zur basalen etwas steiler ansteigt. Zusätzlich zeigt sich, daß das Verhältnis der cAMP-Bildung von Forskolin zu basal mit steigender Ethanolkonzentration abnimmt. Ohne Zugabe von Ethanol zum

Kulturmedium liegt der Stimulationsfaktor von Forskolin bei 6,3, mit 1 % Ethanol bei 4,4 und mit 4 % Ethanol im Medium nur noch bei 1,7.

Im Hinblick auf diese Beobachtungen wurde zur Stimulierung der Zellen mit Ceramid eine Konzentration von 1 % Ethanol im Kulturmedium während der Inkubationsphasen für vertretbar befunden. Desweiteren wurde anschließend ein möglicher Effekt des zweiten Lösungsmittelanteils Dodecan auf die ACII-Aktivität untersucht. Hierzu wurden bei einer finalen Konzentration von 1 % Ethanol im Zellmedium die Dodecanmengen variiert und die cAMP-Bildung in gleicher Weise gemessen.



**Abb. 5 Einfluß von Dodecan auf die ACII-Aktivität.** HEK 293 ACII Zellen wurden konzentrationsabhängig mit Dodecan in 1 % Ethanol stimuliert. Nach 60 min wurde die ACII-Aktivität  $\pm$  10  $\mu$ M Forskolin für 10 min mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Aus Abb. 5 läßt sich entnehmen, daß die Menge an Dodecan keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität der ACII besitzt. Sowohl die basale als auch die Forskolin-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität scheinen bis zu einer Konzentration von 0,75 % bzw. 1 % Dodecan in Ethanol anzusteigen und anschließend wieder abzufallen. Dieses Ergebnis muß jedoch aufgrund des relativ großen Fehlers bei den Messungen relativiert werden.

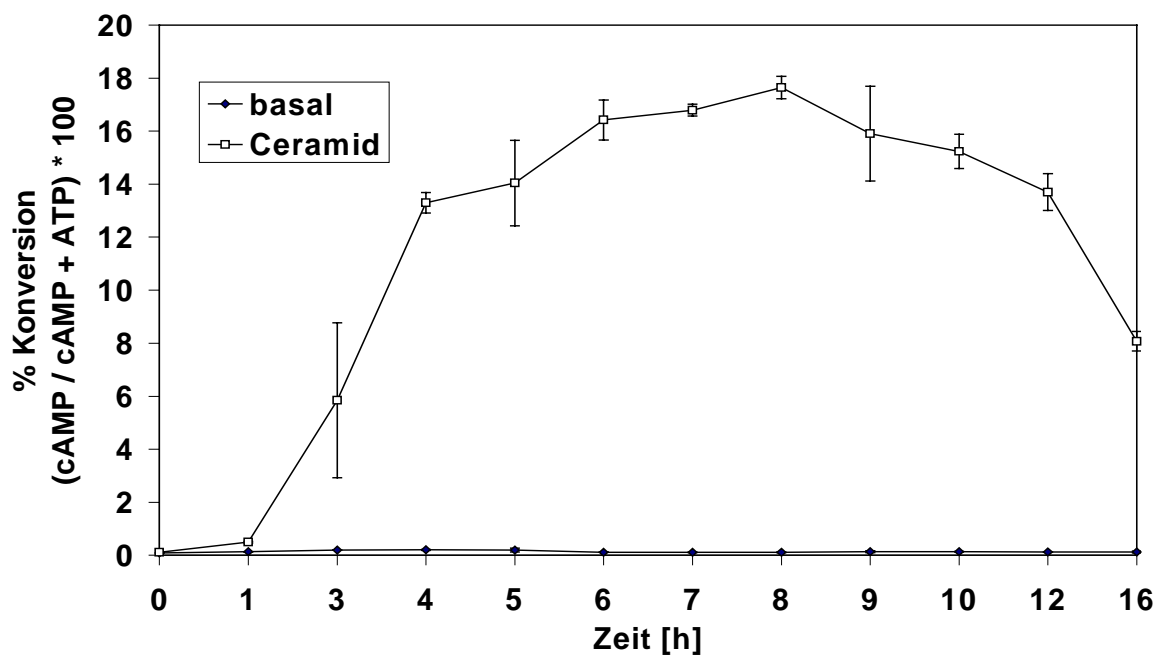
Um den etwas kritischen Bereich von 0,5 – 1,5 % Dodecan in Ethanol zu vermeiden und in Anlehnung an Ji *et al.* (1995), wurde daher in allen folgenden Experimenten das Lösungsmittel



Ethanol in einer finalen Konzentration von 1 % unter Zusatz von Dodecan (98:2) als Lösungsvermittler im Kulturmedium eingesetzt, um die Aufnahme von Ceramid sowie Derivaten und anderen Lipiden in die Zelle zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang läßt sich noch erwähnen, daß sich die Konversionen bei 0 bzw. 2 % Dodecan auch bei Zugabe von Forskolin ( $\pm$  Forskolin) ungefähr im gleichen Bereich befinden.

### 3.1.1.2 Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid *in vivo*

Eine erste Bestimmung der Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation mit 20  $\mu$ M natürlich vorkommenden Ceramiden (Mix aus C<sub>18</sub>- und C<sub>24</sub>-Ceramiden aus Rinderhirn) erfolgte nach unterschiedlichen Zeiten mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests (s. 2.2.5.1).



**Abb. 6 Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid.** HEK 293 ACII Zellen wurden zeitabhängig mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Die ACII-Aktivität wurde nach den angegebenen Zeiten mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

In Abb. 6 ist eine Kinetik des Effektes von C<sub>18/24</sub>-Ceramid auf die basale Aktivität der stabil überexprimierten ACII in HEK 293 Zellen gezeigt. Nach 8 h wird mit einer ca. 124fachen Erhöhung der cAMP-Bildung durch 20  $\mu$ M Ceramid (s. 3.1.2) gegenüber dem Kontrollwert ein Maximum erreicht, während die fortdauernde Stimulation der Zellen mit Ceramid wieder zu

einem Rückgang der ACII-Aktivität führt (16 h = 57fache Stimulation). Mit einem Stimulationsfaktor von 116 wurde nach 6 h ein nur leicht unter dem maximalen Effekt (s.o.) liegender Stimulationsbereich erreicht.

### **3.1.1.3 Einfluß von Ceramid auf die Zellvitalität von HEK 293 ACII Zellen**

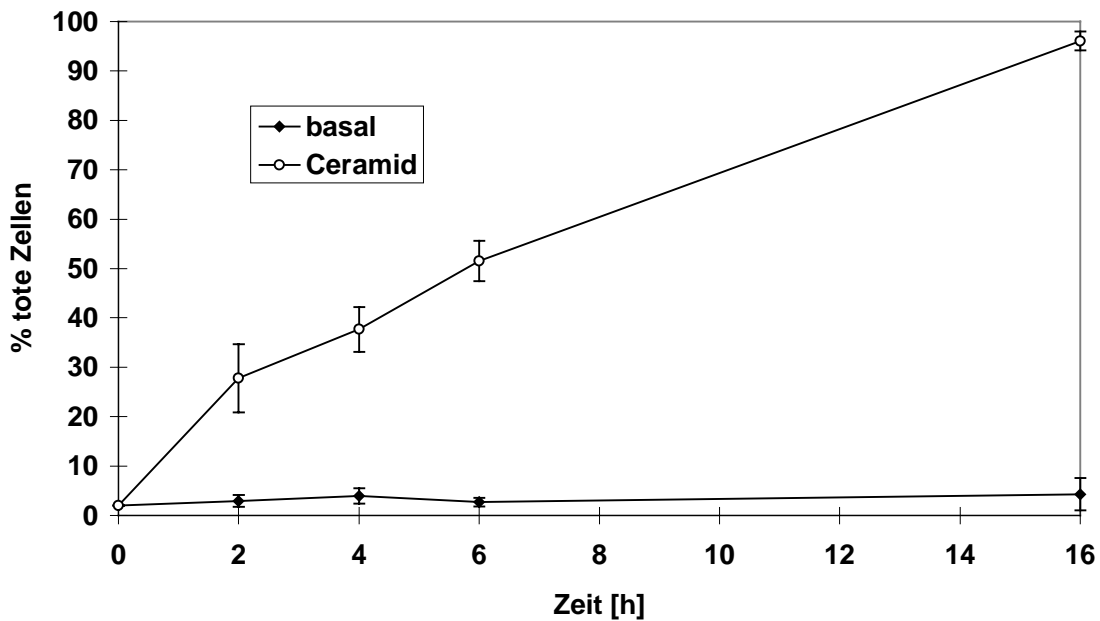
Der unter Pkt. 3.1.1.2 beobachtete Effekt einer rückläufigen ACII-Aktivität bei fortdauernder Stimulation von HEK 293 ACII Zellen mit Ceramid nach 9 – 16 h, könnte möglicherweise mit einem verstärkten Absterben der Zellen zusammenhängen.

Durch die Zugabe von Ceramid zum Kulturmedium kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Sie verlieren zuerst ihre durch sternförmige Ausläufer gekennzeichnete Struktur zu Lasten einer kugeligen Verformung und dadurch ihre Zelladhärenz. Dieses führt dazu, daß die Zellen in kugeligen Zellhaufen im Medium schwimmen. Derartigem Streß ausgesetzte Zellen können Schädigungen davontragen oder im extremen Fall den Zelltod erleiden, wobei dieser apoptotisch oder nekrotisch sein kann.

#### **3.1.1.3.1 Nachweis von Zelltod mittels Trypanblaufärbung**

Zur eingehenderen Untersuchung, ob das oben beobachtete Phänomen tatsächlich auf einen vermehrten durch Zellschädigung hervorgerufenen Zelltod zurückgeführt werden kann, wurden die Zellen nach Stimulation mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid für verschiedene Zeiträume mit Trypanblau angefärbt und unter dem Mikroskop untersucht (s. 2.2.1.3). Der Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran hindurch in die Zelle. Lebende Zellen können ihn aktiv ausscheiden; tote oder geschädigte Zellen hingegen vermögen dies nicht mehr und bleiben somit blau gefärbt.

Abb. 7 bestätigte die Vermutung von starken Zellschädigungen bzw. Zelltod. Es zeigte sich eine annähernd lineare Zunahme des Absterbens von Ceramid-behandelten HEK 293 ACII Zellen über einen Zeitraum von 16 h. Nach 6 h Stimulation der Zellen mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid weisen schon ca. 50 % der Zellen Schädigungen auf und nach 16 h liegt der Anteil der geschädigten Zellen bei 95 %. Die Stimulation mit exogenem Ceramid bedeutet für die Zellen also extremen Streß bis hin zum Zelltod, wobei durch diese Methode nicht geklärt werden konnte, ob die Zellschädigungen auf Apoptose oder Nekrose zurückzuführen sind.



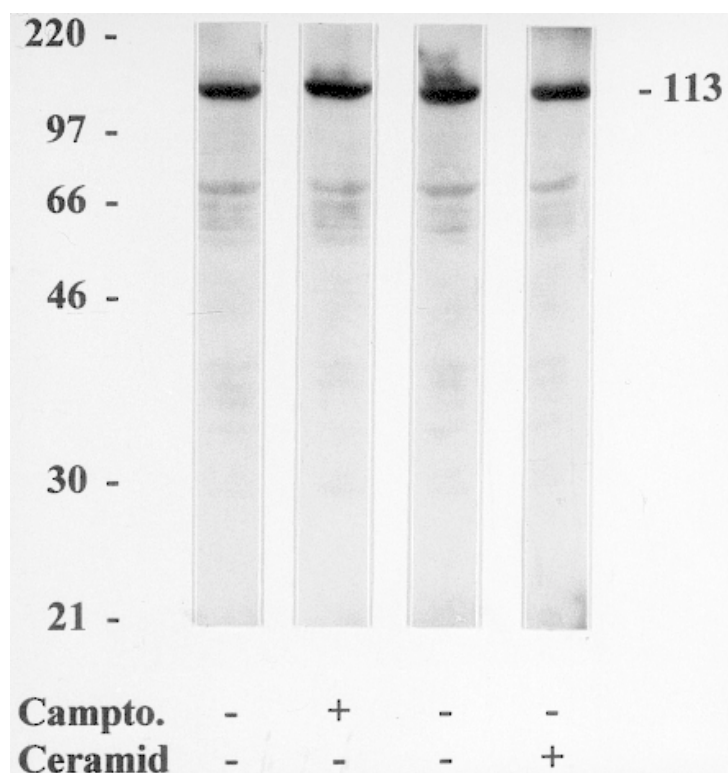
**Abb. 7 Vitalität von HEK 293 ACII Zellen nach Stimulation mit Ceramid.** HEK 293 ACII Zellen wurden zeitabhängig mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach den angegebenen Stimulationszeiten wurden die Zellen nach Trypanblaufärbung gezählt und so der Anteil der toten Zellen in % bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

### 3.1.1.3.2 PARP-Antikörper zur Indikation von Apoptose

Es ist seit einigen Jahren bekannt, daß die Bildung von Ceramid durch Aktivierung des Sphingomyelin-Signaltransduktionsweges zur Apoptose von Zellen führt. Als Aktivatoren dienen in diesem Fall u.a. Mitglieder der TNF-Superfamilie (55 kDa TNF-Rezeptor, Fas und NGF), IL-1, Dexamethason, Serum-Entzug, Chemotherapeutika sowie ionisierende Strahlung (Jarvis *et al.*, 1996; Bose *et al.*, 1995).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Apoptose und dem Ansteigen der ACII-Aktivität durch exogen zugegebenes Ceramid in HEK 293 ACII Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und nach Abbau der DNA über Nacht lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und über ein 5 - 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 2.2.6) und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 2.2.7.1). Der Nachweis der Apoptose erfolgte über ein Antiserum (Anti-PARP, Boehringer Mannheim), welches Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) erkennt. PARP ist ein Enzym, das spezifisch an DNA-Bruchstellen bindet.

Während der Apoptose wird PARP bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt durch bestimmte Caspasen (Caspasen -3 und -7) gespalten (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). Dabei entstehen aus dem 113 kDa großen Enzym zwei Fragmente mit den Größen 24 und 89 kDa. Die Detektion des 89 kDa PARP-Fragmentes mit dem Anti-PARP-Serum dient daher als ein Apoptose-Marker (das 24 kDa Fragment wird nicht erkannt) und wird über einen zweiten, AP-gekoppelten Antikörper mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht (s. 2.2.7.2).



**Abb. 8** Test auf Apoptose in Ceramid-stimulierten HEK 293 ACII Zellen mit dem Anti-PARP-Antiserum. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M  $C_{18/24}$ -Ceramid (Spur 4) stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan, Spur 3) bzw. mit 10  $\mu$ M Camptothecin (Spur 2) (Kontrolle: DMSO, Spur 1). Anschließend wurden die Zellen lysiert und nach Abbau der DNA über Nacht lyophilisiert. Die lyophilisierten Proteine wurden über ein 5 – 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt ( $4 \times 10^6$  c) und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Test auf Apoptose erfolgte mit dem Anti-PARP-Antiserum (1:2.000 verdünnt) und an alkalische Phosphatase gekoppelten Ziege-anti-Hase Antikörper (anti-rabbit-IgG-AP, 1:5.000 verdünnt) mit anschließender Chemilumineszenz.

Die Vermutung, daß eine mehrstündige Ceramid-Inkubation in HEK 293 ACII Zellen Apoptose induziert, wurde mit dem PARP-Test nicht bestätigt (Abb. 8). Sowohl bei den Kontroll- als auch den mit Ceramid behandelten Zellen wurde nur eine Bande von 113 kDa detektiert, welche die intakte PARP darstellt. Das Fehlen der 89 kDa-Bande deutet darauf hin, daß in den untersuchten Zellen keine Apoptose vorliegt.

HEK 293 ACII Zellen wurden in Hinblick auf den Nachweis von Apoptose (Positivkontrolle) ebenfalls für 6 h mit Camptothecin (10  $\mu$ M), einem Apoptose induzierenden Agens (Suzuki *et al.*, 1997), inkubiert. Da diese Positivkontrolle nicht positiv ausfiel, ist hier keine Aussage über das Auftreten von Apoptose möglich. In einem vergleichbaren Experiment in HL 60 Zellen konnte nach Inkubation mit Camptothecin (6 h) jedoch eine schwache Bande bei 89 kDa detektiert werden, was auf die Induktion von Apoptose in diesen Zellen hinweist (Mollner, 1999, unveröffentlichte Ergebnisse).

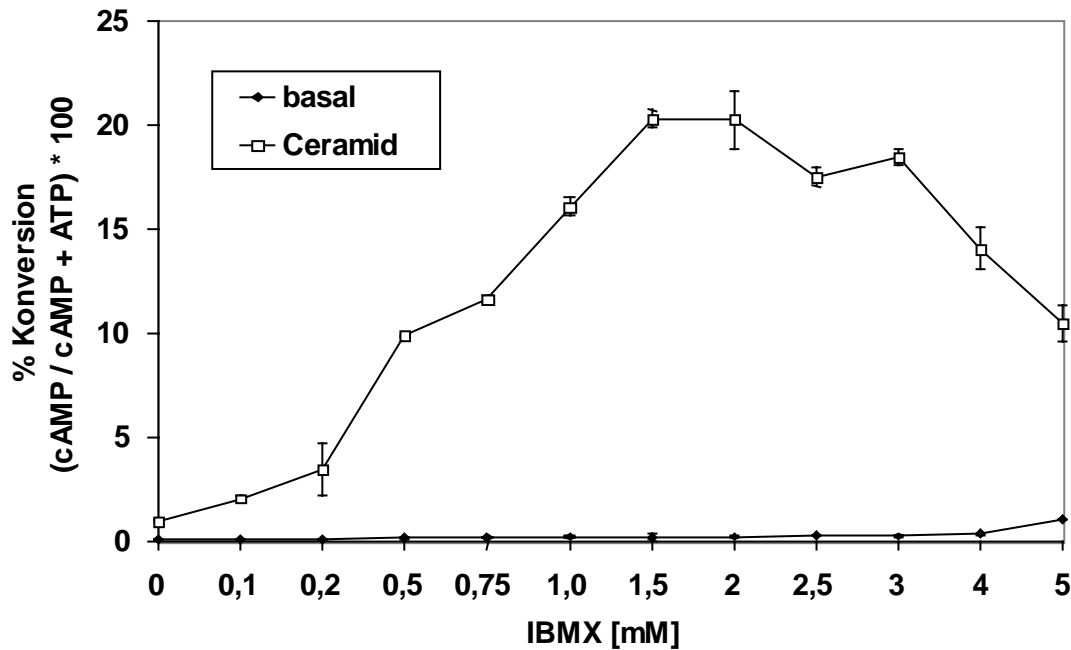
Im weiteren Verlauf der Untersuchungen des Effektes von Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase wurde im Bereich des nahezu maximalen Effektes von 20  $\mu$ M Ceramid nach 6 h Stimulation gearbeitet, um die beiden Komponenten Zellvitalität und Stimulation zu optimieren.

#### **3.1.1.4 Wirkung des Phosphodiesterasehemmers IBMX auf die Ceramid stimulierte**

##### **cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen**

In dem hier angewendeten Meßsystem für die cAMP-Bildung, dem Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) wird 10 min vor dem Markieren der Zellen mit  $^3$ H-Adenin der Phosphodiesterasehemmer Isobutylmethylxanthin (IBMX) zugegeben. Die cAMP-Konzentration in einer Zelle hängt vom Verhältnis der beiden Geschwindigkeiten ab, mit denen es durch die Adenylyl Cyclase aus ATP synthetisiert bzw. durch eine cAMP-abbauende Phosphodiesterase unter Bildung von AMP gespalten wird. IBMX sorgt dafür, daß ab dem Zeitpunkt der Zugabe cAMP vermindert abgebaut wird und somit das ab diesem Zeitpunkt gebildete tritiierte cAMP in die Messung eingeht. Mit Hilfe des Phosphodiesterasehemmers kann daher auch überprüft werden, ob eine gemessene AC-Aktivität tatsächlich von gebildetem cAMP oder von anderen, chemisch verwandten Verbindungen herrührt, die ein ähnliches Laufverhalten auf den verwendeten Säulen (Dowex- / Alox-Säulen) aufweisen. Auf diese würde der Einsatz eines PDE-Inhibitors keinen Einfluß haben.

Zu diesem Zweck wurden HEK 293 ACII Zellen für 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert und anschließend unter Verwendung variabler Konzentrationen von IBMX die cAMP-Bildung mit Hilfe des Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) bestimmt.



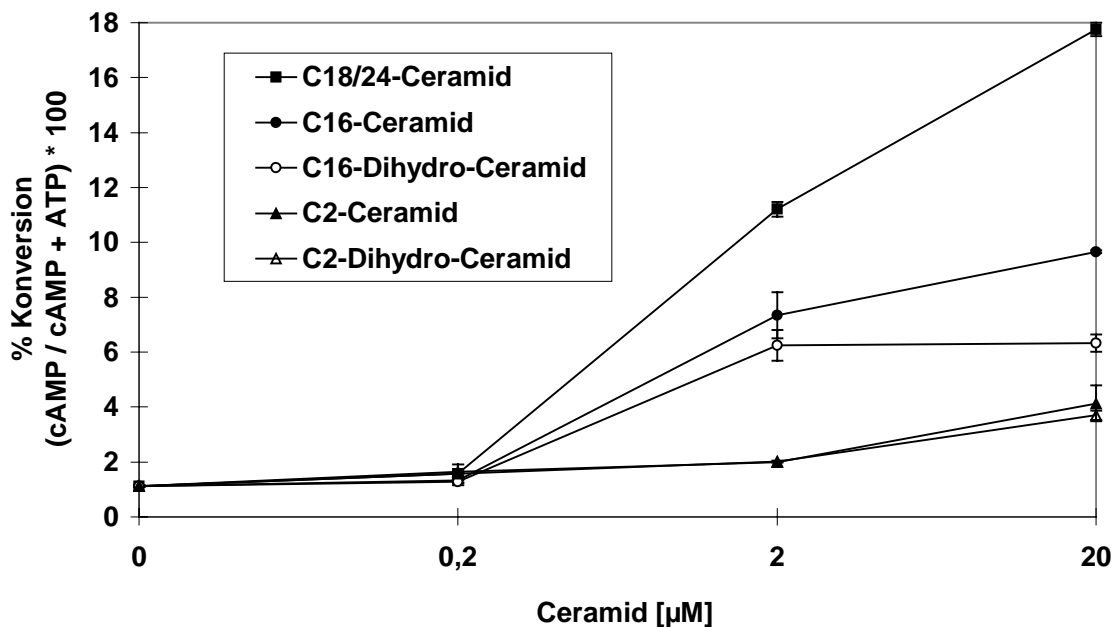
**Abb. 9** Einfluß von IBMX auf die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). 10 min vor Zugabe von 2  $\mu$ Ci [2,8-<sup>3</sup>H]-Adenin/500  $\mu$ l Medium wurde IBMX in den angegebenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Die ACII-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Anhand dieses Experiments konnte bestätigt werden - wie in Abb. 9 dargestellt -, daß durch die Stimulation der HEK 293 ACII Zellen mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid die cAMP-Bildung erhöht wird. Ohne Zugabe von IBMX lag der Konversionswert von ATP zu cAMP der mit Ceramid stimulierten Zellen bei 0,96 %. Mit steigenden IBMX-Konzentrationen erhöhte sich auch die gemessene Konversion, bis sie mit einem Wert 20,3 % bei einer Konzentration von 1,5 – 2 mM IBMX das Maximum erreicht hatte. Bei weiter steigenden IBMX-Konzentrationen sanken die Konversionswerte wieder (5 mM IBMX = 0,5 % Konversion), was auf eine zelltoxische oder inhibierende Wirkung von IBMX bei diesen Konzentrationen zurückzuführen sein könnte. Für weitere Experimente wurde die in diesem Test in der Literatur häufig verwendete IBMX-Konzentration von 1 mM (16,1 % Konversion) eingesetzt (Federman *et al.*, 1992).

### 3.1.2 Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch verschiedene Ceramid- und Dihydroceramid-Derivate

In Anbetracht des beobachteten Effektes von  $C_{18/24}$ -Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II wurde untersucht, ob und inwieweit andere Ceramid-Derivate Einfluß auf die cAMP-Bildung der AC-II haben. Im Besonderen wurde hierbei die Wirkung von Dihydroceramiden auf die Aktivität der AC-II beobachtet. Dihydroceramide sind metabolische Vorstufen natürlich vorkommender Ceramide, denen die 4,5-trans-Doppelbindung fehlt, die stereochemische Konfiguration jedoch erhalten bleibt. Ebenso sind die Aufnahme in die Zelle und der Metabolismus der Dihydroceramide denen der Ceramide sehr ähnlich (Bielawska *et al.*, 1993). Da ihnen jedoch die biologische Aktivität der Ceramide fehlt, werden sie gewöhnlich als Negativkontrollen in Experimenten eingesetzt, in denen die Aktivität der Ceramide untersucht wird.

HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit je  $20 \mu\text{M}$  verschiedener Ceramid- und Dihydroceramid-Derivate stimuliert. Anschließend wurde die ACII-Aktivität mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests bestimmt (2.2.5.1).



**Abb. 10** Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch verschiedene Ceramid- und Dihydroceramid-Derivate. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 0,2, 2 und  $20 \mu\text{M}$  verschiedener Ceramid- und Dihydroceramid-Derivate ( $C_{18/24}$ -Ceramid,  $C_{16}$ -Ceramid,  $C_{16}$ -Dihydro-Ceramid,  $C_2$ -Ceramid und  $C_2$  Dihydro-Ceramid) stimuliert. Die ACII-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Abb. 10 zeigt eine Dosis-Wirkung-Kurve des Effektes von verschiedenen Ceramid und Dihydroceramid-Derivaten auf die basale ACII-Aktivität. Die Ergebnisse zeigen, daß die Mischung aus C<sub>18</sub>- und C<sub>24</sub>-Ceramiden mit Abstand die stärkste Stimulation auslöste, während das nur geringfügig kürzere C<sub>16</sub>-Ceramid nur noch etwa halb so effektiv war. Das Acetyl-Derivat (C<sub>2</sub>) stimuliert die basale ACII-Aktivität sogar erst ab einer Konzentration > 20 µM. Besonders auffällig ist, daß die Dihydroceramid-Derivate, die, wie oben beschrieben, normalerweise als Negativ-Kontrollen eingesetzt werden, fast genauso effektiv wie ihre ungesättigten Gegenstücke waren (60 - 80 %).

Die weiteren Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden in der Regel mit der am stärksten stimulatorisch auf die AC-II wirkenden Mixtur aus C<sub>18</sub>- und C<sub>24</sub>-Ceramiden durchgeführt.

### 3.1.3 Ausweitung der Ergebnisse auf weitere Subtypen der Adenylyl Cyclase

Die Frage, ob Ceramid auch auf andere Subtypen der Adenylyl Cyclase eine ähnliche Wirkung ausübt oder ob dieser Effekt spezifisch für die AC-II sein könnte, sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden. Die Adenylyl Cyclase-Typen I, II und V wurden aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den drei Subfamilien der Adenylyl Cyclasen ausgewählt: AC-I (Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-stimulierbar; inhibierbar durch die βγ-Untereinheiten der G-Proteine), AC-II (stimulierbar durch die βγ-Untereinheiten der G-Proteine zusammen mit α<sub>s</sub>) und AC-V (Mitglied der Ca<sup>2+</sup>-inhibierbaren Subfamilie). HEK 293 Zellen des Wildtyps dienten der Kontrolle für endogen exprimierte AC-Enzyme. Diese vier Zelllinien wurden hinsichtlich des Effektes von Ceramid auf die unstimulierte (basale) sowie die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität untersucht.

Die Zelllinie HEK 293 wurde als Untersuchungssystem des Effektes von Ceramid auf verschiedene Adenylyl Cyclase-Typen ausgewählt, da sie ein sehr effektives und vielseitiges System für die Expression von rekombinanten Proteinen darstellt (Robbins & Horlick, 1998). Es ist möglich, mit Hilfe von HEK 293 Zellen innerhalb von drei Wochen stabile Zelllinien herzustellen. Zu diesem Zweck wurden die AC-Subformen I, II und V in HEK 293 Zellen stabil überexprimiert.

Zwei dieser Zelllinien des Typs HEK 293, in denen die AC-Isotypen I und II stabil überexprimiert sind, wurden mir freundlicherweise von Frau Dr. Hülster am Institut zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der stabilen AC-I Zelllinie erfolgte durch Transfektion des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3-ACI (AC-I aus Rinderhirn) in HEK 293 Zellen mit der Calcium-Phosphat Methode (Hülster, 1997, Dissertation). Die stabile AC-II Zelllinie wurde ebenfalls



durch Transfektion mit der Calcium-Phosphat Methode hergestellt und zwar durch eine Kotransfektion des Vektors pXMD-ACII (AC-II aus Ratte) mit pRSVneo, der das Neomycinresistenzgen enthält und somit G418, das zur Selektion in Eukaryoten dient, detoxifizieren kann (Hülster, 1997, Dissertation).

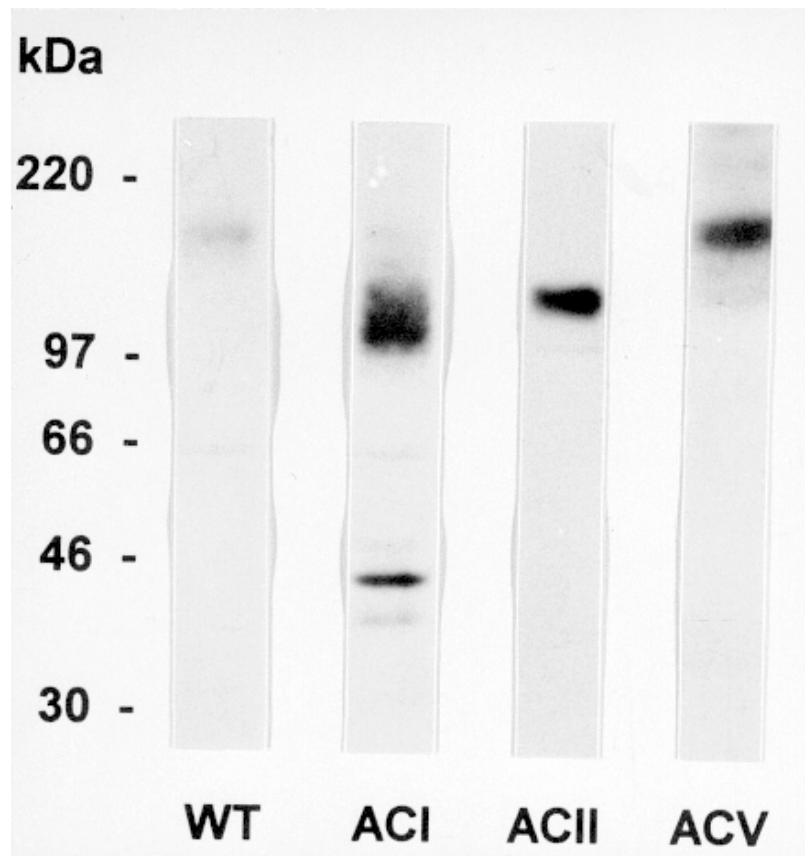
Eine weitere HEK 293 Zelllinie, in der die Adenylyl Cyclase Typ II stabil überexprimiert ist, wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. Böhl für einige Experimente überlassen (Böhl et al., 1997b).

Desweiteren erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die stabile Überexpression der AC-V in HEK 293 Zellen.

### **3.1.3.1 Herstellung einer stabilen ACV Zelllinie in HEK 293**

Zur Untersuchung des Effektes von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ V wurde diese AC-Isoform stabil in HEK 293 Zellen exprimiert.

Dazu mußte die vollständige cDNA der AC-V aus Hasenherz zunächst aus dem Vektor pXMD-ACV (Wallach *et al.*, 1994) in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert werden, da der Vektor pXMD1 kein Gen für Neomycinresistenz oder ein anderes Resistenzgen für die Selektion in Eukaryoten besitzt. Die Klonierung von AC-V in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 erfolgte durch Excision des AC-V Fragmentes mit *KpnI* und *XhoI* aus pXMD-ACV und Ligation in den mit *KpnI* und *XhoI* geöffneten pcDNA3 (s. 2.2.11.2). Neben den für die Amplifikation und Selektion in *E.coli* notwendigen Sequenzen für den Replikationsursprung aus dem Plasmid ColE1 und der Ampicillinresistenz enthält pcDNA3 den Replikationsursprung des SV40 Virus zur Amplifikation in SV40-transfizierten Zellen und das Gen für Neomycinresistenz zur Selektion in Eukaryoten. Die multiple Klonierungsstelle (Polylinker) wird durch die Phagenpromotoren von T7 und SP6 begrenzt. Die Transkription der in pcDNA3 klonierten AC-V steht unter der Kontrolle des Cytomegalie Virus Promotors. Der Einbau wurde durch Restriktion mit *KpnI* und *XhoI* überprüft. Der so entstandene AC-V Expressionsklon pcDNA3-ACV wurde mit der Lipofektionsmethode in HEK 293 Zellen transfiziert (s. 2.2.10.1), und durch Selektion in G418-haltigem Medium (500 µg/ml) wurde eine stabile AC-V exprimierende polyklonale Zelllinie (s. 2.2.10.3) generiert.

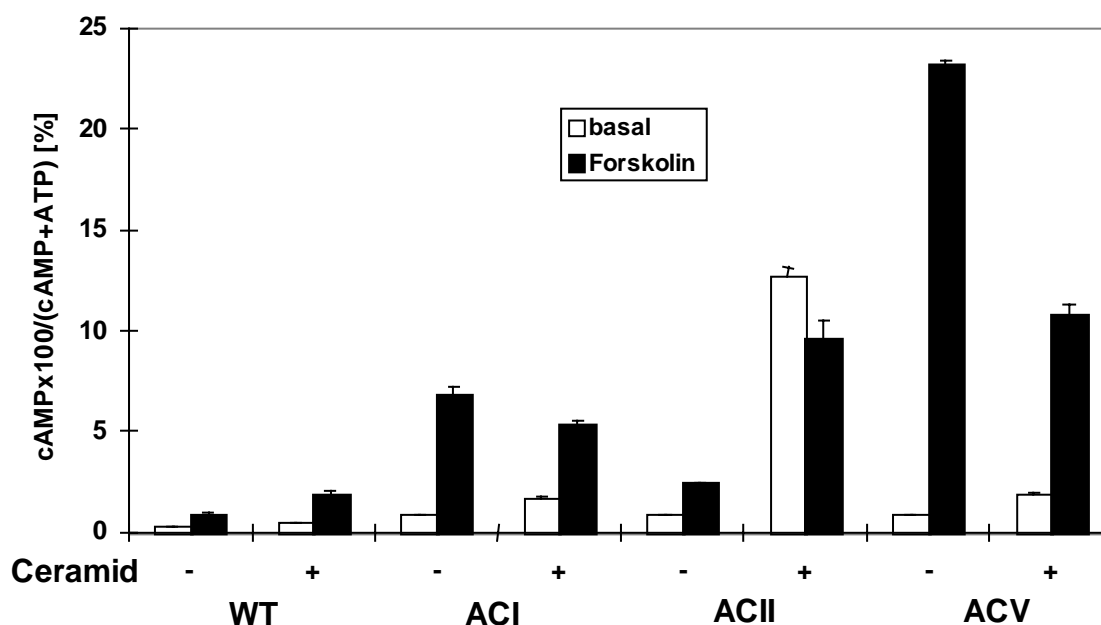


**Abb. 11 Die stabilen AC-I, AC-II und AC-V Zelllinien.** Jeweils 150  $\mu$ g Membranproteine von HEK 293 Zellen (WT), der stabilen AC-I Zelllinie, der stabilen AC-II Zelllinie und der stabilen AC-V Zelllinie wurden in 5 - 15 %igen PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Adenylyl Cyclasen erfolgte mit dem an alkalische Phosphatase gekoppelten monoklonalen BBC-2 Antikörper (1:10.000 verdünnt) und anschließender Chemilumineszenz.

In Abb. 11 ist der immunologische Nachweis der rekombinanten Adenylyl Cyclasen Typ I, Typ II und Typ V aus den stabilen HEK 293 Zelllinien im Vergleich zu den endogenen Adenylyl Cyclasen aus HEK 293 Wildtyp Zellen dargestellt. Durch Vergleich mit den endogenen Adenylyl Cyclasen aus HEK 293 Wildtyp Zellen zeigt sich die starke Expression der rekombinanten AC-I, AC-II und AC-V. Die Banden im niedermolekularen Bereich der AC-I sind wahrscheinlich auf Proteolyse zurückzuführen.

### 3.1.3.2 Einfluß von Ceramid auf die basale sowie die Forskolin-stimulierte Aktivität verschiedener Adenylyl Cyclasen *in vivo*

Anhand der stabilen AC-I, AC-II und AC-V Zelllinien sollte der Effekt von Ceramid auf unterschiedliche Subtypen der Adenylyl Cyclase im *in vivo* System untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die AC-Aktivität der Zellen jeweils nach Stimulation für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid in einem Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) bestimmt.



**Abb. 12** Einfluß von Ceramid auf die basale sowie die Forskolin-stimulierte Aktivität verschiedener Adenylyl Cyclasen. Die stabilen HEK 293 Zelllinien der AC-Isoformen I, II und V sowie HEK 293 Wildtyp Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

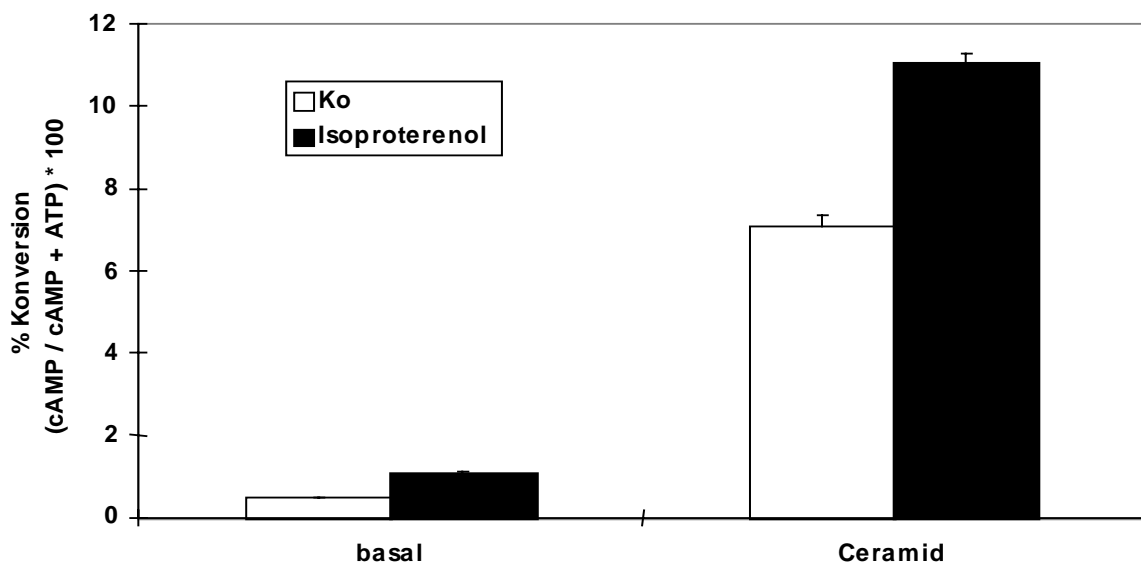
Abb. 12 zeigt den Effekt von  $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid auf verschiedene Isoformen der AC-Familie. Der größte Effekt von  $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid auf die unstimulierte (basale) AC-Aktivität konnte bei der Isoform II beobachtet werden. Die ACII-Aktivität wurde um den Faktor 8 - 15 erhöht, während sich die Aktivitäten der Isoformen I und V wie auch die des Wildtyps nur verdoppelten.

Neben der Erhöhung der basalen cAMP-Bildung hatte Ceramid ebenso einen Einfluß auf die Forskolin-stimulierte AC-Aktivität. Obwohl die Forskolin-stimulierte Aktivität der AC-II in Verbindung mit Ceramid immer noch dreimal so hoch wie in Kontrollzellen war, lag sie doch

niedriger als die in Abwesenheit von Forskolin mit Ceramid stimulierte Aktivität. Die Wirkung des Diterpens Forskolin scheint also eher in einer Inhibierung der Ceramid-stimulierten cAMP-Bildung zu liegen. Betrachtet man die AC-Isoformen I und V, so zeigt sich, daß die Ceramid-stimulierte Aktivität dieser Isotypen nicht wie die AC-II durch Forskolin inhibiert wurde. Hier scheint eher die Aktivität in Gegenwart von Forskolin durch Ceramid gehemmt (40 – 70 %). Bei der AC-V fiel die Stimulationsrate in Abwesenheit von Forskolin von Faktor 27,5 auf Faktor 5,5 nach Behandlung der Zellen mit Ceramid. Im Falle der AC-I sank die Aktivierungsrate von Faktor 8,2 auf Faktor 3,2.

### 3.1.4 Einfluß von Ceramid auf die Hormon-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung der Adenylyl Cyclasen besteht über einen  $G_s$ -Proteingekoppelten Rezeptor. Hormonrezeptoren binden u.a. verschiedene Neurotransmitter wie Adrenalin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin. Nach Bindung des Hormons überträgt der Rezeptor das Signal in das Zellinnere, in dem er über die Aktivierung eines G-Proteins intrazellulär lokalisierte Effektoren wie Adenylyl Cyclase (über  $G_s$ ) und Phospholipase C (über  $G_q$ ) aktiviert (Stadel & Lefkowitz, 1989; Birnbaumer *et al.*, 1989).



**Abb. 13** Einfluß von Ceramid auf die Isoproterenol-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M  $C_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach 15minütiger Stimulation  $\pm$  1  $\mu$ M Isoproterenol wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Um den Einfluß von C<sub>18/24</sub>-Ceramid auf die Hormon-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich für 15 min mit dem Adrenalinanalogon Isoproterenol inkubiert. Die cAMP-Bildung wurde wie üblich über den Tritium-Adenin-Test bestimmt (2.2.5.1).

Aus Abb. 13 läßt sich ersehen, daß sich - im Gegensatz zur Forskolinstimulierung – bei Zugabe von 1 µM Isoproterenol zu Ceramid stimulierten HEK 293 ACII Zellen deren Aktivität zusätzlich erhöht (Faktor 1,6). Desweiteren scheint in diesem Fall ein Synergismus der gleichzeitigen Stimulation der AC-II mit Ceramid und Isoproterenol (11,1 % Konversion) gegenüber den Einzelstimulationswerten (Ceramid: 7,1 % Konversion, Isoproterenol: 1,1 % Konversion) vorzuliegen.

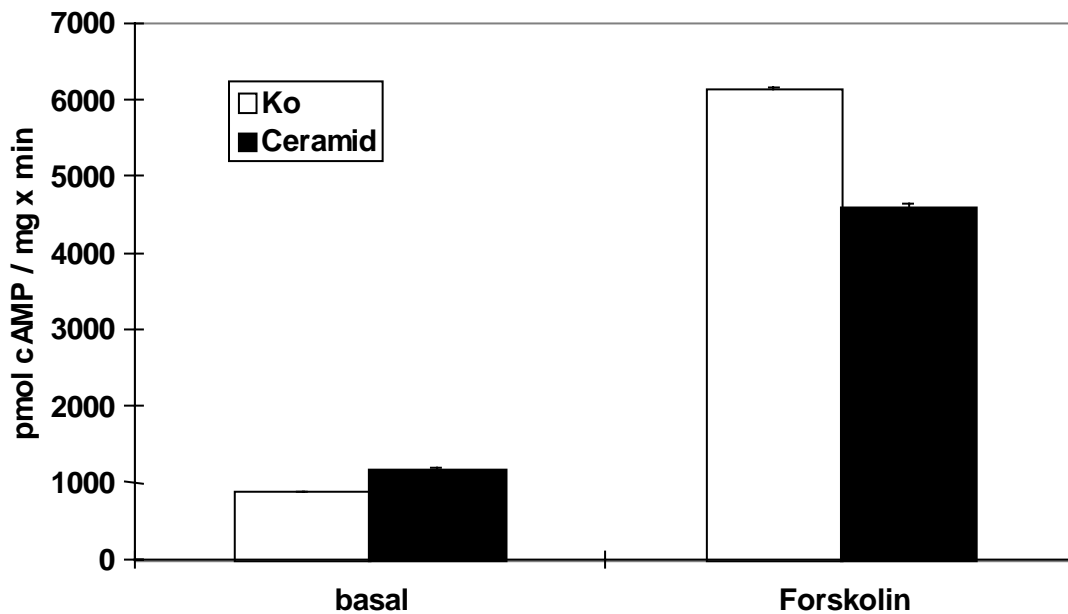
### **3.2 Einfluß von C<sub>18/24</sub>-Ceramid auf die *in vitro* Aktivität der Adenylyl**

#### **Cyclase Typ II**

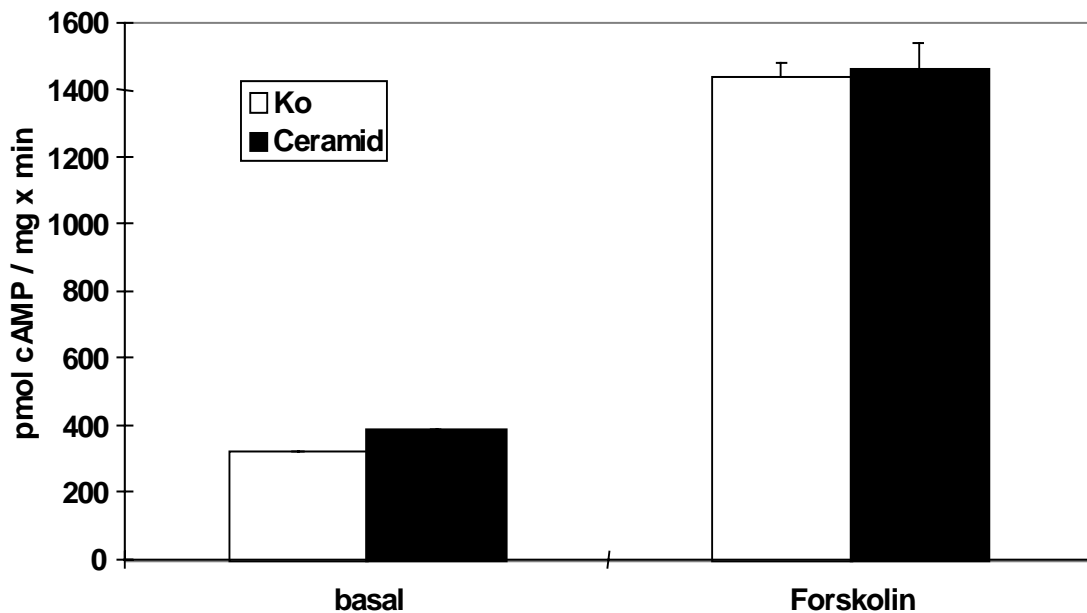
Mit dem Ziel, ein System zu finden, das für weitere Untersuchungen zur Klärung des Mechanismus‘ der Wirkung von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II die Vorteile gleicher Proteinmengen und damit ähnlicher ACII-Mengen sowie das Wegfallen hindernder Zellmembranen bietet, wurden *in vitro*-Experimente an HEK 293 ACII Membranen durchgeführt. Dieses System basiert auf der Präparation von Membranen aus dem zu untersuchenden Zelltyp und anschließender Bestimmung der Adenylyl Cyclase Aktivität (Salomon *et al.*, 1974). Hierbei ist es möglich, die Zellen sowohl vor der Membranpräparation verschiedenen Effektoren auszusetzen, als sie auch erst während des Aktivitätstests zu stimulieren.

Beide Vorgehensweisen wurden in bezug auf den stimulatorischen Effekt von Ceramid auf die Aktivität der AC-II untersucht. Die Präparation der HEK 293 ACII Membranen erfolgte zum einen aus Zellen, die für 6 h mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid vorinkubiert worden waren; zum anderen wurden die Membranen aus unstimulierten Zellen präpariert und erst für den Aktivitätstest (30 min) mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert. Die Bestimmung der ACII-Aktivität erfolgte wie unter Pkt. 2.2.3.3 beschrieben.

a)



b)



**Abb. 14** Einfluß von  $C_{18/24}$ -Ceramid auf die Aktivität der Adenyl Cyclase Typ II *in vitro*. **a)** HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit  $20 \mu\text{M}$   $C_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach Präparation der Membranen erfolgte die Bestimmung der ACII-Aktivität an jeweils  $5 \mu\text{g}$  Membranprotein ( $\pm 100 \mu\text{M}$  Forskolin). **b)** Nach Membranpräparation aus HEK 293 ACII Zellen erfolgte die Bestimmung der ACII-Aktivität an jeweils  $5 \mu\text{g}$  Membranprotein. Untersucht wurde der Einfluß der Stimulatoren Forskolin ( $\pm 100 \mu\text{M}$  Forskolin) sowie  $20 \mu\text{M}$   $C_{18/24}$ -Ceramid (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

In Abb. 14a zeigt sich, daß sich der stimulatorische Effekt von Ceramid auf die unstimulierte ACII-Aktivität (basal), der unter *in vivo*-Bedingungen beobachtet werden konnte (s. 3.1.1.2), nach der Präparation von Membranen nicht reproduzieren ließ. Statt einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 15 - 20 lag die Stimulierungsrate in diesem Fall nur noch bei 1,3. Betrachtet man die Forskolinstimulierung, so läßt sich aus Abb. 14a ersehen, daß die Aktivierungsrate von 6,9 in Kontrollmembranen auf 3,9 in Membranen aus mit Ceramid vorbehandelten Zellen absank. Weiterhin ist zu bemerken, daß die Forskolin-stimulierte ACII-Aktivität in Membranen nach Behandlung der Zellen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid für 6 h im Vergleich zur Kontrollaktivität nur noch 75 % betrug. Dieser Effekt steht wiederum im Gegensatz zu der Beobachtung, daß Forskolin die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität *in vivo* partiell zu inhibieren schien (3.1.3.2). In Abb. 14b erkennt man, daß die Inkubation der HEK 293 ACII Membranen mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid weder einen Einfluß auf die unstimulierte (basale) noch auf die Forskolin-stimulierte ACII-Aktivität ausübte.

Die beiden getesteten *in vitro*-Systeme stellten aus den oben aufgeführten Gründen daher keinen geeigneten Weg zur weiteren Untersuchung des Effektes von Ceramid auf die ACII-Aktivität dar.

### **3.3 Stimulation der HEK 293 ACII Aktivität durch $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid in permeabilisierten Zellen**

Die Permeabilisierung von HEK 293 ACII Zellen sollte in dieser Arbeit dazu genutzt werden, verschiedene Substanzen in die Zellen einzubringen. Dieses könnten Ceramid oder andere Effektoren sein, deren Einfluß auf den Signaltransduktionsweg des Effektes von Ceramid auf die AC-II untersucht werden soll. Auf diesem Weg wird auch  $^{32}\text{P}$ - $\alpha$ -ATP in die Zelle gebracht, um eine für alle Proben gleiche Menge an „heißem“ ATP zu gewährleisten. Es wäre möglich, daß permeabilisierte Zellen eventuell auch weiterhin einen Ceramidstoffwechsel ermöglichen. Die Permeabilisierung von Zellen stellt in diesem Fall einen Kompromiß zwischen dem *in vivo*-System des Tritium-Adenin-Tests (s. 2.2.5.1) und dem *in vitro*-System der Membranen (s. 2.2.3.3) dar, bei dem der stimulatorische Effekt von Ceramid auf die AC-II nicht mehr beobachtet werden konnte (s. 3.2).

### 3.3.1 Vortest zur Permeabilisierung

HEK 293 ACII Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin (LPC) für 10 min bei 30° C inkubiert, wobei der Permeabilisierungszustand der Zellen mit *p*-Nitrophenylphosphat bzw. durch Zellzählung mit Trypanblau kontrolliert wurde (s. 2.2.1.3). Im Fall der Trypanblaufärbung ist jeweils der prozentuale Anteil an permeabilisierten, d.h. gefärbten Zellen angegeben.

**Tab. 2 Permeabilisierungstest mit L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin.** 1) HEK 293 ACII Zellen wurden bei 30°C in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  c/ml in den angegebenen Konzentrationen mit L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin sowie 1 mM *p*-Nitrophenylphosphat für 10 min inkubiert. Ein – deutet auf keine Färbung, ein + auf eine schwache, ++ auf eine gut sichtbare und +++ auf eine kräftige Gelbfärbung hin. 2) Nach Inkubation der HEK 293 ACII Zellen bei 30°C in einer Dichte von  $1 \times 10^7$  c/ml in den angegebenen Konzentrationen mit L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin für 10 min wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt, gezählt und so der Anteil der toten Zellen in % bestimmt

	Kon- troll- Zellen	10 $\mu$ g/ml LPC	25 $\mu$ g/ml LPC	50 $\mu$ g/ml LPC	70 $\mu$ g/ml LPC	80 $\mu$ g/ml LPC	90 $\mu$ g/ml LPC	100 $\mu$ g/ml LPC	120 $\mu$ g/ml LPC	150 $\mu$ g/ml LPC
Gelbfärbung durch pNPP	-	-	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
% permeabilisierte Zellen (Trypanblaufärbung)	8%	11%	18%	36%	45%	58%	71%	82%	95%	100%

Mit 50  $\mu$ g/ml LPC trat nur eine schwache Gelbfärbung auf, die mit einer Permeabilisierung von ca. 36 % der Zellen korrelierte (s. Tab. 2). 100  $\mu$ g/ml LPC führten dagegen zu einer starken Gelbfärbung (Permeabilisierungsrate ca. 82 %).

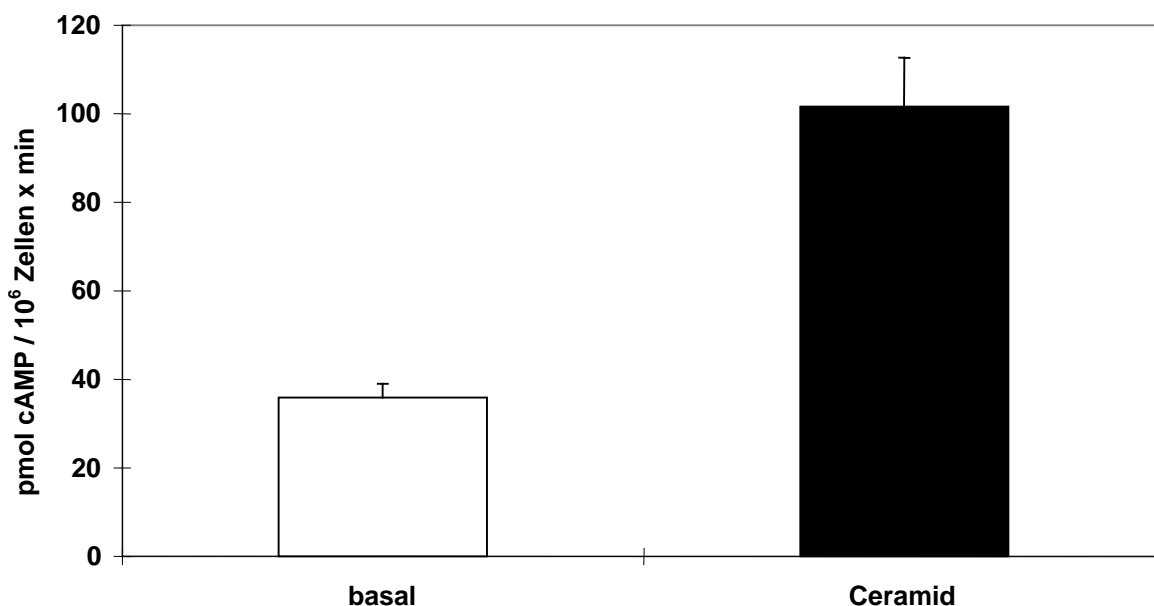
Bei 120  $\mu$ g/ml bzw. 150  $\mu$ g/ml LPC fiel zusätzlich zu einer Permeabilisierung von 95 % bzw. 100 % der Zellen die DNA aus, was dazu führte, daß sich die Zellsuspension nicht mehr pipettieren ließ.

Aus diesem Grund wurden 100  $\mu$ g/ml LPC (10 min; 30°C) mit einer Permeabilisierungsrate von ca. 82 % für weitere Permeabilisierungsexperimente ausgewählt.



### 3.3.2 Zellpermeabilisierung von mit Ceramid stimulierten HEK 293 ACII Zellen und anschließende Bestimmung der ACII-Aktivität

Unter den getesteten Permeabilisierungsbedingungen (100  $\mu\text{g/ml}$  LPC; 10 min; 30°C) wurde eine Bestimmung der ACII-Aktivität an HEK 293 ACII Zellen nach Stimulation mit  $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid (20  $\mu\text{M}$ , 6 h) durchgeführt (s. 2.2.4.2).



**Abb. 15** Einfluß von  $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II in permeabilisierten HEK 293 ACII Zellen. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Je  $1 \times 10^7$  Zellen wurden innerhalb von 10 min mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Lysophosphatidylcholin bei 30°C permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der ACII-Aktivität bei einer weiteren 20minütigen Inkubation unter gleichen Bedingungen. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

In Abb. 15 ist das Ergebnis des Aktivitätstests an permeabilisierten HEK 293 ACII Zellen dargestellt. Nach Stimulation der Zellen mit Ceramid kommt es zu einer Aktivitätserhöhung um den Faktor 2,8. Dieser Wert liegt im Vergleich zur Bestimmung der ACII-Aktivität *in vivo* (Faktor 15 - 20; Tritium-Adenin-Test) erheblich niedriger, aber ein stimulierender Effekt von Ceramid auf die AC-II bleibt deutlich meßbar.

Dieses Ergebnis muß jedoch relativiert werden, da Lysophosphatidylcholin einen stark inhibierenden Einfluß auf die Aktivität der AC-II besitzt (Mollner, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse). Betrachtet man die gemessene ACII-Aktivität von nicht mit LPC behandelten Zellen (Permeabilisierungsgrad ca. 10 % aufgrund von mechanischer Beanspruchung durch Pipettieren

und Zentrifugieren) und rechnet diese auf einen Wert für 100 % Permeabilisierung hoch, so stellt sich heraus, daß sich der Aktivitätsbereich der mit LPC permeabilisierten Zellen nur noch bei ca. 2 % der nicht behandelten Zellen befindet.

Legt man die oben erhaltene Beobachtung den Messungen zugrunde, so zeigt sich, daß auch dieses Meßsystem für Untersuchungen zur Klärung des Signaltransduktionsweges des Effektes von Ceramid auf die AC-II nicht geeignet ist.

### **3.4 Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch endogen gebildetes**

#### **Ceramid**

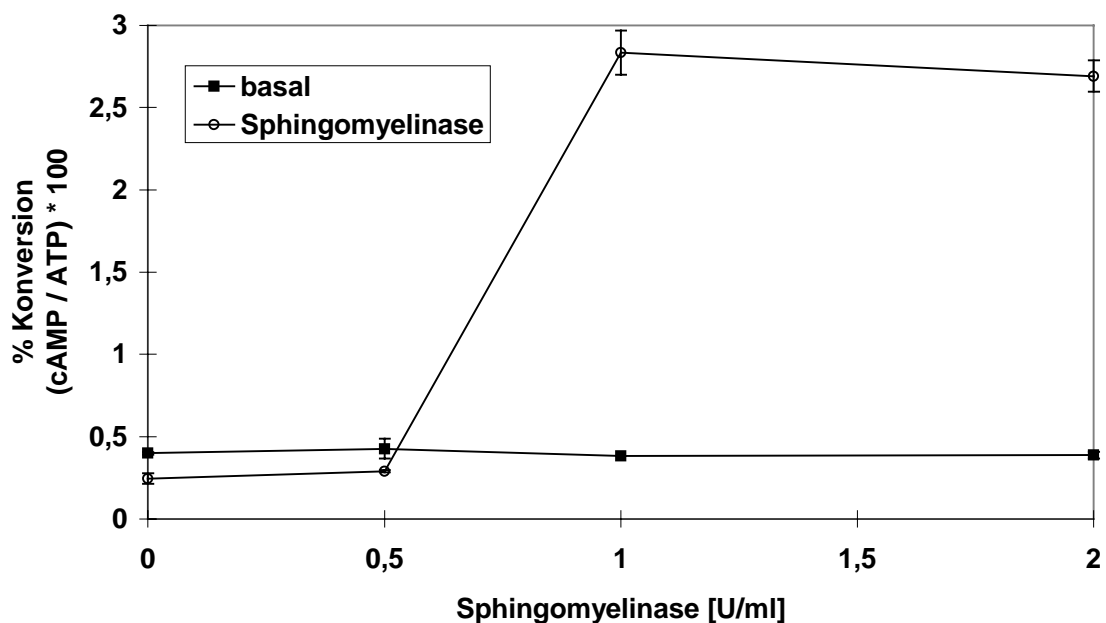
Zur Verifizierung, ob der beobachtete Effekt von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II auch wirklich auf die Wirkung des exogen zugeführten Ceramids zurückzuführen ist, wurde in weiteren Experimenten der endogene Ceramid-Level in HEK 293 ACII Zellen erhöht. Dieses kann auf drei unterschiedlichen Wegen geschehen, zum einen durch Aktivierung einer endogenen Sphingomyelinase (SMase), die Sphingomyelin in Ceramid und Phosphorylcholin spaltet, desweiteren durch Inhibierung einer Ceramidase, die für den Abbau von Ceramid zu Sphingosin verantwortlich ist und schließlich durch Aktivierung der *de novo*-Synthese von Ceramid. Im folgenden wurden die beiden ersten Möglichkeiten experimentell überprüft.

#### **3.4.1 Untersuchung des Effektes von bakterieller Sphingomyelinase auf die Aktivität der AC-II**

Es sind zur Zeit fünf Klassen von Sphingomyelinasen (SMasen) bekannt (definiert über ihr pH-Optimum), die über die Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind: Zum einen eine saure, lysosomale Isoform (pH-Optimum ~ pH 5) (Barnholz *et al.*, 1966) und zum anderen zwei Isoformen mit neutralem pH-Optimum, von denen die eine ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges, membrangebundenes Enzym und die andere ein  $Mg^{2+}$ -unabhängiges, cytosolisches Enzym ist (Rao & Spence, 1976, Okazaki *et al.*, 1994). Zusätzlich wurden eine  $Zn^{2+}$ -abhängige, saure Isoform, die ebenfalls über das Gen der lysosomalen Isoform codiert wird (Spence *et al.*, 1989) und eine Isoform mit alkalischem pH-Optimum (Liu *et al.*, 1997) in der Literatur beschrieben. Alle fünf Isoformen der Sphingomyelinase werden in Verbindung mit verschiedenen Signaltransduktionswegen gebracht.

Verschiedene Effekte von Ceramid konnten durch metabolische Manipulation des endogenen Ceramid-Levels *in vivo* nachgeahmt werden (Okazaki *et al.*, 1989, Mathias *et al.*, 1993, Pyne *et al.*, 1996). Praktisch wird die Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels durch Zugabe einer bakteriellen Sphingomyelinase zum Zellmedium erreicht. Diese spaltet Sphingomyelin aus der äußeren Zellmembran und löst auf diesem Weg die Akkumulation membranständigen Ceramids aus.

In den folgenden Experimenten wurde durch Zugabe einer neutralen Sphingomyelinase aus einer *Streptomyces* Spezies zum Medium der HEK 293 ACII Zellen untersucht, ob der beobachtete Effekt von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II direkt auf die Wirkung des Ceramids zurückzuführen ist. Nach Stimulation der HEK 293 ACII Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von bakterieller SMase (0,5 – 2 U/ml) für verschiedene Zeiten (0 – 48 h), wurde die Aktivität der AC-II im Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) bestimmt.



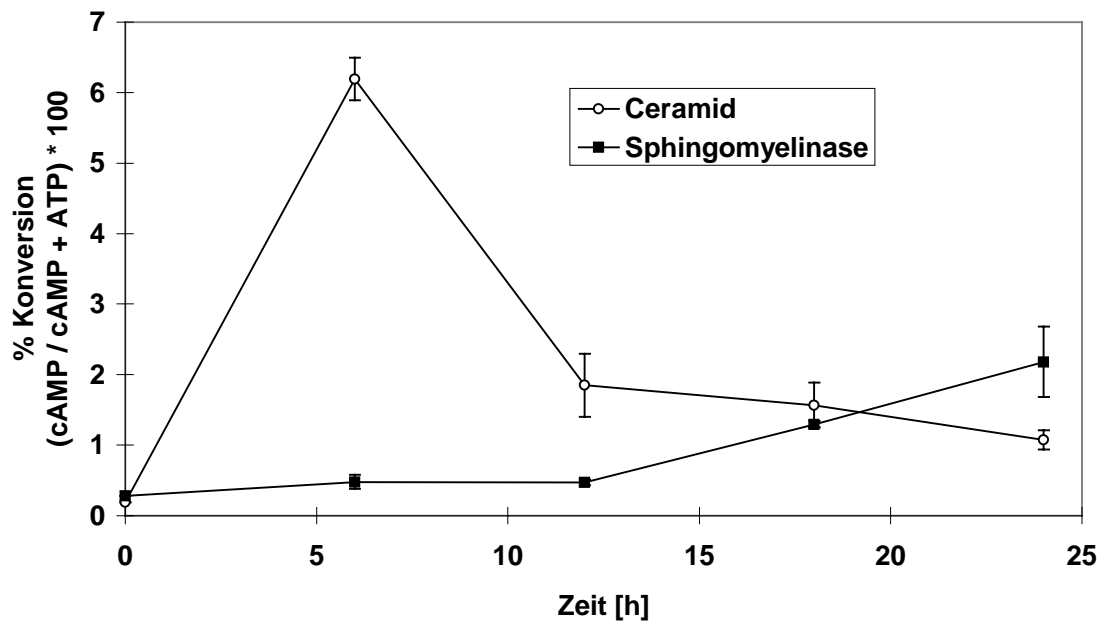
**Abb. 16** Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch bakterielle Sphingomyelinase. HEK 293 ACII Zellen wurden für 16 h mit 0,5, 1 und 2 U/ml bakterieller SMase stimuliert (basal: 50 % Glycerin 1:8). Die ACII-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Aus Abb. 16 kann entnommen werden, daß es nach 16 h bis zu einer Konzentration von 0,5 U/ml SMase nicht zu einer Stimulierung der AC-II Aktivität kam, erst bei einer Konzentration von 1 U/ml Sphingomyelinase als nächstem untersuchtem Wert stieg die AC-II Aktivität signifikant an. Der Stimulationsindex lag in diesem Fall bei einem Faktor von 7,4, was auf eine signifikante

Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch endogen gebildetes Ceramid hinweist. Sowohl die erforderliche SMase-Konzentration als auch der beobachtete Aktivitätsanstieg stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Pyne & Pyne (1996), die ebenfalls erst ab 1 U/ml bakterieller Sphingomyelinase einen signifikanten Effekt auf die Bildung von cAMP in Cholera-Toxin-behandelten ASM („air smooth muscle“) Zellen beobachten konnten. Im Gegensatz zu deren Beobachtungen an ASM Zellen - weiterer Anstieg der cAMP-Bildung bis zu einer Konzentration von 5 U/ml SMase – steht jedoch, daß die Aktivität mit gesteigerter Zugabe von SMase nicht weiter anstieg. In dem hier untersuchten Zellsystem war es nicht sinnvoll, Konzentrationen größer 2 U/ml SMase noch auszuwerten, da die Zellsterblichkeit über 90 % lag (5 U/ml SMase, Daten nicht gezeigt). Die Zellsterblichkeit betrug bei 1 U/ml SMase ca. 10 %, bei 2 U/ml bereits ca. 50 %.

In Abb. 17a ist ein Vergleich der Stimulationskinetiken der AC-II durch exogen zugeführtes C<sub>18/24</sub>-Ceramid sowie durch endogen durch bakterielle SMase gebildetes Ceramid dargestellt. C<sub>18/24</sub>-Ceramid wurde in einer Konzentration von 20 µM, Sphingomyelinase von 1 U/ml zugesetzt. Als signifikanter Unterschied der beiden Kinetiken konnte beobachtet werden, daß es bei exogen zugeführtem Ceramid bereits nach 8 h zum Maximum der ACII-Aktivität kam. Die Aktivität nahm daraufhin relativ schnell wieder ab und näherte sich nach 24 h dem Ausgangswert (s. auch 3.1.1.2), was höchstwahrscheinlich auf die hohe Mortalität der Zellen zurückzuführen ist (s. 3.1.1.3.1). Der durch Akkumulation endogenen Ceramids hervorgerufene Verlauf der Kinetik weist ein deutlich abweichendes Muster auf. Hier wurde eine signifikante Stimulation der AC-II mit einem Stimulationsindex von Faktor 4,7 erst nach 18 h erreicht. Diese Erhöhung der Aktivität fiel nach 24 h nicht wieder ab, sondern verstärkte sich noch auf Faktor 7,8. In einem weiteren Experiment wurde die Stimulationsdauer mit bakterieller Sphingomyelinase auf 48 h ausgeweitet. Es zeigte sich, daß die ACII-Aktivität auch bis 48 h nach Stimulationsbeginn noch ansteigt (Abb. 17b).

a)



b)

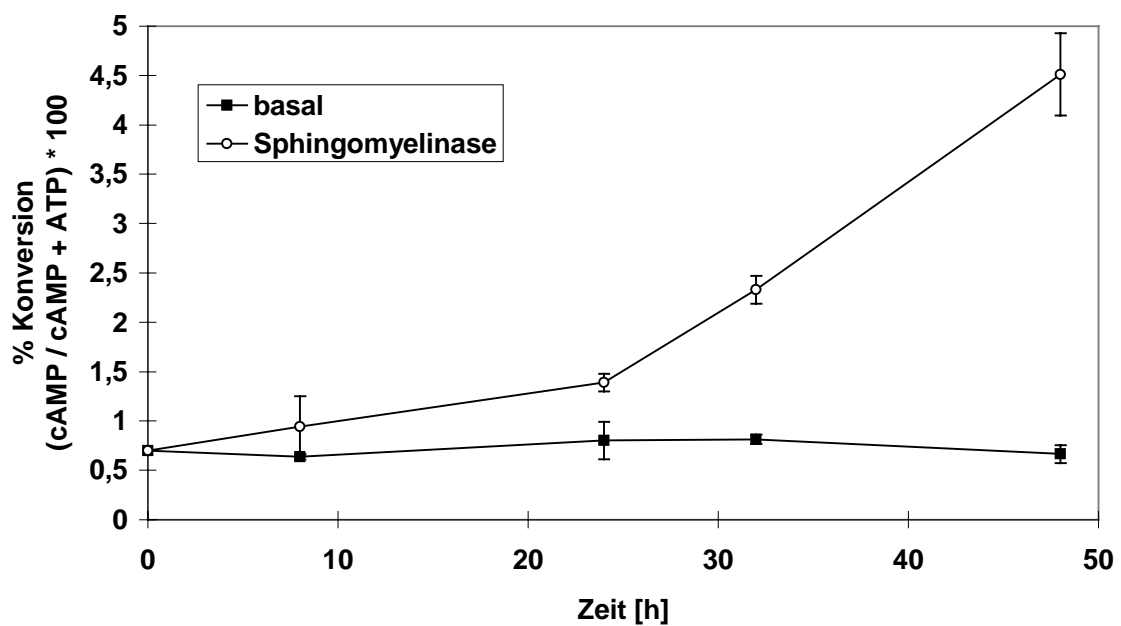


Abb. 17 Kinetik der Stimulation von HEK 293 ACII Aktivität durch Ceramid und bakterielle Sphingomyelinase. a) HEK 293 ACII Zellen wurden zeitabhängig mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid bzw. 1 U/ml bakterieller SMase stimuliert. Die ACII-Aktivität wurde nach den angegebenen Zeiten mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. b) HEK 293 ACII Zellen wurden zeitabhängig 1 U/ml bakterieller SMase stimuliert (basal: 50 % Glycerin 1:16). Die ACII-Aktivität wurde nach den angegebenen Zeiten mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

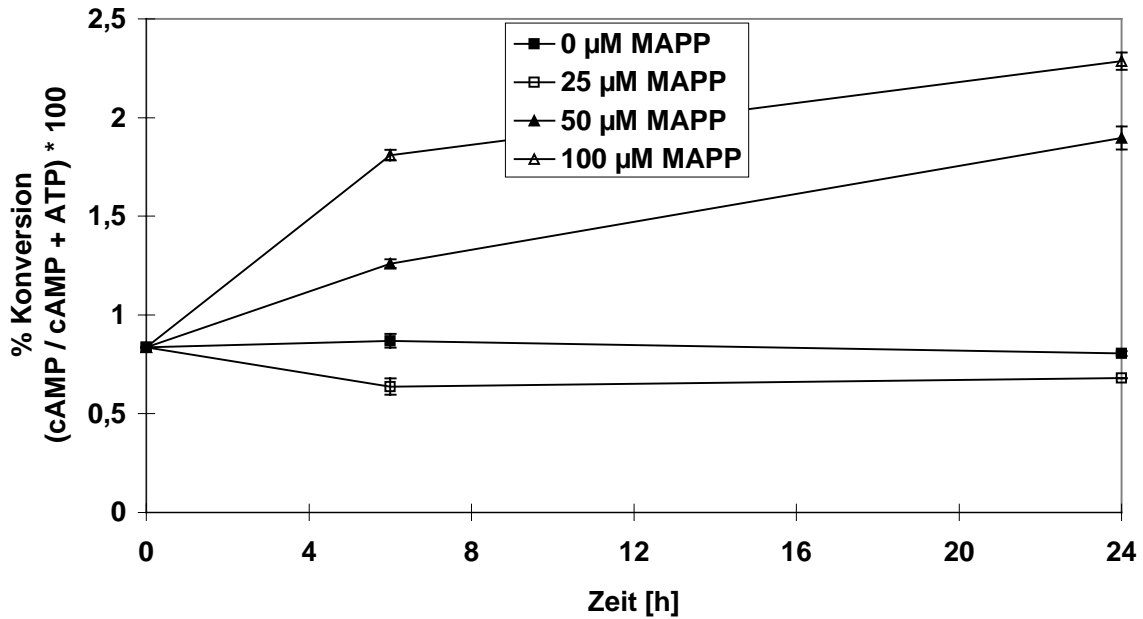
### 3.4.2 Einfluß des Ceramidase-Inhibitors MAPP auf die HEK 293 ACII Aktivität

Eine zweite Möglichkeit, den endogenen Ceramidspiegel in einer Zelle heraufzusetzen, besteht im Einsatz eines Ceramidase-Inhibitors. Dieser inhibiert den Abbau von endogen gebildetem oder exogen zugesetztem Ceramid zu Sphingosin durch Ceramidasen und führt somit ebenfalls zu einer Erhöhung des Ceramidlevels in der Zelle.

Für die folgenden Experimente wurde der sehr potente Ceramidase-Inhibitor (1*S*,2*R*)-*D*-erythro-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol (*D*-*e*-MAPP) ausgewählt (Bielawska *et al.*, 1996). *D*-*e*-MAPP stellt ein Ceramid-Analogon dar, das jedoch nicht über ein Nachahmen des Effektes von exogen zugeführtem Ceramid wirkt, sondern auf indirektem Weg über eine Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels. Bielawska *et al.* (1996) konnten für HL-60 Zellen zeigen, daß die Behandlung über 24 h mit 5 µM *D*-*e*-MAPP zu einer dreifachen Erhöhung des endogenen Ceramidlevels gegenüber Kontrollzellen führt. Desweiteren konnten sie mit einem *in vitro*-Experiment nachweisen, daß *D*-*e*-MAPP auf die Aktivität von alkalischer Ceramidase ( $IC_{50} = 1 - 5 \mu M$ ) inhibitorisch wirkt. Dieser Effekt fällt in bezug auf die saure Ceramidase ( $IC_{50} > 500 \mu M$ ) sehr viel schwächer aus.

HEK 293 ACII Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit verschiedenen Konzentrationen *D*-*e*-MAPP inkubiert. Anschließend wurde über den Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1) die Menge des gebildeten cAMP's im Verhältnis zum gebildeten ATP bestimmt.

In Abb. 18 ist der Verlauf der ACII-Aktivitäten nach Inkubation mit *D*-*e*-MAPP dargestellt. Ab einer Konzentration von 50 µM *D*-*e*-MAPP läßt sich ein Ansteigen der cAMP-Bildung erkennen. Nach 24 h lag der Stimulationsindex bei 2,3. Mit einer Konzentration von 100 µM *D*-*e*-MAPP ließ sich dieser Faktor noch auf 2,7 steigern. Einen größeren Unterschied wiesen die ACII-Aktivitäten der beiden Konzentrationen allerdings nach 6 h auf. Hier zeigt sich, daß durch 100 µM *D*-*e*-MAPP ein wesentlich schnellerer Anstieg der cAMP-Bildung ausgelöst wurde (Faktor 2,2 gegenüber 1,5 bei 50 µM *D*-*e*-MAPP). Dieses bedeutet, daß bei einer Konzentration von 100 µM *D*-*e*-MAPP nach 6 h schon 70,6 % der Aktivität von 24 h vorlagen, während dieser Wert bei 50 µM *D*-*e*-MAPP erst bei 38,5 % lag. Für den Fall, daß in der Zelle annähernd die gleichen Konzentrationen des Hemmstoffes wie außerhalb vorlagen (konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden), deutet diese Beobachtung auf die Hemmung der sauren Ceramidase hin. Durch eine Konzentration von 25 µM *D*-*e*-MAPP scheint der basale Ceramidlevel leicht gehemmt worden zu sein.



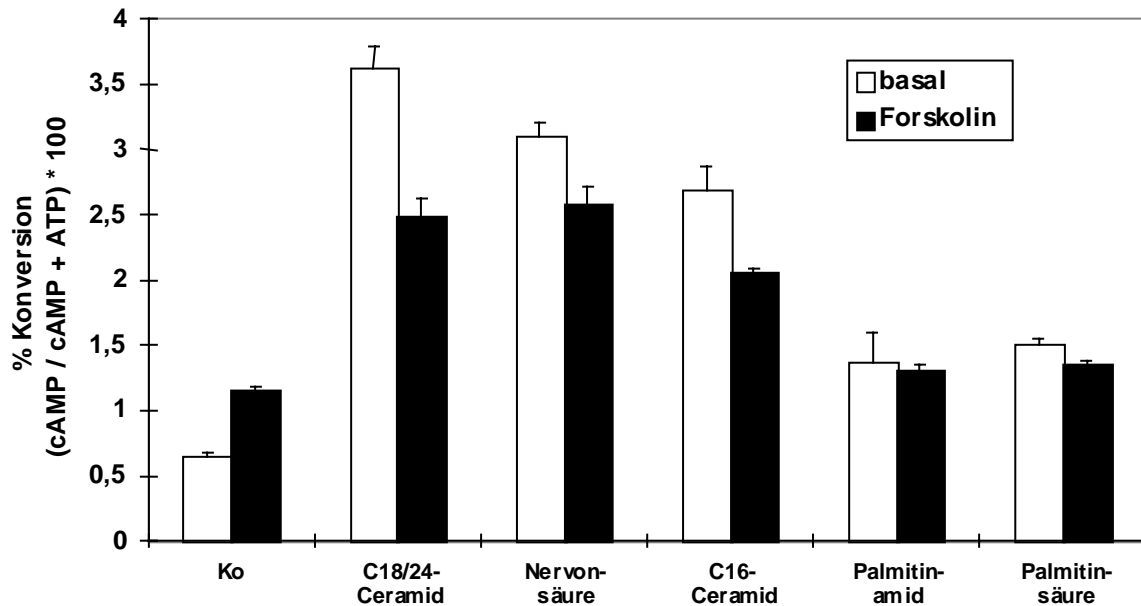
**Abb. 18** Einfluß des Ceramidase-Inhibitors D-*e*-MAPP auf die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen. HEK 293 ACII Zellen wurden konzentrations- und zeitabhängig mit D-*e*-MAPP inhibiert (Kontrolle: DMSO 1:100). Die ACII-Aktivität wurde nach den angegebenen Zeiten mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Es wurden zwei Wege genutzt, um den endogenen Ceramidlevel anzuheben und dadurch die Aktivität der AC-II zu erhöhen. Sowohl durch Zugabe einer bakteriellen Sphingomyelinase als auch durch den Ceramidaseinhibitor D-*e*-MAPP ließ sich die ACII-Aktivität in HEK 293 Zellen stimulieren. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis darauf, daß Ceramid an der Erhöhung der ACII-Aktivität in dem zu untersuchenden Fall beteiligt ist.

### 3.5 Wirkung von langkettigen Fettsäuren und Fettsäureamiden auf die HEK 293 ACII Aktivität

Aufgrund des Befundes, daß Dihydroceramide ebenso wie Ceramide zur Stimulation der Adenylyl Cyclase führten und nicht wie bei anderen Ceramid-ausgelösten Effekten als Negativkontrolle fungieren können, stellt sich die Frage, inwieweit überhaupt ein Sphingosin-Derivat notwendig ist bzw. ob langkettige Fettsäuren oder Fettsäureamide in der gleichen Art und Weise wirken. Von langkettigen Fettsäureamiden ist bekannt, daß sie physiologische Aktivität besitzen. Sie spielen z.B. eine Rolle als Schlaf-induzierende Agentien (Oleamid, Cravatt *et al.*, 1995) oder als endogene Liganden von Cannabinoid-Rezeptoren (Anandamid, Devane *et al.*, 1992). Langkettige gesättigte Fettsäuren dagegen gelten als physiologisch inaktiv.

Zur Bestimmung eines möglichen aktivierenden Einflusses von langkettigen Fettsäuren bzw. Fettsäureamiden wurden Palmitinsäure ( $C_{16}$ , gesättigt), Nervonsäure ( $C_{24}$ , einfach-*cis*-ungesättigt) sowie Palmitinamid ( $C_{16}$ , Darstellung durch Aminolyse aus Palmitinsäure, Becker *et al.*, 1990) ausgewählt. Nach 6stündiger Stimulation von HEK 293 ACII Zellen mit jeweils  $20\ \mu\text{M}$  dieser Substanzen, wurde die cAMP-Bildung mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests bestimmt (s. 2.2.5.1). Es wurden gleiche Konzentrationen der Effektoren ausgewählt, um die jeweilige Stimulationsstärke der einzelnen Substanzen miteinander vergleichen zu können.

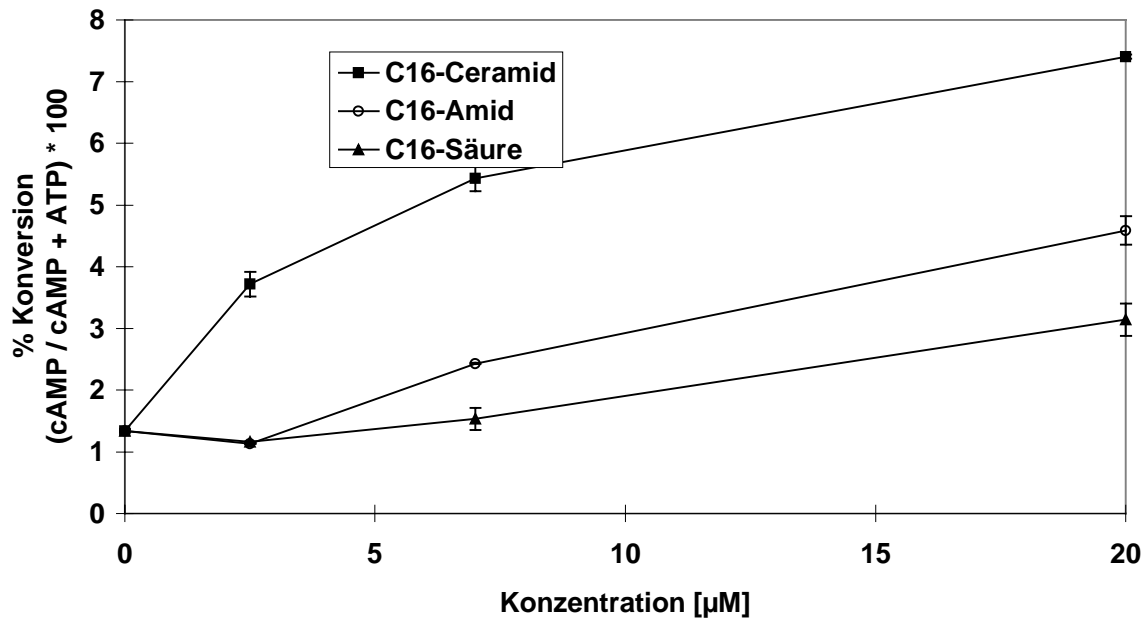


**Abb. 19** Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch verschiedene Ceramid-Derivate sowie langkettige Fettsäuren und Fettsäureamide. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit  $20\ \mu\text{M}$  verschiedener Ceramid-Derivate sowie langkettige Fettsäuren und Fettsäureamide ( $C_{18/24}$ -Ceramid,  $C_{16}$ -Ceramid, Nervonsäure, Palmitinamid und Palmitinsäure) stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach 10minütiger Stimulation  $\pm 10\ \mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Die Stimulation der AC-II mit Nervonsäure erreichte mit 82,4 % Konversion nahezu den Wert von  $C_{18/24}$ -Ceramid (Abb. 19). Vergleicht man die drei  $C_{16}$ -Derivate miteinander, so lagen die Aktivitäten der mit Palmitinsäure bzw. -amid stimulierten AC-II deutlich unter der von Ceramid (35 – 45 %). Allerdings muß beachtet werden, daß das Ceramidgemisch zu einem Teil aus  $C_{18}$ -Ceramiden besteht. Geht man nun davon aus, daß die Kettenlänge ein entscheidendes Kriterium für die Stärke der Aktivitätserhöhung ist (s. 3.1.2), erscheint es logisch, daß der Unterschied im Fall der  $C_{16}$ -Derivate zwischen Ceramid und Fettsäure bzw. -amid größer ausfällt.



Auffällig ist hier, daß im Gegensatz zu Ceramid, bei welchem die basale ACII-Aktivität höher lag als die Forskolin-stimulierte, zwischen beiden Aktivitäten bei Palmitinamid bzw. -säure fast kein Unterschied bestand.



**Abb. 20 Titration der Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch C<sub>16</sub>-Ceramid, Palmitinamid und Palmitinsäure.** HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 2,5, 7 und 20 µM C<sub>16</sub>-Ceramid, Palmitinamid sowie Palmitinsäure stimuliert. Die ACII-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

In Abb. 20 wurden verschiedene Konzentrationen der drei C<sub>16</sub>-Derivate (Ceramid, Fettsäure und Fettsäureamid) titriert. Dabei zeigte sich, daß die Stimulierung mit Ceramid im Vergleich zur Fettsäure bzw. zum Fettsäureamid bei niedrigen Konzentrationen zu einem sehr viel schnelleren Anstieg der ACII-Aktivität führte. Schon bei einer Konzentration von 2,5 µM Ceramid erhöhte sich die cAMP-Bildung um den Faktor 2,8. Bei der C<sub>16</sub>-Fettsäure bzw. dem Amid kam es erst ab einer Konzentration von 20 µM zu einer signifikanten Aktivitätserhöhung der AC-II (Faktor 2,3 bzw. 3,4).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß langkettige Fettsäuren bzw. Fettsäureamide ebenso wie Ceramid in der Lage sind, die AC-II zu stimulieren, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß.

### **3.6 Einfluß verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität**

In der Absicht, erste Hinweise auf den Mechanismus des Effektes von Ceramid auf die AC-II zu bekommen, wurde zuerst ein Signaltransduktionsweg der Aktivierung von Adenylyl Cyclasen unter Beteiligung der Proteinkinase C durch Einsatz verschiedener Aktivatoren und Inhibitoren der PKC untersucht. Zwei der bisher neun klonierten Adenylyl Cyclasen aus Säugetieren, Typ II und Typ V, werden durch die Proteinkinase C (PKC) stimuliert (s. Einleitung).

Ebenso ist bekannt, daß Ceramid einen aktivierenden Einfluß auf die atypische PKC  $\zeta$  hat. Müller *et al.* (1995) konnten zeigen, daß Ceramid in U937 Zellen in einer Konzentrationen von 0,5 nM zu einer bis zu vierfach erhöhten Autophosphorylierung der PKC  $\zeta$  führt, wobei es spezifisch an die Kinase bindet. Ab einer Konzentration von 60 nM Ceramid werden wieder basale Aktivitätslevel erreicht. In Molt-4 Zellen dagegen inhibiert Ceramid die Phorbol-ester-stimulierte Aktivität der PKC  $\alpha$  (Lee *et al.*, 1996).

#### **3.6.1 Betrachtung von Isotypen der Proteinkinase C in HEK 293 ACII Zellen**

Für Untersuchungen bezüglich einer Beteiligung des PKC-Signaltransduktionsweges am Effekt von Ceramid auf die AC-II sollte in einem ersten Experiment geklärt werden, welche Isoenzyme der PKC in HEK 293 ACII Zellen endogen exprimiert werden.

##### **3.6.1.1 Nachweis endogen vorkommender Isoformen der PKC in HEK 293 ACII Zellen über Westernblot**

Zu diesem Zweck wurden aus mit dem Phorbol-ester TPA (1  $\mu$ M) stimulierten HEK 293 ACII Zellen Membranen präpariert (s. 2.2.3.1; die unstimuliert vorwiegend im Cytosol vorkommende PKC transloziert nach Aktivierung an die Membran) und deren Proteine nach Durchführung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. 2.2.6) auf eine PVDF-Membran gebロットet (s. 2.2.7.1). Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (Dianova) für verschiedene PKC-Isoformen durch Chemilumineszenz (s. 2.2.7.2).

Aus Tab. 3 läßt sich ersehen, daß die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$  und  $\mu$  in HEK 293 ACII Zellen exprimiert wurden. Erstaunlich war der Nachweis des klassischen Isoenzym  $\gamma$ , das bisher nur im zentralen Nervensystem wie z.B. im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Nishizuka, 1988; Ohno *et al.*, 1991; Wetsel *et al.*, 1992). PKC  $\theta$  kam nur in sehr geringen Mengen in den untersuchten Nierenzellen vor. Mit der Literatur übereinstimmend, daß in Nierenzellen wie z.B. auch renalen Mesangialzellen keine PKC  $\beta$  exprimiert wird (Huwiler *et al.*, 1992), konnten keine Isoformen des Typs  $\beta$  (I oder II) in HEK 293 ACII Membranen detektiert werden. Die atypischen Proteinkinase C Isoformen  $\iota$  und  $\lambda$ , nicht aber  $\zeta$  konnten in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

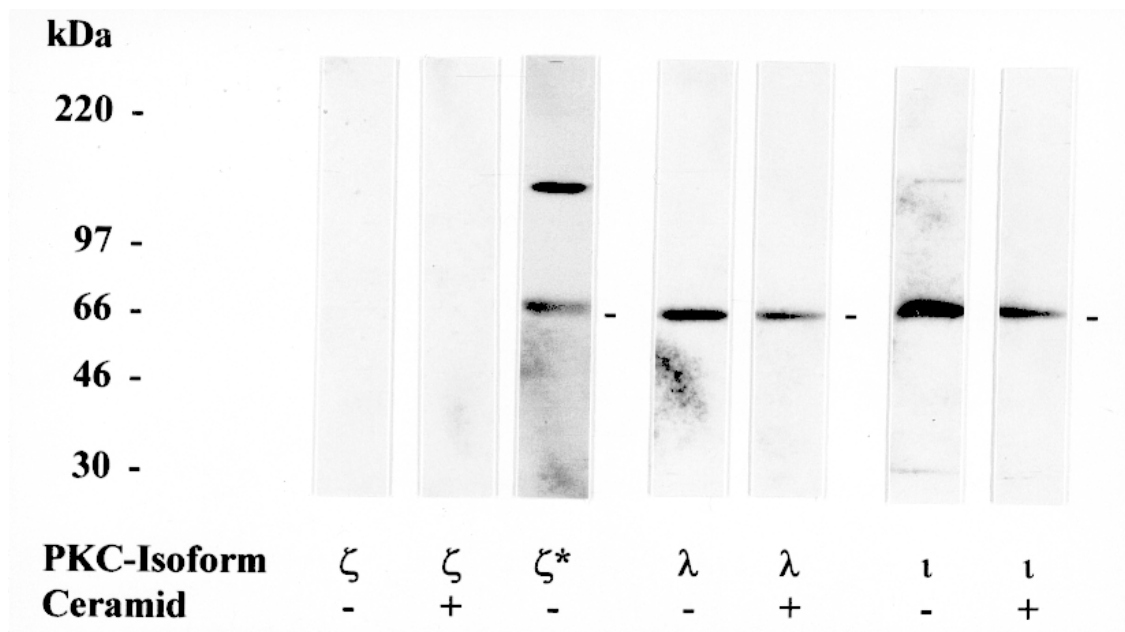
**Tab. 3** Expression von PKC-Isoformen in HEK 293 ACII Zellen. Nach Präparation von HEK 293 ACII Membranen wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Membranproteine in 5 - 15 %igen PA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der PKC-Isoformen erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Verdünnung s. Herstellerangabe, Dianova) und an alkalische Phosphatase gekoppeltem anti-Maus Antikörper (anti-mouse-IgG-AP, 1:5.000 verdünnt) und anschließender Chemilumineszenz.

PKC-Isoformen	Sub-Familie	Molekulargewicht [kDa]	Expression in HEK 293 ACII Zellen
$\alpha$	c	76,8	+
$\beta\text{I} / \beta\text{II}$	c	76,8; 76,9	-
$\gamma$	c	78,4	+
$\delta$	n	77,5	+
$\epsilon$	n	83,5	+
$\theta$	n	81,6	(+)
$\eta$	n	78	n.d.
$\lambda / \iota$	a	67,2; 74	+
$\zeta$	a	67,7	-
$\mu$	a	115	+

### 3.6.1.2 Ceramid-induzierte Translokation von PKC $\iota$ und $\lambda$ ins Cytosol

Phorbolester führen u.a. über die Translokation von PKC-Isoformen, die über eine TPA-Bindungsstelle verfügen (klassisch, novel), vom Cytosol in die Membran zu ihrer Aktivierung. Kürzlich konnte für Ceramid ein genau gegenteiliger Effekt gezeigt werden. Laut Sawai *et al.* (1997) führt die Stimulation von HL-60 Zellen, einer humanen Leukämie Zelllinie, mit N-Acetylspingosin (zellpermeables synthetisches C<sub>2</sub>-Ceramid) zur Translokation der novel PKCs  $\delta$  und  $\epsilon$  von der Membran ins Cytosol. Einen ähnlichen Effekt konnten Galve-Roperh *et al.* (1997) für die atypische PKC  $\zeta$  in Astrocyten mit C<sub>8</sub>-Ceramid beobachten. In beiden Fällen wird diese Translokation auch durch Zugabe von exogener Sphingomyelinase ausgelöst.

Die beiden in HEK 293 ACII Zellen endogen exprimierten atypischen Isoformen der Proteinkinase C,  $\iota$  und  $\lambda$ , wurden hinsichtlich einer möglichen Ceramid-induzierten Translokation untersucht, wobei dieses unter den oben aufgeführten Bedingungen (s. 3.5.1.1) an 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimulierten Membranen durchgeführt wurde.



**Abb. 21 Expression von PKC-Isoformen in HEK 293 ACII Zellen.** HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach Präparation von Membranen wurden jeweils 100  $\mu$ g Membranproteine in 5 - 15 %igen PA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der PKC-Isoformen erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Verdünnung s. Herstellerangabe, Dianova) und an alkalische Phosphatase gekoppeltem anti-Maus Antikörper (anti-mouse-IgG-AP, 1:5.000 verdünnt) und anschließender Chemilumineszenz. ( $\zeta^*$  = 25  $\mu$ g Thrombozytenmembranen)

Abb. 21 zeigt den immunologischen Nachweis der PKC-Isoformen  $\iota$  und  $\lambda$  in bezug auf die Stimulation von HEK 293 ACII Zellen mit 20  $\mu$ M  $C_{18/24}$ -Ceramid. In beiden Fällen ist deutlich eine Translokation der Isoenzyme von den Membranen ins Cytosol als Folge der Inkubation mit Ceramid zu erkennen. Dieser Effekt ist konsistent mit den Beobachtungen von Galve-Roperh *et al.* (1997) für die PKC  $\zeta$  in Astrocyten bzw. Sawai *et al.* (1997) für die PKCs  $\delta$  und  $\epsilon$  in HL-60 Zellen. PKC  $\zeta$  wurde auch nach Stimulation mit Ceramid in HEK 293 ACII Membranen nicht nachgewiesen. Die Kontrolle ( $\zeta^*$ ) zeigt den Nachweis von PKC  $\zeta$  in Thrombozytenmembranen.

### **3.6.2 Synergismus der Stimulation der HEK 293 ACII Aktivität zwischen Ceramid und Staurosporin**

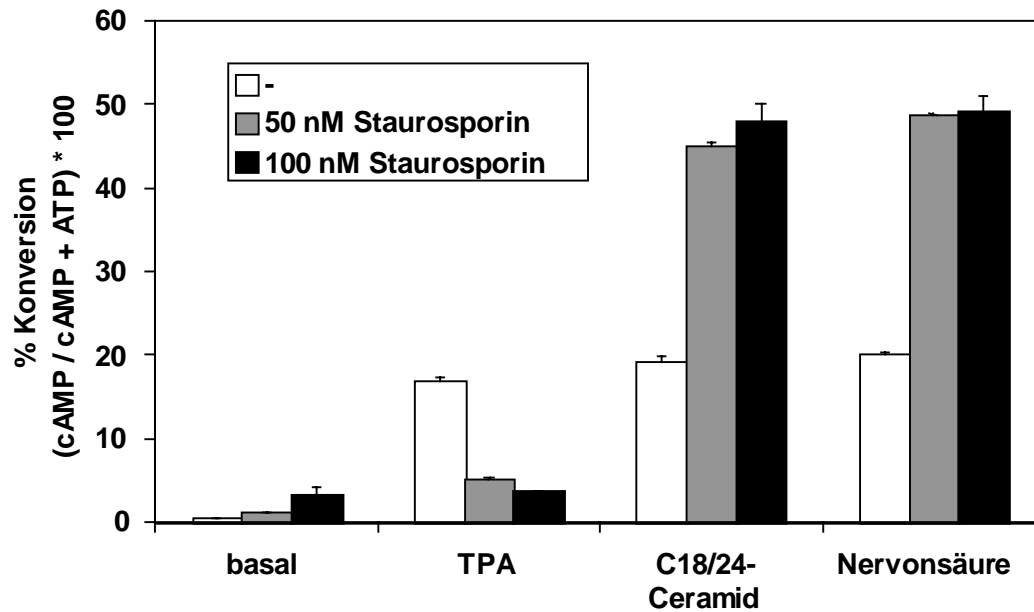
Um zu klären, ob der Effekt von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II auf die Stimulation einer Proteinkinase C zurückzuführen ist, wurde der Einfluß des PKC-Inhibitors Staurosporin auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurden die HEK 293 ACII Zellen 1 h vor der Stimulation mit  $C_{18/24}$ -Ceramid mit 50 und 100 nM bzw. ohne Staurosporin behandelt. Der  $IC_{50}$ -Wert für Staurosporin für die PKC liegt bei 0,7 nM. Diese Angabe bezieht sich allerdings auf *in vitro*-Experimente. Für *in vivo*-Experimente sind vermutlich weit höhere Konzentrationen notwendig, da der Inhibitor erst von der Zelle aufgenommen werden muß.

Abb. 22a zeigt, daß die Behandlung der HEK 293 ACII Zellen mit 100 nM Staurosporin zu einer Erhöhung der basalen ACII-Aktivität um den Faktor 9 führte.

Experimentell kann die Stimulierung der Adenylyl Cyclasen durch die Aktivierung der PKC durch den Phorbolster TPA induziert werden. Daher wurde zur Kontrolle der Einfluß von Staurosporin auf die basale Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II nach TPA-Stimulation (15 min) untersucht, um die Wirkung von Staurosporin auf die Aktivität der PKC zu überprüfen. Die Behandlung der TPA-stimulierten Zellen mit 100 nM Staurosporin (1 h vor TPA-Stimulation) führte wie erwartet zu einem sehr starken Rückgang der cAMP-Bildung auf 21 %.

Im Gegensatz zu TPA wurde die durch Ceramid induzierte Aktivität der ACII durch Staurosporin weiter potenziert (Faktor 2,5 bei 100 nM Staurosporin). Obwohl gezeigt werden konnte, daß Staurosporin die Bildung von Ceramid in neuronalen Zellen stimuliert (Wiesner & Dawson, 1996), kann dieser Befund die synergistische Wechselwirkung zwischen Ceramid und

a)



b)

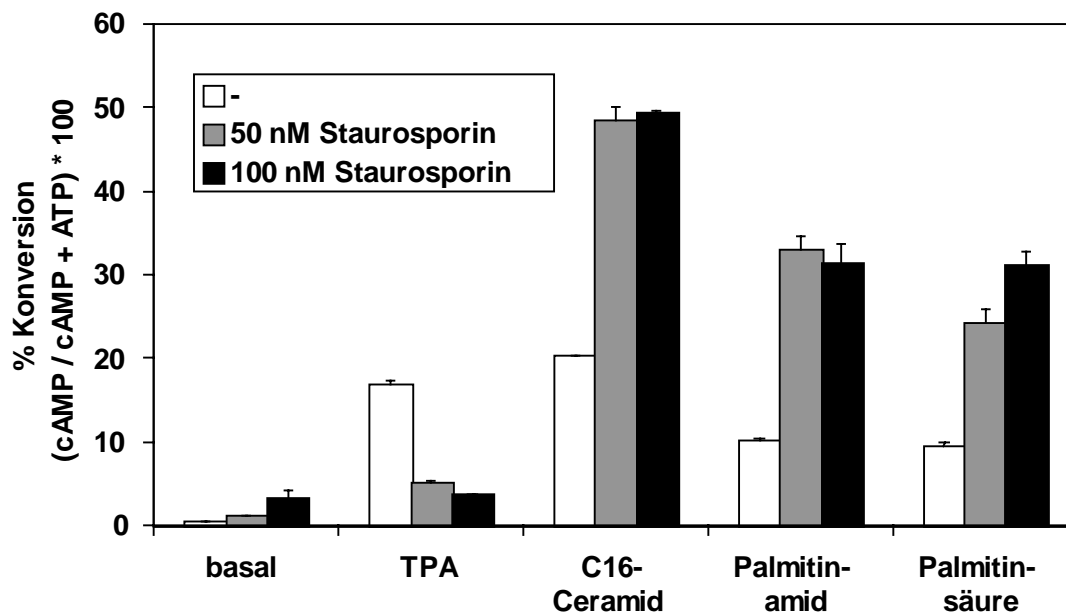


Abb. 22

**Synergismus der Stimulation der HEK 293 ACII Aktivität zwischen Ceramid und Staurosporin.**

a) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>18/24</sub>-Ceramid bzw. Nervonsäure sowie für 15 min mit 1  $\mu$ M TPA stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Staurosporin zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. b) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M C<sub>16</sub>-Ceramid bzw. Palmitinamid und Palmitinsäure sowie für 15 min mit 1  $\mu$ M TPA stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Staurosporin zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Staurosporin nicht erklären. Mit Faktor 2,4 konnte dieser Effekt auch nach Stimulation der Zellen mit Nervensäure beobachtet werden.

Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn die getesteten Substanzen durch ihre C<sub>16</sub>-Analoge ersetzt wurden (s. Abb. 22b). Hierbei lag der Stimulationsindex durch Staurosporin bei Palmitinamid bzw. -säure mit 3,2 bzw. 3,3 sogar noch um einiges höher.

### **3.6.3 Einfluß des Proteinkinase C Inhibitors Bisindolylmaleimid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität**

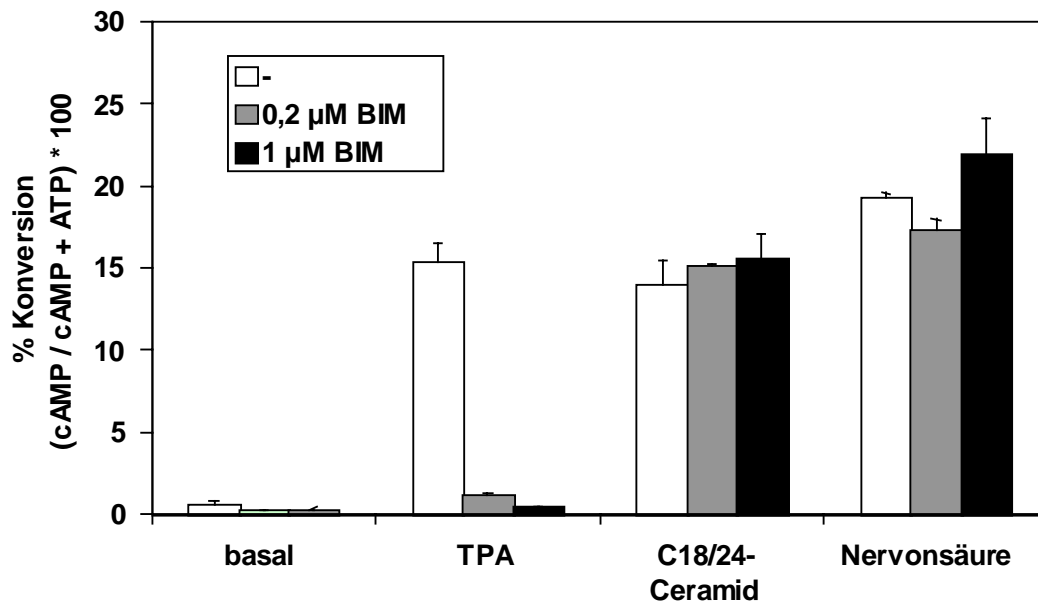
Aufgrund des überraschenden, stimulierenden Effektes von Staurosporin auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II (s. 3.5.2) sollte die Wirkung eines weiteren, sehr spezifischen Inhibitors der PKC, Bisindolylmaleimid (BIM, K<sub>i</sub> = 10 nM), untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen nach 60minütiger Vorinkubation mit BIM und anschließender Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (20 µM, 6 h) mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests bestimmt (s. 2.2.5.1).

Im Gegensatz zu Staurosporin hatte der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid bis zu einer Konzentration von 1 µM auf die Ceramid-stimulierte (C<sub>18/24</sub> bzw. C<sub>16</sub>) ACII-Aktivität - wie in Abb. 23a und b dargestellt - keinen Einfluß.

Zur Kontrolle wurde der Effekt von BIM auf Phorbolster-stimulierte ACII-Aktivität getestet. Wie erwartet inhibierte BIM den TPA-Effekt vollständig (1 µM BIM: Inhibition der ACII-Aktivität auf 3 %, d.h. 24 % unter der basalen ACII-Aktivität). Zu diesem Befund paßte auch die Beobachtung, daß die basale (unstimulierte) Aktivität der AC-II auf 36 % gehemmt wurde. Dies bedeutet, daß die unstimulierte AC-II immer zu einem gewissen Prozentsatz phosphoryliert vorliegt.

Der Effekt von BIM auf die Nervon- bzw. Palmitinsäure stimulierte ACII-Aktivität war dagegen vernachlässigbar. Nur Palmitinamid schien durch BIM leicht aktiviert zu werden (Aktivierung der AC-II durch 1 µM BIM auf 176 %), das Ergebnis ist allerdings aufgrund eines hohen Meßfehlers in Frage zu stellen.

a)



b)

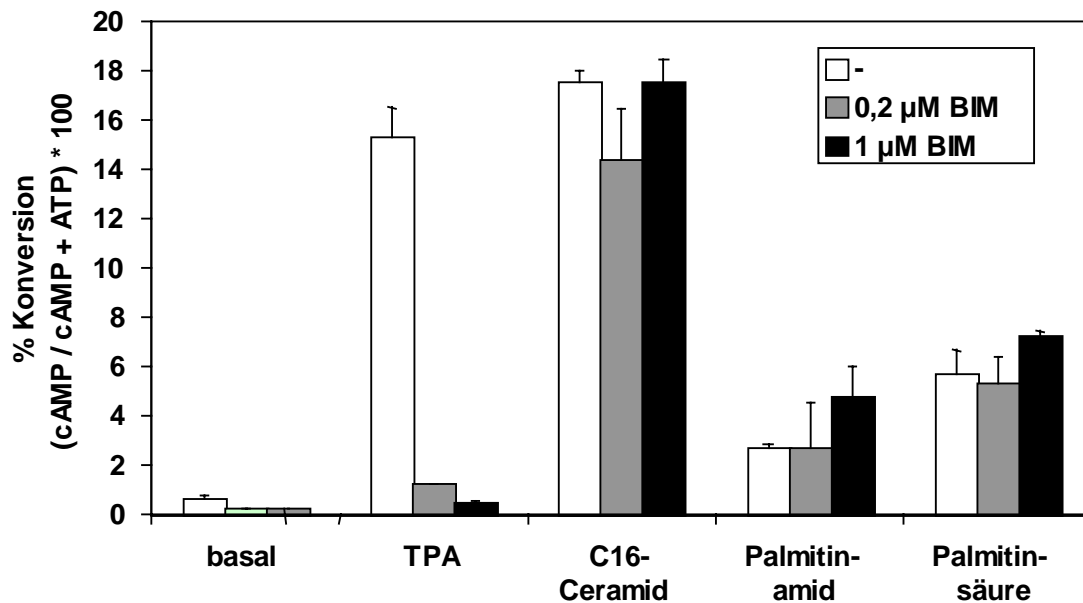


Abb. 23

**Einfluß des Proteinkinase C Inhibitors Bisindolylmaleimid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität.** a) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20 μM C<sub>18/24</sub>-Ceramid bzw. Nervonsäure sowie für 15 min mit 1 μM TPA stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an BIM zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. b) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20 μM C<sub>16</sub>-Ceramid bzw. Palmitinamid und Palmitinsäure sowie für 15 min mit 1 μM TPA stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an BIM zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.



Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im Falle der Übertragung des aktivierenden Effektes von Ceramid und langkettigen Fettsäuren sowie Fettsäureamiden auf die AC-II eine Beteiligung der Proteinkinase C nicht nachgewiesen werden konnte.

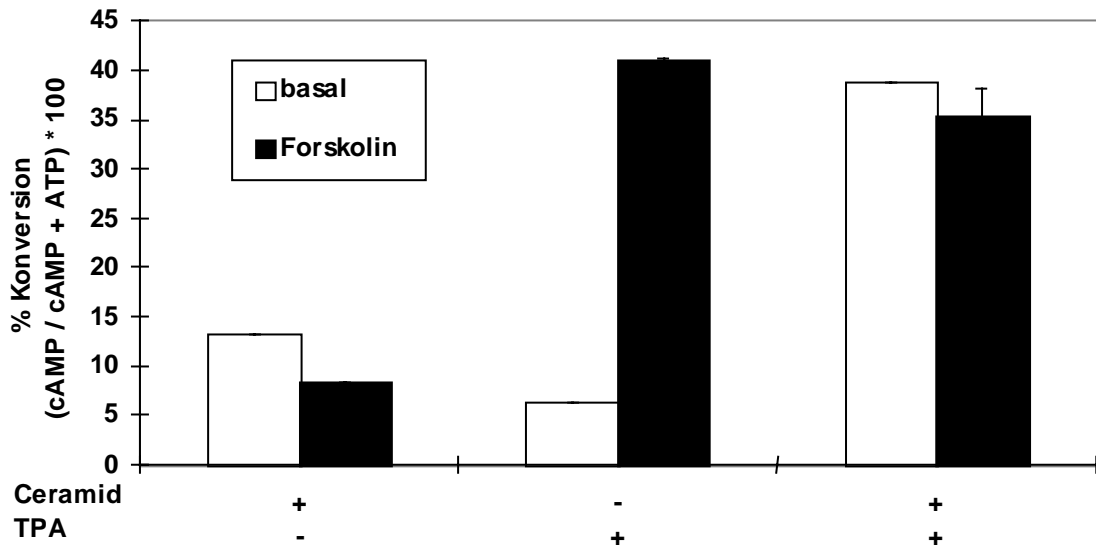
### **3.6.4 Synergistische Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch Ceramid und Phorbolster**

Es ist bekannt, daß Ceramid und Diacylglycerol (DAG) in bezug auf bestimmte zelluläre Effekte wie z.B. Apoptose einen genau gegensätzlichen Einfluß haben (Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994; Venable *et al.*, 1996). Phorbolster, von denen schon früher gezeigt werden konnte, daß sie in verschiedenen Zellsystemen anti-apoptotisch wirken, sind Antagonisten zur Ceramid-vermittelten Apoptose (Jarvis *et al.*, 1996). Obwohl die an diesem Prozeß beteiligten PKC-Isoformen noch nicht identifiziert werden konnten, wurde publiziert, daß DAG die Entstehung der Ceramid-induzierten Apoptose an verschiedenen Stellen inhibiert, so z.B. die Sphingomyelinase und weiter stromabwärts dieses Enzyms liegende Reaktionen in der Signalkaskade.

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte untersucht werden, ob die Gegenregulierung der Signaltransduktionswege von Glycero- und Sphingolipiden auch auf den Effekt von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II zutreffen könnte. Zur Klärung dieser Frage wurden HEK 293 ACII Zellen für 6 h mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid und 15 min mit dem Phorbolster TPA (1 µM) stimuliert und anschließend die cAMP-Bildung mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests (s. 2.2.5.1) bestimmt.

In Abb. 24a sind die Ergebnisse dieses Experimentes dargestellt. Entgegen der Annahme, daß TPA den positiven Effekt von Ceramid auf die AC-II zumindest zum Teil wieder aufheben könne, kam es zu einer synergistischen Verstärkung der basalen ACII-Aktivität bei gleichzeitiger Stimulation der HEK 293 ACII Zellen mit TPA und Ceramid im Vergleich zur jeweils einfachen Stimulation. Die basalen Konversionswerte der einfachen Stimulierung lagen für Ceramid bei 13,1 % und für TPA bei 6,3 %, wohingegen die Stimulation der Zellen mit einer Kombination aus beiden Effektoren zu einer Konversion von 38,7 % (Faktor 2 über additiv) führte. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht für die Forskolin-stimulierte ACII-Aktivität bestätigt werden. Hier erreichte die Umsetzung von ATP zu cAMP nach Stimulation mit Ceramid und TPA nur noch 86,1 % des nur mit TPA und Forskolin stimulierten Wertes. In diesem Fall scheint es wahrscheinlich, daß der ATP-Pool ein limitierender Faktor für die cAMP-

a)



b)

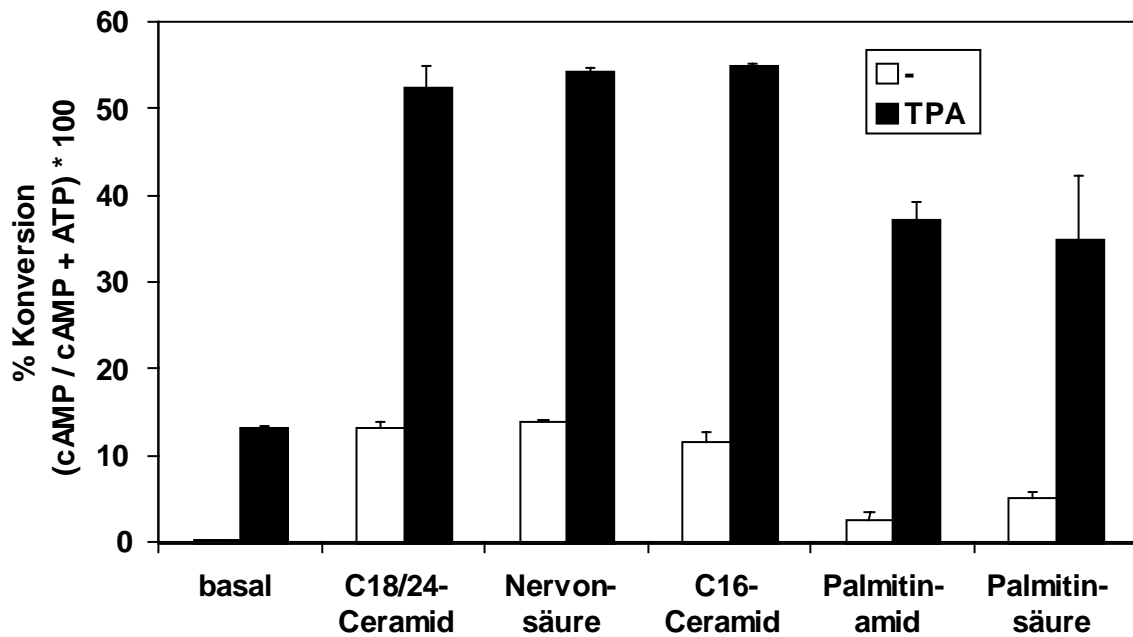


Abb. 24

**Synergistische Stimulation der Adenylyl Cyclase Typ II durch Ceramid und Phorbol ester.** a) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$  C<sub>18/24</sub>-Ceramid bzw für 15 min mit 1  $\mu\text{M}$  TPA stimuliert. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. b) HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$  verschiedener Ceramid-Derivate sowie langkettiger Fettsäuren und Fettsäureamide (C<sub>18/24</sub>-Ceramid, C<sub>16</sub>-Ceramid, Nervonsäure, Palmitinamid und Palmitinsäure) stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Nach 15minütiger Stimulation  $\pm$  1  $\mu\text{M}$  TPA wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Synthese sein könnte.

In Abb. 24b wurde zusätzlich die gleichzeitige Stimulation von langkettigen Fettsäuren (Nervonsäure, Palmitinsäure) sowie Fettsäureamiden (Palmitinamid) und TPA untersucht. Auch hier kam es zu deutlich synergistischen Effekten, die in allen Fällen ebenfalls bei einem Faktor von ca. 2 über einem rein additiven Effekt lagen.

Anhand dieser Beobachtungen liegt ein erster Hinweis darauf vor, daß die Aktivierung der AC-II durch Ceramid bzw. langkettige Fettsäuren sowie Fettsäureamide über die gleiche Signalkaskade läuft.

### **3.7 Wirkung unterschiedlicher Protein-Phosphatase-Inhibitoren auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II**

Bis heute konnten eine Reihe von direkten Angriffspunkten für Ceramid identifiziert werden: eine Ceramid-aktivierte Protein Kinase (CAPK; Liu *et al.*, 1994), eine Ceramid-aktivierte Protein Phosphatase (CAPP; Dobrowsky *et al.*, 1992), der putative Guanin-Nukleotid Exchange Faktor Vav (Gulbins *et al.*, 1994) und die PKC Isoform  $\zeta$  (Lozano *et al.*, 1994; Müller *et al.*, 1995).

#### **3.7.1 Partielle Hemmung der Wirkung von Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II durch Inhibitoren der ProteinPhosphatase 2A**

Die CAPP ist eine Serin/Threonin Protein Phosphatase des Typs 2A und wird als Heterotrimer mit verschiedenen funktionellen Domänen exprimiert (Wolff *et al.*, 1994). Ein Ansteigen des Ceramidlevels in der Zelle bewirkt die Translokation von CAPP vom Cytosol an die Membran, wo es dann zur Dephosphorylierung von geeigneten Substraten kommt.

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der ACII-Aktivität nach Stimulation mit Ceramid möglicherweise über eine Ceramid-aktivierte Protein Phosphatase vermittelt wird, wurde der Einfluß von Inhibitoren der Protein Phosphatase 2A auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität untersucht. Für diesen Fall wurden Okadainsäure und Calyculin A ausgewählt.

### 3.7.1.1 Okadainsäure

Okadainsäure ist das bekannteste Mitglied einer kleinen Familie von diarrhetischen Schellfisch-Toxinen. Es wird von Dinoflagellaten erzeugt (Mukarami *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1984) und kann aus einigen marinen Organismen gewonnen werden, deren Nahrung wahrscheinlich die Okadainsäure-produzierenden Dinoflagellaten umfaßt (Tachibana *et al.*, 1981; Yasumoto *et al.*, 1985). Okadainsäure ist ein potenter Inhibitor von CAPP und Protein Phosphatasen des Typs 2A und ein schwächerer des Typs 1 (Wolff *et al.*, 1994). Der IC<sub>50</sub>-Wert von Okadainsäure für CAPP in *in vitro*-Experimenten liegt bei 1 – 10 nM (Dobrowsky *et al.*, 1992), für die PP-2A allgemein bei 1 nM, für die PP1 bei 15 – 40 nM.

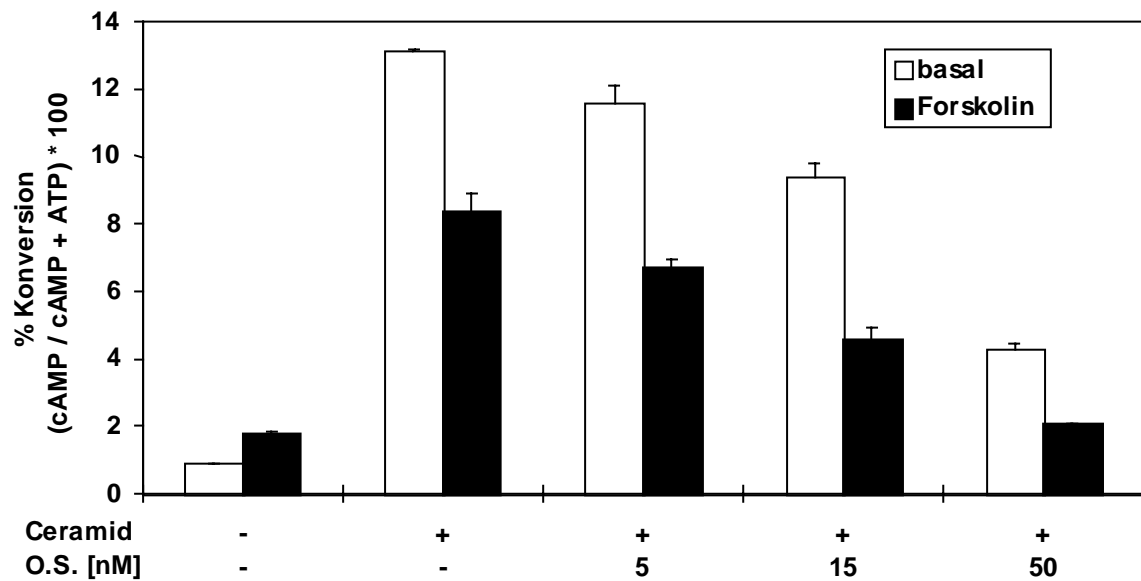
Im folgenden Experiment wurden HEK 293 ACII Zellen 1 h vor der Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid mit aufsteigenden Konzentrationen an Okadainsäure versetzt. Die Bestimmung der ACII-Aktivität erfolgte mittels Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1).

Wie in Abb. 25a gezeigt, wurde die Ceramid-induzierte Erhöhung der ACII-Aktivität in signifikantem Ausmaß durch Okadainsäure inhibiert, wobei der Grad der Inhibierung mit steigender Okadainsäure-Konzentration zunahm. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß die Stimulation der AC-II durch Ceramid zumindest teilweise über die Aktivierung einer Protein Phosphatase des Typs 2A abläuft.

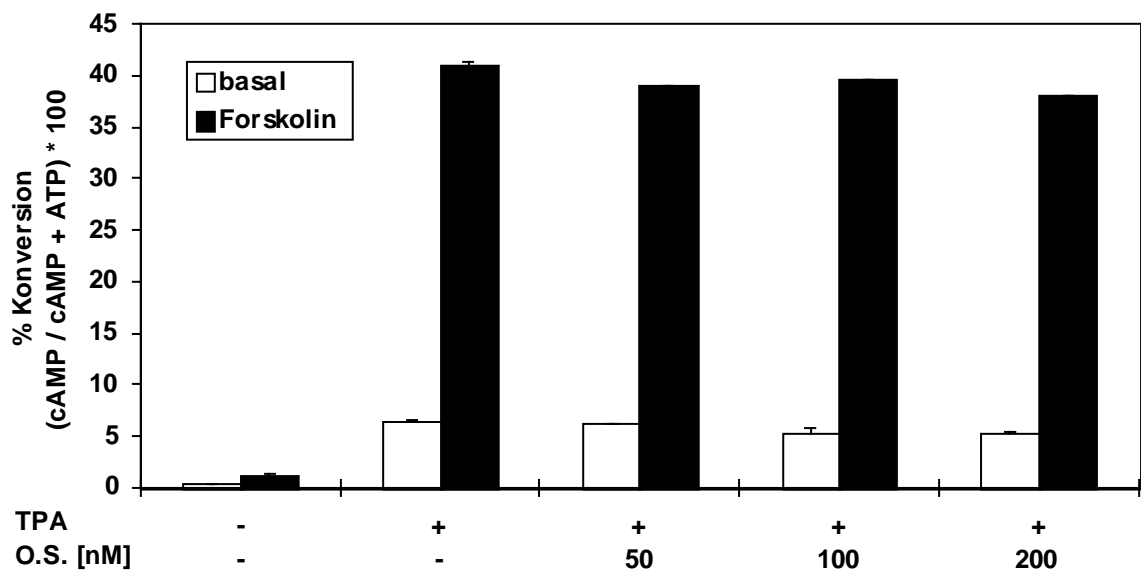
Zur Kontrolle wurde der Effekt von Okadainsäure auf die TPA-stimulierte ACII-Aktivität untersucht und wie erwartet, wurde die Aktivierung der AC-II durch Phorbolster auch durch 200 nM Okadainsäure nicht beeinflußt (Abb. 25b). Ebenfalls hatte Okadainsäure keinen Einfluß auf die basale ACII-Aktivität in HEK 293 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Auch die durch C<sub>16</sub>-Ceramid und Palmitinamid stimulierte Aktivität der AC-II läßt sich - wie in Abb. 26 dargestellt - durch Okadainsäure partiell inhibieren. Das Ausmaß der Hemmung durch 50 nM Okadainsäure ist im Fall der durch Palmitinamid stimulierten HEK 293 ACII Aktivität mit einer Inhibierung auf 33,4 % sogar noch etwas größer als bei C<sub>16</sub>-Ceramid (Hemmung auf 41,4 %). Auch dieser Aspekt unterstützt die Annahme, daß die Aktivierung der AC-II durch Ceramid und Fettsäurenamide über den gleichen Signalweg übertragen werden.

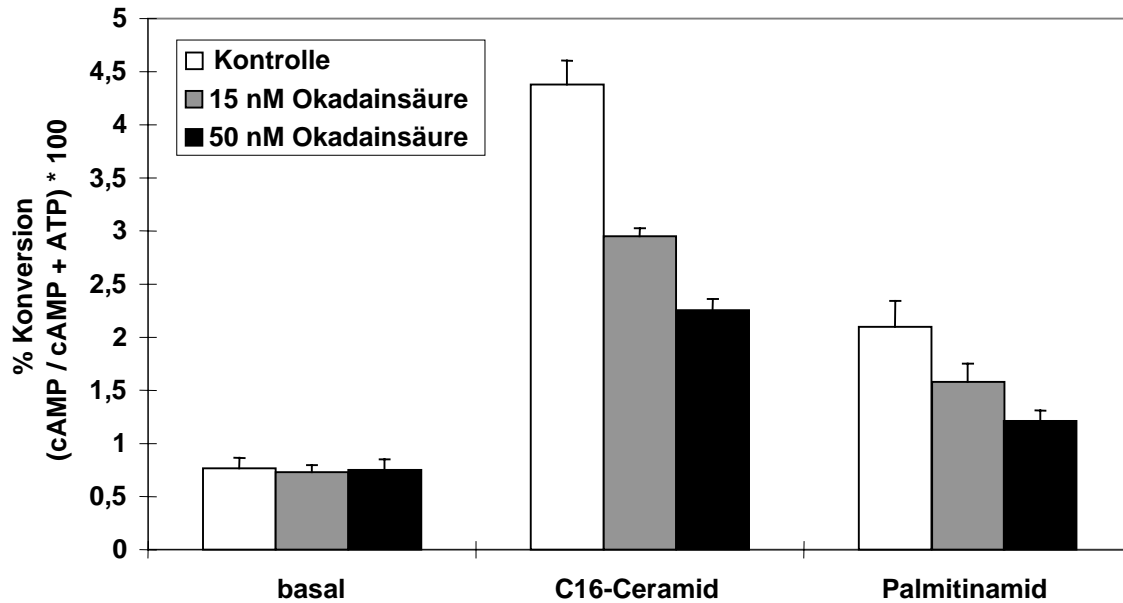
a)



b)



**Abb. 25** **Einfluß des PP2A Inhibitors Okadainsäure auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität.** **a)** HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Okadainsäure zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. **b)** HEK 293 ACII Zellen wurden für 15 min mit 1  $\mu\text{M}$  TPA stimuliert. 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Okadainsäure zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.



**Abb. 26** Einfluß des PP2A Inhibitors Okadaic acid auf die HEK 293 ACII Aktivität nach Stimulation mit C<sub>16</sub>-Ceramid und Palmitinamid. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20 µM C<sub>16</sub>-Ceramid sowie Palmitinamid stimuliert (basal: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Okadaic acid zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

### 3.7.1.2 Calyculin A

Um das mit Okadaic acid erhaltene Ergebnis zu untermauern, wurde mit Calyculin A ein zweiter PP-2A-Inhibitor bezüglich seiner Wirkung auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität untersucht. Calyculin A ist ein sehr potenter Inhibitor der PP-1 und PP-2A Protein Phosphatasen. Der IC<sub>50</sub>-Wert für PP-2A beträgt 0,5 - 1 nM, für PP-1 2 nM. Calyculin A wurde 1986 von Kateo *et al.* aus einem marinen Schwamm, *Discodermia calyx*, isoliert. Als Biotest dienten die Hemmaktivität gegen die Entwicklung von Seesternembryonen sowie L1210-Leukemia-Zellen. Später wurde die biologische Aktivität von Calyculin A mit der Modulation der Protein Phosphatase aufgrund des Befundes in Verbindung gebracht, daß es in einem Screening-Programm die Bindung von [<sup>3</sup>H]Okadaic acid an Mäusehautextrakte verhinderte (Suganuma *et al.*, 1990). Der letztere Bericht demonstrierte auch direkt die Protein Phosphatasehemmung sowie Aktivitäten bezüglich der Promotion von Mäusehauttumoren ähnlich denen von Okadaic acid.

HEK 293 ACII Zellen wurden 60 min vor Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (20 µM, 6 h) bzw. TPA (1 µM, 15 min) mit je 50 nM Calyculin A inkubiert. Die anschließende Bestimmung der ACII-Aktivität erfolgte mittels Tritium-Adenin-Test (s 2.2.5.1).

Abb. 27a bestätigt die Vermutung, daß auch Calyculin A einen inhibitorischen Einfluß auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II ausübt. Es erfolgte durch 50 nM Calyculin A eine Inhibierung der basalen (nur Ceramid-stimulierten) Aktivität auf 40,6 % sowie der zusätzlich zu Ceramid mit Forskolin stimulierten Aktivität auf 25,5 %.

Wie erwartet verlief auch in diesem Fall das Kontrollexperiment positiv. Calyculin A war nicht in der Lage, die TPA-stimulierte ACII-Aktivität zu inhibieren (s. Abb. 27b).

Dieses Ergebnis lieferte einen weiteren Hinweis für die Beteiligung einer Protein Phosphatase 2A an der Aktivierung der Adenylyl Cyclase II durch Ceramid.

### **3.7.2 Einfluß des Protein-Phosphatase-2B Inhibitors Cyclosporin A auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII-Aktivität**

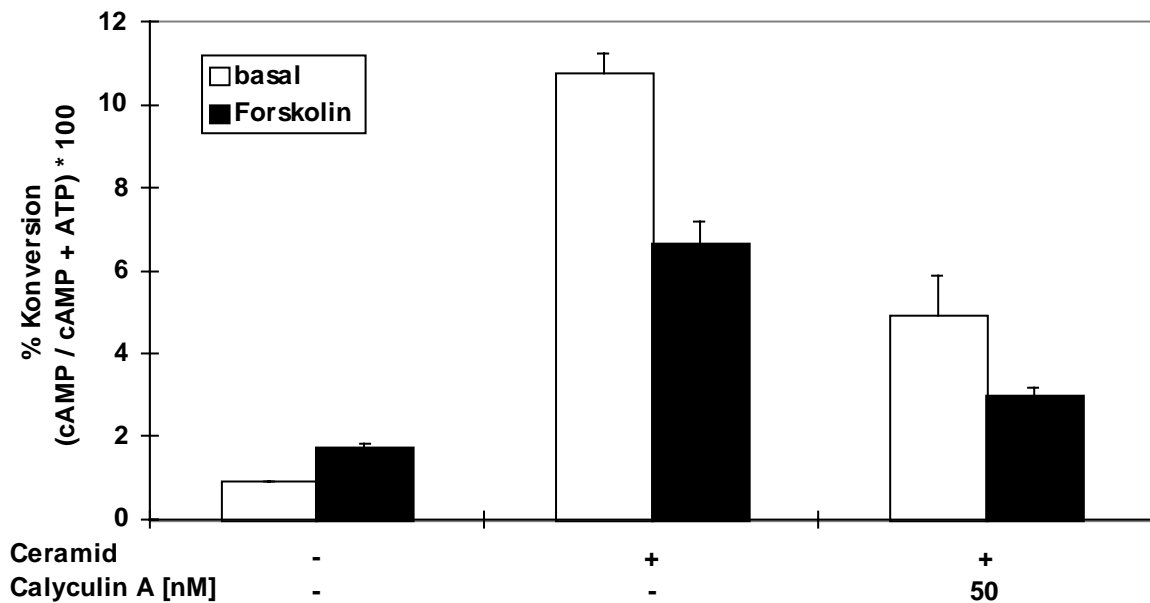
Obwohl im Zusammenhang mit Ceramid noch nicht beschrieben, sollten auch zwei weitere bekannte Mitglieder der Protein Phosphatase Familie hinsichtlich einer Beteiligung an der Signalkaskade der Ceramid-vermittelten Aktivierung der AC-II untersucht werden.

Bei einer dieser Protein Phosphatasen handelt es sich um den Typ 2B, auch bekannt als Calcineurin. Diese Serin/Threonin-Phosphatasen sind Heterodimere bestehend aus einer katalytischen (A) und einer weiteren zum Calmodulin homologen Untereinheit (B). Sie werden synergistisch zum einen durch Ca<sup>2+</sup>, das an die B-Untereinheit bindet und zum anderen durch Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin an der A-Untereinheit aktiviert (Girault, 1994).

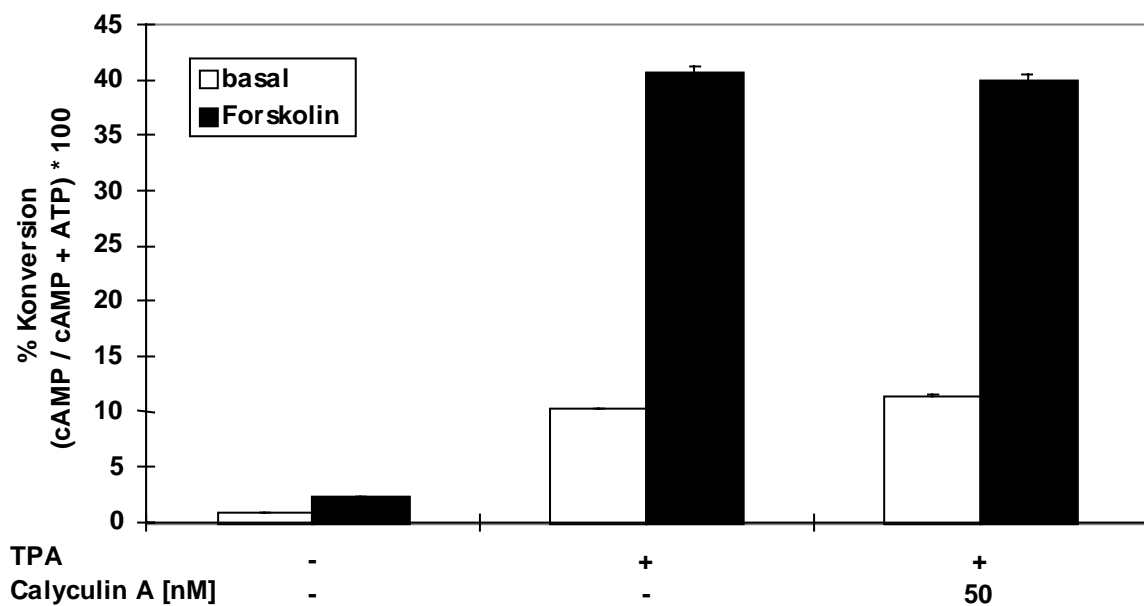
Cyclosporin A (CSA), das als Immunsuppressivum zur Vorbeugung gegen die Graft-Abstoßung eingesetzt wird, stellt einen sehr guten Inhibitor von Calcineurin dar (Liu, 1993; Kunz *et al.*, 1993). Nach Interaktion mit dem endogenen Protein Cyclophilin bindet es die aktivierte Form des Calcineurins und blockiert so dessen Phosphataseaktivität (IC<sub>50</sub> < 10 nM).

In dem folgenden Experiment wurde die cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen nach 60 minütiger Vorinkubation mit 40 bzw. 100 ng/ml CSA (33 bzw. 83 nM) und anschließender Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (20 µM, 6 h ) mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests bestimmt (2.2.5.1).

a)



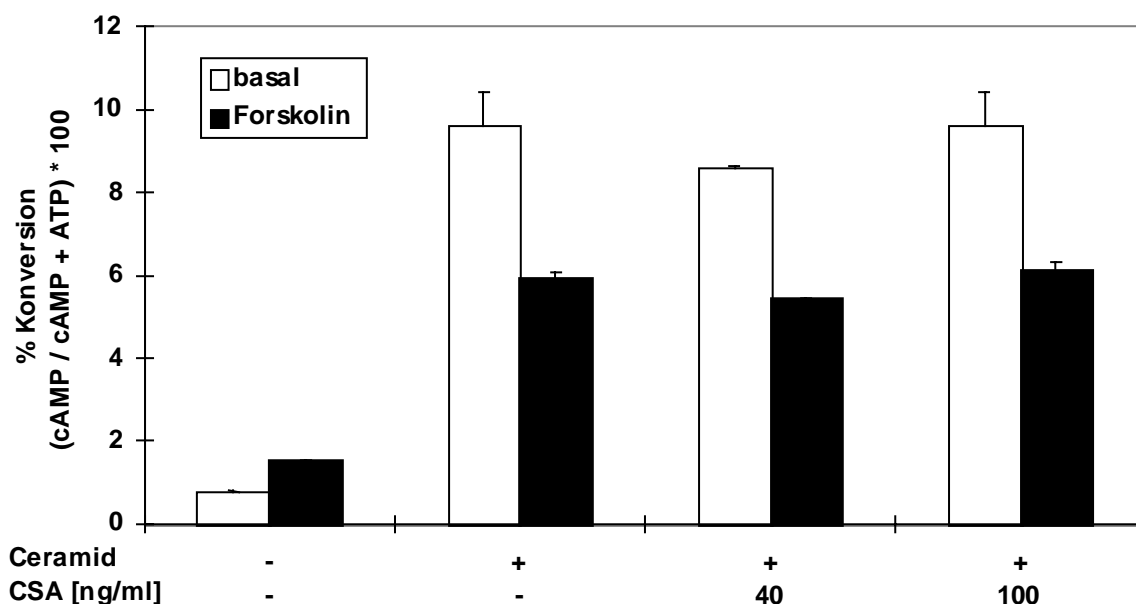
b)



**Abb. 27** Einfluß des Phosphatase-Inhibitors Calyculin A auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. **a)** HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 50 nM Calyculin A zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. **b)** HEK 293 ACII Zellen wurden für 15 min mit 1  $\mu\text{M}$  TPA stimuliert. 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 50 nM Calyculin A zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.



Der PP-2B Inhibitor Cyclosporin A hatte - wie in Abb. 28 dargestellt - bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml keinen Einfluß auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II. Diese Beobachtung gilt auch für zusätzlich mit Forskolin stimulierte HEK 293 ACII Zellen. Es kann daher gesagt werden, daß Calcineurin höchstwahrscheinlich keine Bedeutung bei der Vermittlung der Wirkung von Ceramid auf die AC-II hat.



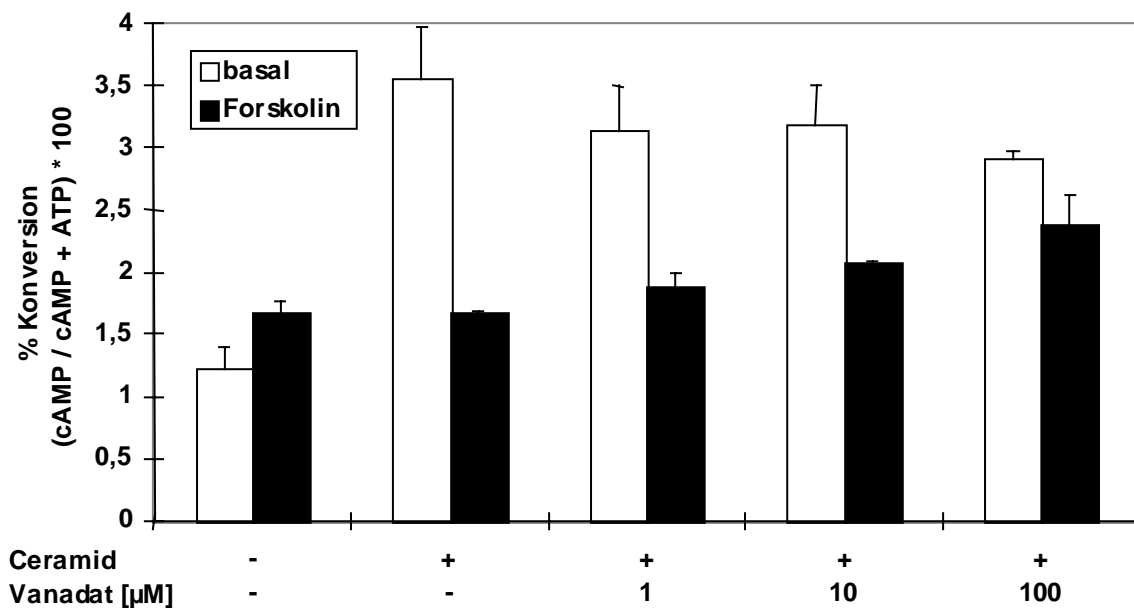
**Abb. 28** Einfluß des PP2B Inhibitors Cyclosporin A auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Cyclosporin A zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

### 3.7.3 Wirkung des Tyrosin Phosphatase Inhibitors Na-*o*-Vanadat auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II

Eine weitere Subfamilie der Protein Phosphatasen stellen die Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) dar (Charbonneau & Tonks, 1992). Die meisten der transmembranen PTPs beinhalten zwei katalytische Domänen, von denen jedoch nur eine für die Phosphatase Aktivität notwendig ist. Zusätzlich gibt es noch eine Vielzahl nicht-katalytischer Domänen, die wahrscheinlich in die subzelluläre Lokalisation oder in die Interaktion mit möglichen Liganden involviert sind.

Für die Inhibierung von Protein Tyrosin Phosphatasen sind potente chemische Substanzen vorhanden. Eine von ihnen ist das Natrium-*ortho*-Vanadat (Gordon, 1991; Posner *et al.*, 1994). Es stellt einen guten PTP-Inhibitor sowohl in Homogenaten als auch in intakten Zellen dar, solange darauf geachtet wird, daß die Oxidationsstufe gewährleistet bleibt.

In diesem Fall wurde der Inhibitor Na-*o*-Vanadat in aufsteigenden Konzentrationen von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  60 min vor Stimulation der HEK 293 ACII Zellen mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (20  $\mu\text{M}$ , 6 h) in das Medium gegeben. Die ACII-Aktivität wurde mittels Tritium-Adenin-Test bestimmt (s. 2.2.5.1).



**Abb. 29** Einfluß des Tyrosin Phosphatase Inhibitors Na-*o*-Vanadat auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$  C<sub>18/24</sub>-Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden die angegebenen Konzentrationen an Na-*o*-Vanadat zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Aus Abb. 29 läßt sich ersehen, daß Na-*o*-Vanadat keinen oder nur einen sehr schwachen inhibitorischen Einfluß auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II ausgeübt hat. Die Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Na-*o*-Vanadat führte zu einem Aktivitätsverlust der Ceramid-stimulierten HEK 293 ACII Aktivität um 28 %. Wurden die Zellen zusätzlich mit Forskolin stimuliert, so scheint die Aktivität durch Na-*o*-Vanadat eher zugenommen zu haben (100  $\mu\text{M}$  Na-*o*-Vanadat: 142 %).

Die Beteiligung einer Protein Tyrosin Phosphatase an der Vermittlung des stimulierenden Effektes von Ceramid auf die AC-II kann aufgrund dieses Ergebnisses nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

### **3.8 Einfluß weiterer Effektoren auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII**

#### **Aktivität**

Zur weiteren Aufklärung der Signalübertragung des aktivierenden Effektes von Ceramid auf die AC-II wurden im folgenden zusätzlich bestimmte Effektoren getestet, die auf verschiedene Bereiche der Signaltransduktion einwirken.

#### **3.8.1 Wirkung von Cycloheximid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität**

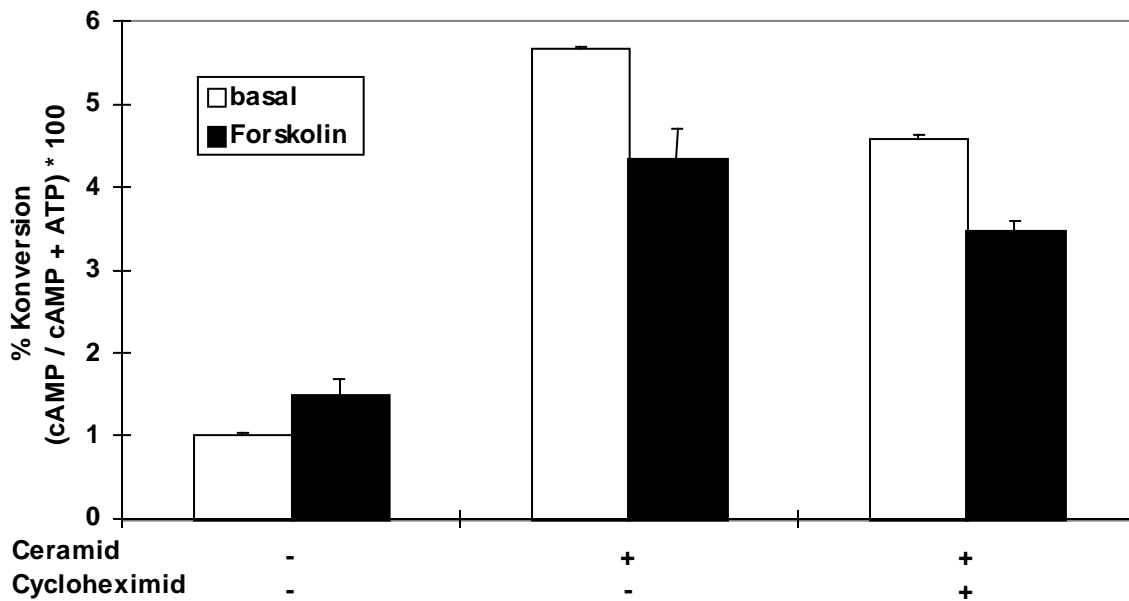
Eine Möglichkeit der Aktivierung der AC-II durch Ceramid ist die Synthese neuer vermittelnder Proteine. Da die Aktivierung der ACII-Aktivität durch Ceramid eine relativ lange Stimulationszeit (erstes meßbares Auftreten eines Effektes liegt bei ca. 1 h, Maximum bei 8 h) benötigt, sollte diese Möglichkeit untersucht werden.

Um Untersuchungen im Hinblick auf die Proteinbiosynthese durchführen zu können, werden bestimmte Antibiotika zur Hemmung der Translation eingesetzt. Eines dieser Antibiotika ist das Cycloheximid (CHX), das über die Inhibierung der Peptidyl-Transferase auf den 60S-Ribosomenuntereinheiten die Translation in Eukaryoten hemmt (Voet & Voet, 1992).

HEK 293 ACII Zellen wurden für 60 min mit 10 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Nach der anschließenden Stimulation mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (6 h, 20 µM) wurde die Bildung von cAMP mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests bestimmt (s. 2.2.5.1).

Aus Abb. 30 läßt sich erkennen, daß durch Cycloheximid die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität (basal) auf 76,3 % gehemmt wurde. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Übertragung des Effektes von Ceramid auf die AC-II zum Teil auf die Synthese neuer Proteine zurückzuführen sein könnte.

Zur Kontrolle wurde der Effekt von Cycloheximid auf die TPA-stimulierte Aktivität der AC-II untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese relativ schnelle Aktivierung innerhalb weniger Minuten wurde durch CHX nicht beeinflusst (99 % Aktivität).

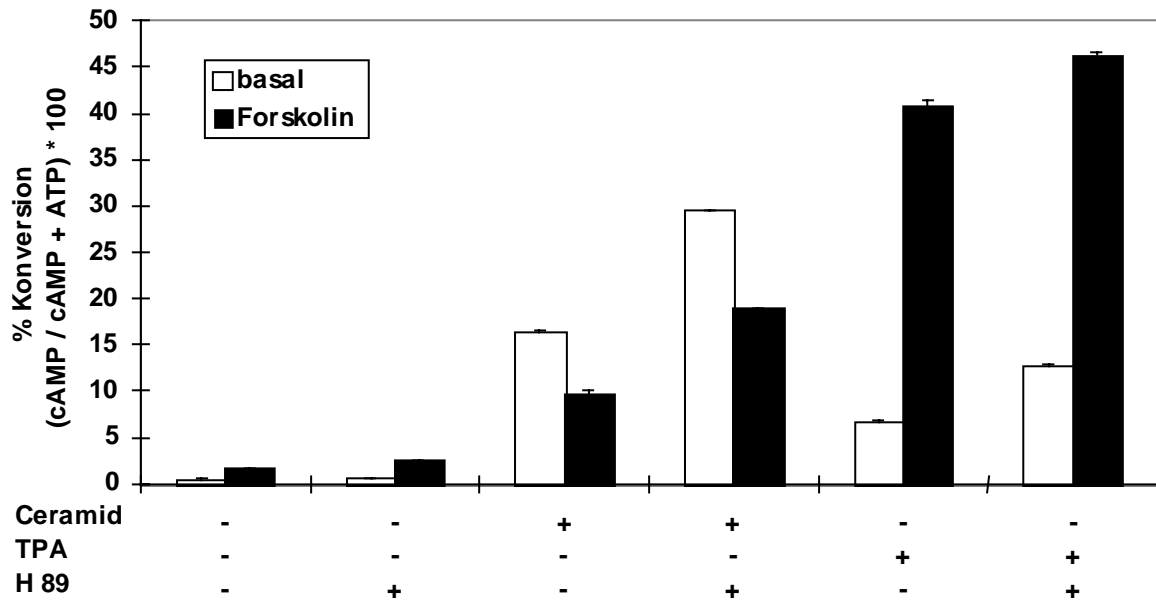


**Abb. 30** Wirkung von Cycloheximid auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 10  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

### 3.8.2 Untersuchungen zum Einfluß von H-89 auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität

Iwami *et al.* (1995) konnten zeigen, daß die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) die Adenylyl Cyclase Typ V über negative Rückkopplung hemmt. Da dieses bisher nur für die AC-V untersucht wurde, erscheint es interessant zu überprüfen, ob die PKA die gleiche inhibitorische Wirkung auch auf die AC-II ausüben könnte. Um weiterhin untersuchen zu können, ob die PKA auch einen Einfluß auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität besitzt, ist es erforderlich, PKA zu hemmen und den daraus resultierenden Effekt auf die Aktivität der AC-II zu untersuchen. Vor einigen Jahren wurde mit *N*-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isochinolin-sulfonamid (H-89) ein neuer, sehr selektiver Inhibitor der Proteinkinase A entdeckt (Chijiwa *et al.*, 1990; Geilen *et al.*, 1992). Der  $K_i$ -Wert von H-89 für die PKA *in vitro* beträgt 0,048  $\mu\text{M}$ .

Nach 60 minütiger Inkubation von HEK 293 ACII Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  H-89 wurden die Zellen mit  $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid (6 h, 20  $\mu\text{M}$ ) bzw. TPA (15 min, 1  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Die anschließende Bestimmung der ACII-Aktivität erfolgte mittels Tritium-Adenin-Test (s. 2.2.5.1).



**Abb. 31** Einfluß von H-89 auf die Ceramid-stimulierte HEK 293 ACII Aktivität. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu\text{M}$   $\text{C}_{18/24}$ -Ceramid sowie für 15 min mit 1  $\mu\text{M}$  TPA stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). Jeweils 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 5  $\mu\text{M}$  H-89 zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu\text{M}$  Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Aus Abb. 31 läßt sich ersehen, daß die Inkubation der HEK 293 ACII Zellen mit H-89 einen vergleichbaren positiven Einfluß sowohl auf die Ceramid-stimulierte als auch auf die TPA-stimulierte ACII-Aktivität besaß. Der Stimulationsindex lag mit Ceramid bei 1,8 und bei TPA bei 1,9. Auf die unstimulierte Aktivität der AC-II hatte H-89 nur einen geringen Einfluß (Faktor 1,1). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, daß der basale cAMP-Level zu niedrig ist, um die PKA zu aktivieren.

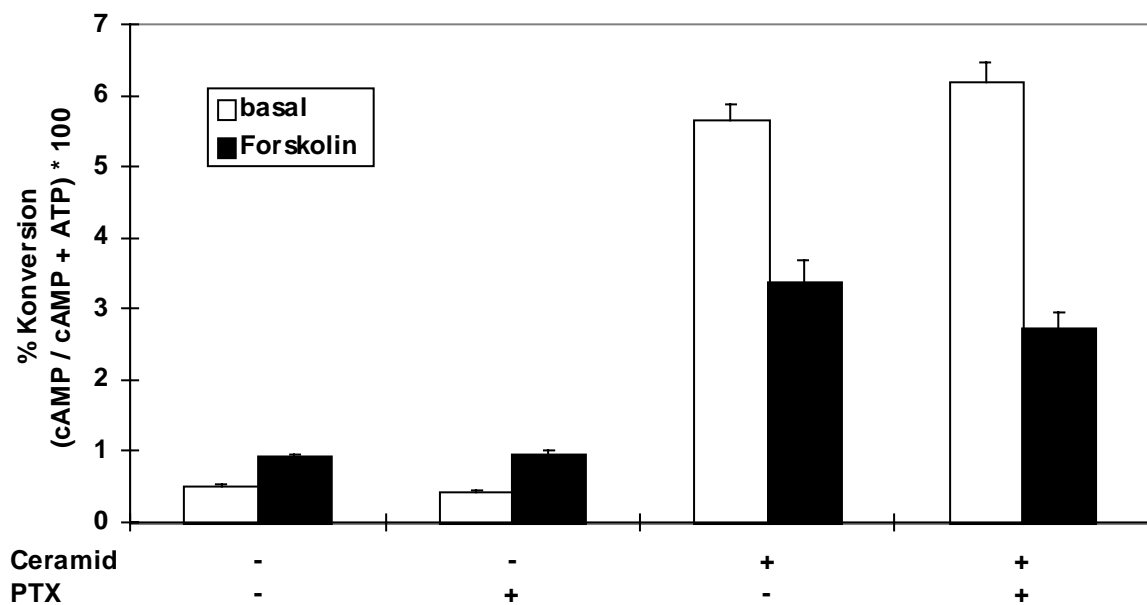
Betrachtet man die zusätzlich mit Forskolin stimulierte Aktivität, so zeigte sich, daß es im Fall von Ceramid durch H-89 zu einer Verdopplung der ACII-Aktivität kam. Auf die Stimulation der AC-II mit TPA und Forskolin hatte H-89 jedoch keinen großen Einfluß (Faktor 1,1), was möglicherweise auf eine maximale Aktivitätserhöhung durch die beiden Aktivatoren zurückzuführen ist. Durch H-89 erhöhte sich wiederum die allein mit Forskolin stimulierte Aktivität der ACII um den Faktor 1,5.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Iwami *et al.* (1995) für die AC-V deuten diese Beobachtungen darauf hin, daß die Inhibierung der Proteinkinase A durch H-89 zu einer Aufhebung der negativen Rückkopplung in bezug auf die AC-II führt und deren Aktivität dadurch erhöht wird.

### 3.8.3 Wirkung von Pertussistoxin auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation mit Ceramid

Die Gruppe der inhibitorischen G-Proteine ( $G_{i/o/\alpha}$ ) wurde nach der Fähigkeit einiger ihrer Mitglieder zur Inhibition der Adenylyl Cyclase benannt. Ihre  $\alpha$ -Untereinheiten werden mit Ausnahme von  $G_{z\alpha}$  durch Pertussistoxin, ein von *Bordella Pertussis* (Erreger des Keuchhustens) produziertes bakterielles Exotoxin, an einem Cysteinrest in Position 4 vom C-Terminus ADP-ribosyliert. Aufgrund dieser Modifikation wird die Wechselwirkung von  $G_{\alpha}$  mit dem Rezeptor unterbunden, so daß der heterotrimere Zustand des G-Proteins erhalten bleibt (Katada & Ui, 1981; Katada & Ui, 1982). Die Pertussistoxin-katalysierte,  $G_{i/o\alpha}$ -spezifische "Entkopplung" vom Rezeptor wird häufig zur Charakterisierung von G-Protein gekoppelten Signalwegen angewendet.

Um eine eventuelle Beteiligung G-Protein-gekoppelter Signalwege an der durch Ceramid vermittelten Erhöhung der ACII-Aktivität zu untersuchen, wurden HEK 293 ACII Zellen für 60 min mit 100 ng/ml Pertussistoxin inkubiert. Nach anschließender Stimulation mit  $C_{18/24}$ -Ceramid (6 h, 20  $\mu$ M) und Forskolin (10 min, 10  $\mu$ M) wurde die cAMP-Bildung mit dem  $^3$ H-Adenin-Test bestimmt (2.2.5.1).



**Abb. 32** Wirkung von Pertussistoxin auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation mit Ceramid. HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20  $\mu$ M  $C_{18/24}$ -Ceramid stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 100 ng/ml Pertussistoxin zugesetzt. Nach 10minütiger Stimulation  $\pm$  10  $\mu$ M Forskolin wurde die AC-Aktivität mit dem Tritium-Adenin-Test bestimmt. Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.

Bei einer Konzentration von 100 ng/ml Pertussistoxin konnte weder auf die unstimulierte noch auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II ein signifikant inhibierender Effekt beobachtet werden (Abb. 32). Dieses gilt auch für die ACII-Aktivität nach Stimulation mit Forskolin.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß aufgrund dieses Ergebnisses eine Beteiligung inhibitorischer G-Proteine an der Übertragung des aktivierenden Effektes von Ceramid auf die AC-II eher unwahrscheinlich ist.

### **3.9 Partielle Stimulierung des Einbaus von [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation durch Ceramid**

Vor einiger Zeit konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, daß die AC-II in ihrem C-terminalen Bereich durch die PKC phosphoryliert wird (Böl *et al.*, 1997a). Durch Mutagenese der AC-II, bei der Threonin 1057 durch Alanin substituiert wurde, konnte eine Mutante (AC-IIT1057A) hergestellt werden, die sich in wesentlich schwächerem Ausmaß durch die PKC stimulieren läßt (Böl, *et al.*, 1997b).

Im folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Aktivierung der AC-II mit Ceramid ebenfalls von einer Phosphorylierung begleitet ist oder ob eventuell auch eine Dephosphorylierung der Adenylyl Cyclase vorliegen könnte. Zu dieser Vermutung gab die Beobachtung Anlaß, daß eine Protein Phosphatase des Typs 2A zur partiellen Aufhebung des Ceramid-Effektes führt (s. 3.6.1).

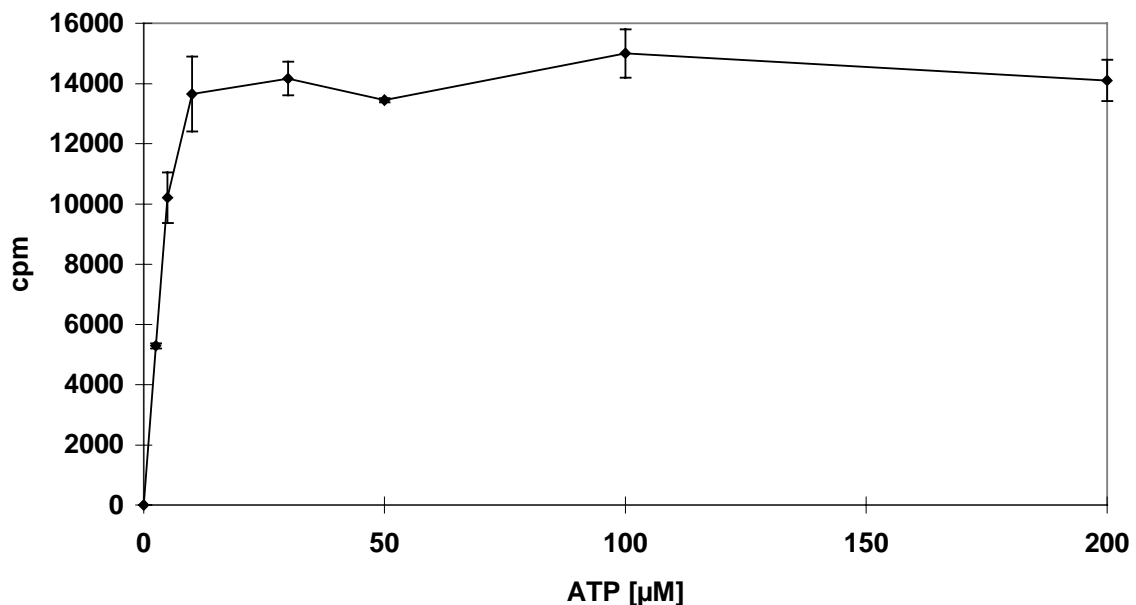
HEK293 ACII Zellen wurden zu diesem Zweck nach einer 1,5stündigen Hungerphase in Kulturmedium ohne Phosphat für 1 h mit 50 µCi/ml [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat markiert und anschließend mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid (20 µM, 6 h ) bzw. TPA (1 µM, 15 min) stimuliert (s. 2.2.8.1). Nach Lyse der Zellen wurde die AC-II mit Hilfe des Pansorbin-gekoppelten BBC-4 Antikörpers (Mollner & Pfeuffer, 1988; Mollner *et al.*, 1991) immunpräzipitiert (s. 2.2.8.2) und anschließend über ein 5-15 %iges SDS-Polyacrylamidgel von möglichen Verunreinigungen abgetrennt (s. 2.2.6). Die AC-II wurde anhand der Autoradiographie lokalisiert, aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in einem β-Counter gegenüber dem Hintergrund gezählt. Eine Abgleichung der aufgetragenen Proteinmengen erfolgte über ein zweites 5-15 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran (s. 2.2.7.1) und anschließender

Chemilumineszenz (s. 2.2.7.2) wurden die der AC-II zugeordneten schwarzen Flecken eingelesen und ihr Schwärzungsgrad densitometrisch bestimmt.

### 3.9.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität von [ $^{32}$ P]-ATP

Aufgrund der Beobachtung, daß die Behandlung von HEK 293 ACII Zellen mit 20  $\mu$ M Ceramid für 6 h zu einer Schädigung bzw. zum Zelltod von ca. 50 % der Zellen führt, war es erforderlich, eine Bestimmung der spezifischen Aktivität des während der Markierungsphase in den Zellen gebildeten [ $^{32}$ P]ATPs durchzuführen. Diese erfolgte anhand eines *in vitro*-Proteinkinase-Tests, der auf Phosphorylierung von Histon-Proteinen durch die PKA mit [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP beruht (s. 2.2.8.4). Das Prinzip dieses Testes besteht in dem Vergleich eines Standards, dessen spezifische Aktivität bekannt ist, mit den zu untersuchenden Proben.

Da der Proteinkinase-Assay unter ATP-gesättigten Bedingungen durchzuführen ist, wurden diese in einem Vortest ermittelt.



**Abb. 33** Proteinkinase-Test zur Bestimmung der Sättigungsbedingungen von ATP. Die Bestimmung der Sättigungsbedingungen von ATP im Proteinkinase-Test erfolgte mit 100 ng PKA, 25  $\mu$ g Histon ,  $6 \times 10^5$  cpm [ $^{32}$ P]- $\gamma$ -ATP und den angegebenen Konzentrationen an ATP in Reaktionspuffer (15 min, 30°C, Endvolumen: 100  $\mu$ l). Dargestellt sind Doppelbestimmungen mit Standardabweichung des Mittelwertes.



Mit Einsatz von 100 ng PKA und 25 µg Histon sowie einer Inkubationszeit von 15 min wurde als Konzentration für die Sättigung eine ATP-Konzentration von 10 µM ermittelt (Abb. 33). Die folgenden Proteinkinase-Assays wurden bei einer Konzentration von 40 µM ATP durchgeführt. Die Bestimmung der ATP-Konzentration der entweißten Cytosole der Proben erfolgte mittels Photometer bei 259 nm (s. 2.2.8.4). Der Anteil der ebenfalls bei dieser Wellenlänge gemessenen Nukleotide AMP und ADP wurde als vernachlässigbar angesehen.

In Tab. 4 sind die anhand eines Proteinkinase-Assays unter den oben aufgeführten Bedingungen ermittelten Werte für die spezifische Aktivität von [<sup>32</sup>P]ATP der zu untersuchenden Proben dargestellt. Die spezifische Aktivität der Kontroll- und der mit TPA-behandelten Zellen lag mit 712 bzw. 739 cpm [<sup>32</sup>P]/pmol ATP im gleichen Bereich. Die mit Ceramid stimulierten Proben zeigten jedoch nur ca. 70 % dieser Aktivität, was mit einer Schädigung der Zellen durch Ceramid (s. 3.1.1.3) und einer möglicherweise daraus resultierenden Beeinträchtigung des ATP-regenerierenden System korreliert.

**Tab. 4** Bestimmung der spezifischen Aktivität von [<sup>32</sup>P]-ATP in Cytosolen phosphatmarkierter HEK 293 ACII Zellen. [<sup>32</sup>P]-*ortho*-Phosphat-markierte HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid sowie für 15 min 1 µM TPA stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 50 nM Okadainsäure zugesetzt. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Bestimmung der spezifischen Aktivität von [<sup>32</sup>P]-ATP mit Aliquots von 20 bzw. 40 µM ATP der entweißten Cytosole mit dem Proteinkinase-Test.

	Kontrolle	Ceramid	Ceramid + Okadainsäure	TPA
<b>Spezifische Aktivität (cpm [<sup>32</sup>P]/pmol ATP)</b>	<b>712</b>	<b>513</b>	<b>487</b>	<b>739</b>

### 3.9.2 Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung

Aus den auf diesem Wege erhaltenen Daten konnte nun die Stöchiometrie der Phosphatmarkierung der AC-II nach Stimulation mit Ceramid mit Hilfe der unter Pkt. 2.2.8.5 aufgeführten Formel errechnet werden.

**Tab. 5** **Partielle Stimulierung des Einbaus von [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat in Adenylyl Cyclase Typ II nach Stimulation durch Ceramid.** [<sup>32</sup>P]-ortho-Phosphat-markierte HEK 293 ACII Zellen wurden für 6 h mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid sowie für 15 min 1 µM TPA stimuliert (Kontrolle: Ethanol + 2 % Dodecan). 1 h vor Beginn der Stimulation wurden 50 nM Okadainsäure zugesetzt. Nach Lyse der Zellen wurde die AC-II mit Hilfe des Pansorbin-gekoppelten BBC-4 Antikörpers immunpräzipitiert und anschließend über ein 5-15 %iges SDS-Polyacrylamidgel von möglichen Verunreinigungen abgetrennt. Die AC-II wurde anhand der Autoradiographie lokalisiert, aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und in einem β-Counter gegenüber dem Hintergrund gezählt. Eine Abgleichung der aufgetragenen Proteinmengen erfolgte über ein zweites 5-15 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran und anschließender Chemilumineszenz wurden die der AC-II zugeordneten schwarzen Flecken eingelese und ihr Schwärzungsgrad densitometrisch bestimmt. Die Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung der AC-II erfolgte mit Hilfe der unter Pkt. 2.2.8.5 aufgeführten Formel.

	<b>Kontrolle</b>	<b>Ceramid</b>	<b>Ceramid + Okadainsäure</b>	<b>TPA</b>
<b>mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II</b>	<b>1,02</b>	<b>2,12</b>	<b>1,97</b>	<b>1,67</b>

Wie sich aus Tab. 5 ersehen läßt, lag der Einbau von Phosphat in die mit Ceramid stimulierte AC-II mit 2,12 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II um den Faktor 2,1 über dem in Kontrollzellen (1,02 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II). Entgegen den Erwartungen ließ sich der Einbau von Phosphat durch Okadainsäure nicht hemmen. Erwartet wurde eine Änderung des Phosphateinbaus entsprechend der partiellen Aufhebung des Effektes von Ceramid auf die AC-II durch Okadainsäure im Aktivitätstest *in vivo* (s. 3.6.1.1), hier lag jedoch die Hemmung des Ceramid-Effektes nur bei 14 %.

Der Einbau von 1,02 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II in Kontrollzellen erschien etwas hoch (Simmons, 1990), läßt sich jedoch eventuell zum Teil mit einer Stimulation durch Ethanol erklären, die in der angewendeten Konzentration von 1 % final immerhin zu einer Aktivierung der AC-II um den Faktor 2,4 führt.

Zur Kontrolle wurde der Phosphateinbau in die mit TPA aktivierte Adenylyl Cyclase Typ II bestimmt, wobei sich ein Wert von 1,67 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II ergab. Dieses Ergebnis lag in dem von Böhl et al. (1997a) ermittelten Bereich von 1,6±0,2 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Stimulation von HEK 293 ACII Zellen durch Ceramid höchstwahrscheinlich über Aktivierung einer Kinase zu einem verstärkten Einbau von Phosphat in die AC-II führt. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß dieses Experiment unter den beschriebenen Bedingungen nur einmal durchgeführt wurde, so daß das erhaltene Ergebnis relativiert werden muß.

## 4 Diskussion

### 4.1 Aktivierung der Adenylyl Cyclase durch Ceramid

In jüngerer Zeit wurden Fortschritte bei der Definition von Signaltransduktionsmechanismen bezüglich der Regulation von u.a. Apoptose erzielt. Hierbei wurde v.a. die Rolle eines Sphingolipids, des Ceramids, als neuer „Lipid-Second-Messenger“ erkannt. Diese Entdeckungen stehen in krassem Gegensatz zu dem Wissen, das noch 10 Jahre zuvor über Sphingolipide als „Signaling“-Moleküle bekannt war. Zu dieser Zeit wurde angenommen, daß die Lipidkomponenten von eukaryontischen Zellmembranen wie Glycerophospholipide, Cholesterol oder Sphingolipide primär als strukturelle Komponenten der Membrandoppelschicht mit einer ansonsten passiven Rolle in der Zelle fungieren. Dieses änderte sich mit der Entdeckung des Phosphatidylinositol-Zyklus, der zur Etablierung der Signaltransduktion über Glycerophospholipide führte (Berridge *et al.*, 1995). Dem folgend wurde der Sphingomyelin-Zyklus identifiziert (Okazaki *et al.*, 1989). Die Aktivierung des Sphingomyelin-Zyklus erfolgt durch die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen Rezeptor, wodurch eine Sphingomyelinase aktiviert wird. Diese wiederum ist für die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Cholinphosphat verantwortlich. Sphingolipide zählen zu den Schlüsselementen der Lipid-Signaltransduktion mit Beteiligung an verschiedenen antiproliferativen Signalwegen (Hannun & Linaudic, 1993) wie Differenzierung, Ruhen des Zellzyklus, Altern von Zellen und Apoptose.

#### 4.1.1 Ceramid aktiviert die AC-II

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Tritium-Adenin-Tests gezeigt werden, daß die Inkubation der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293, in der die Adenylyl Cyclase Typ II stabil überexprimiert worden ist, mit C<sub>18/24</sub>-Ceramid zu einer Erhöhung der endogenen cAMP-Konzentration führt (s. 3.1.1.2, Abb. 6). In diesem Fall ist nach 8 h mit der über 100fachen Menge an cAMP das Maximum erreicht. Die Optimierung des Waschverfahrens der Säulen im Verlauf der Arbeit führte zu einer Erhöhung der Stimulationswerte um den Faktor 10 und damit zu einer Verbesserung des Systems. Die fortdauernde Stimulation der Zellen mit Ceramid führt wieder zu einem Rückgang der ACII-Aktivität, d.h. nach 16 h liegt gegenüber dem Kontrollwert ein nur noch 57fach erhöhter cAMP-Spiegel in der Zelle vor. Pyne & Pyne fanden 1996

vergleichbare Ergebnisse in mit Cholera-toxin vorbehandelten ASM Zellen („air-smooth-muscle“), die die AC-II exprimieren. Nach Zugabe von exogenem C<sub>2</sub>- und C<sub>6</sub>-Ceramid stieg der endogene cAMP-Level sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig an. Allerdings konnten sie schon nach 10 min erste Konzentrationserhöhungen von cAMP messen. Das Maximum von C<sub>2</sub>-Ceramid lag bei 60 min, das von C<sub>6</sub>-Ceramid war nach 90 min (letzter Meßpunkt) noch nicht erreicht. Einen Teil dieses Effektes führen Pyne & Pyne auf die Ceramid-induzierte Aktivierung der MAP-Kinase zurück. Diese ist daraufhin über die Phosphorylierung der cytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> mit der Prostaglandinsynthese verbunden und Prostaglandine sind in der Lage, über ihren Rezeptor die Adenylyl Cyclase zu stimulieren. Dieser Weg der Signalvermittlung liegt in den hier getesteten HEK 293 Zellen nicht vor. Die Inhibition der Prostaglandinsynthese durch bis zu 1 mM Acetylsalicylsäure hat auf die Stimulation der AC-II durch Ceramid keinen Einfluß (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz zu Pyne & Pyne konnten Negishi *et al.* (1998) in Ratten Pinealozyten keinen Effekt von exogenem C<sub>2</sub>-, C<sub>6</sub>- und C<sub>8</sub>-Ceramid auf die basale, Isoproterenol- oder Norepinephrin-stimulierte cAMP-Bildung zeigen. Deren Ergebnisse wiesen darauf hin, daß Ceramid selektiv die - durch einen Anstieg von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> über Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des L-Typs ausgelöste - cAMP-Bildung inhibiert und somit eine Rolle bei der Regulation dieser Kanäle spielt.

Wie der Einsatz verschiedener Ceramid-Derivate zeigt, ist der stimulatorische Effekt von Ceramid auf die AC-II abhängig von der Kettenlänge. Das Gemisch natürlicher Ceramide (C<sub>18/24</sub>) löst die stärkste Aktivierung der AC-II aus, gefolgt von C<sub>16</sub>-Ceramid, das im größten Teil der Messungen jedoch nur noch eine Effektivität von ca. 50 % zeigt (s. 3.1.2, Abb. 10). In einigen Fällen konnte mit C<sub>16</sub>-Ceramid jedoch eine annähernd gleichstarke Aktivierung der AC-II in bezug auf C<sub>18/24</sub>-Ceramid erreicht werden. Dieses könnte möglicherweise durch nicht näher bekannte Schwankungen im Testsystem hervorgerufen werden. Das Acetyl-Derivat (C<sub>2</sub>) stimuliert die basale ACII-Aktivität sogar erst ab einer Konzentration > 20 µM. Ein ähnliches Phänomen konnten Dobrowsky *et al.* (1993) in Bezug auf die *in vitro*-Aktivierung der Ceramid-aktivierten Proteinphosphatase (CAPP) durch Ceramid zeigen. Mit steigenden Ceramid-Kettenlängen bis zu C<sub>10</sub> stieg auch die Aktivität der CAPP, danach fiel sie wieder ab (C<sub>14</sub>) und C<sub>18</sub>-Ceramid war inaktiv. Den Grund dafür sahen sie in der mangelnden Löslichkeit der längerkettigen und damit hydrophoberen Ceramid-Derivate im Reaktionspuffer, was in der vorliegenden Arbeit jedoch kein größeres Problem mehr darstellte. Demzufolge nahm auch die Aktivität der AC-II mit steigenden Kettenlängen von Ceramid nicht wieder ab. Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Messungen hinsichtlich der Zellinnenkonzentrationen der exogen zugeführten Aktivatoren/Inhibitoren der Adenylyl Cyclase durchgeführt werden. Es

kann jedoch als sicher angenommen werden, daß die Zellinnenkonzentrationen dieser Agentien um einiges niedriger liegen als die Konzentrationen, die außen ins Medium abgegeben wurden.

Die wenig polaren Sphingolipide wie u.a. auch langkettige Ceramide sind in Wasser unlöslich und aus diesem Grund schwer in Kulturmedien zu dispergieren. Ji *et al.* fanden 1995 mit dem Gemisch Ethanol und Dodecan (Verhältnis 98:2), nicht aber mit Ethanol allein, eine Lösung für dieses Problem. Sie konnten zeigen, daß in diesem Gemisch gelöstes, exogen zu U937 Zellen gegebenes Ceramid in der Lage ist, von den Zellen aufgenommen zu werden (das Maximum liegt in diesem Fall bei 1 h, wohingegen die Aktivierung der AC-II durch Ceramid ihr Maximum erst nach 8 h erreicht) und die für Apoptose charakteristische Fragmentierung der DNA zu induzieren. Der Einsatz von Ethanol als Lösungsmittelkomponente ist jedoch nicht ganz unproblematisch, da Ethanol eine stimulierende Wirkung auf cAMP-bildende Systeme ausübt (Hoffman *et al.*, 1990). Ethanol setzt u.a. die Halbwertszeit der Aktivierung der Adenylyl Cyclasen durch nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga herab. In dem in dieser Arbeit untersuchten Zellsystem (HEK 293 ACII Zellen) hat Ethanol ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die AC-II, der sowohl konzentrations- als in geringerem Maße auch zeitabhängig ist (s. 3.1.1.1, Abb. 3). Die Stimulation der Zellen mit 4 % Ethanol über einen Zeitraum von 60 min führt zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration um den Faktor 25,1. Dieser Faktor liegt bei einer Ethanolkonzentration von 1 % nur noch bei 2,4. Bis zu dieser Konzentration haben auch unterschiedliche Stimulationszeiten keinen Einfluß auf die Aktivierung der AC-II (s. 3.1.1.1, Abb. 3); erhöht man diese jedoch, nimmt auch der Einfluß der Stimulationsdauer zu. Yoshimura & Tabakoff (1995) untersuchten den gleichen Effekt in HEK 293 Zellen, in denen verschiedene AC-Isoformen transient exprimiert worden waren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit fanden sie jedoch keine Erhöhung der basalen AC-Aktivität durch Stimulation der Zellen mit Ethanol. In Gegenwart von stimulatorischen Agentien der Adenylyl Cyclase (wie z.B. Prostaglandin E<sub>1</sub>) konnten sie für die AC-VII mit einer Erhöhung der cAMP-Konzentration um 140 % den größten Effekt nachweisen (10 min, 200 mM -1,2 %- Ethanol, 10 µM PGE<sub>1</sub>). Aber auch die Aktivität der AC-Subtypen II, V und VI ließ sich durch Ethanol steigern. Ein Anstieg der cAMP-Bildung in Verbindung mit weiteren stimulatorischen Agonisten konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (Forskolin). Die zweite Lösungsmittelkomponente Dodecan hat auf die Aktivität der AC-II jedoch keinen Einfluß (s. 3.1.1.1, Abb. 5).

Um sicherzustellen, daß Veränderungen des cAMP-Levels nicht auf Effekten von Phosphodiesterasen beruhen, wurde dem Testsystem der Phosphodiesteraseinhibitor

Isobutylmethylxanthin (IBMX) zugesetzt (s. 3.1.1.4, Abb. 9). Durch den Einsatz von steigenden Konzentrationen IBMX kommt es in dem verwendeten Testsystem (Tritium-Adenin-Test) nach Stimulation mit Ceramid zu einem Anstieg an cAMP, was darauf hindeutet, daß der stimulatorische Effekt von Ceramid auf die AC-II nicht durch die Modulation von Phosphodiesterasen ausgelöst wird. Desweiteren kann auch weitgehend davon ausgegangen werden, daß es sich bei den gemessenen Werten um cAMP und nicht um chemisch verwandte Verbindungen handelt, die ein ähnliches Laufverhalten auf den verwendeten Säulen (Dowex, Alox) aufweisen. Auf letztere dürfte IBMX keinen Einfluß ausüben, da sie nicht der Regulation durch Phosphodiesterasen unterliegen.

Die biologisch inaktiven Vorstufen der Ceramide, die Dihydro-Ceramide, werden u.a. als Negativkontrollen bezüglich Ceramid-vermittelter Effekte eingesetzt. Ihnen fehlt die 4,5-trans-Doppelbindung, sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des Aufnahmeverhaltens in die Zelle und des Metabolismus nicht sehr von den Ceramiden (Bielawska *et al.*, 1993). Die in dieser Arbeit eingesetzten Dihydro-Ceramid-Derivate (Kettenlängen C<sub>2</sub> und C<sub>16</sub>) zeigen mit 60-80 % der Aktivität ihrer ungesättigten Gegenstücke nicht das erwartete Fehlen von Aktivität (s. 3.1.2, Abb. 10). Dieses Verhalten läßt darauf schließen, daß die 4,5-trans-Doppelbindung des Ceramids für den beobachteten stimulatorischen Effekt auf die Adenylyl Cyclase Typ II nicht unbedingt notwendig ist. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, daß innerhalb der Zelle zu einem gewissen Prozentsatz durch Reduktion des exogen zugesetzten Dihydro-Ceramids eine 4,5-trans-Doppelbindung eingeführt wird und das so gebildete Ceramid für die Stimulation der AC-II verantwortlich ist. Die Bedeutung der 4,5-trans-Doppelbindung in Ceramiden ist zur Zeit nicht eindeutig geklärt. So konnten Jarvis *et al.*, (1994) zeigen, daß D-*erythro*-Dihydro-C<sub>6</sub>-Ceramid in der Lage ist, in HL-60 Zellen DNA-Fragmentierung (Apoptose) zu induzieren. In einer anderen Untersuchung war D-*erythro*-Dihydro-C<sub>2</sub>-Ceramid inaktiv, wohingegen D-*threo*-Dihydro-C<sub>2</sub>-Ceramid Aktivität zeigte (Bielawska *et al.*, 1993). Karasavvas *et al.* (1996) konnten mit DL-*erythro*-Dihydro-C<sub>8</sub>-Ceramid in U937 Zellen ebenfalls eine Induktion von DNA-Fragmentierung nachweisen, wenngleich dieser Effekt auch sehr viel schwächer als der des D(L)-*erythro*-C<sub>8</sub>-Ceramids ausgeprägt war.

#### **4.1.2 Aktivierung der AC-II durch endogen gebildetes Ceramid**

In zwei unterschiedlichen Ansätzen wurde der endogene Ceramid-Level in HEK 293 ACII Zellen angehoben, um einen weiteren Nachweis des stimulatorischen Effektes von Ceramid auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase Typ II zu erhalten. Die exogene Zugabe von neutraler,

membranpermeabler Sphingomyelinase zum Zellmedium führt durch Spaltung von Sphingomyelin zur Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels und somit zur Induktion verschiedener Effekte von Ceramid *in vivo* (Okazaki *et al.*, 1989, Mathias *et al.*, 1993, Pyne *et al.*, 1996). Auch die Aktivität der AC-II läßt sich zeit- und konzentrationsabhängig durch bakterielle SMase stimulieren (s. 3.4.1, Abb. 16). Eine signifikante Stimulation der cAMP-Bildung in HEK 293 ACII Zellen kann, ebenso wie bei Pyne & Pyne (1996) in ASM Zellen, erst ab einer SMase-Konzentration von 1 U/ml beobachtet werden (Faktor 7,4 gegenüber Kontrollzellen). Der Einsatz höherer Konzentrationen von SMase, die bei Pyne & Pyne (1996) zu einem weiteren Anstieg der cAMP-Bildung führte, ist in dem hier untersuchten Zellsystem nicht möglich, da die Vitalität der Zellen in diesem Fall auf unter 10 % sinkt. Ob dieses Phänomen eventuell auf eine erhöhte Ceramid-Konzentration in der Zelle zurückzuführen sein könnte, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Im Gegensatz zum exogen zugeführten C<sub>18/24</sub>-Ceramid, dessen Stimulationsmaximum bei 8 h liegt, wird durch die Erhöhung des endogenen Ceramidspiegels durch Gabe von 1 U/ml SMase ein signifikanter Anstieg der ACII-Aktivität erst nach 18 h erreicht (Faktor 4,7) (s. 3.4.1, Abb. 17a). Dieser Anstieg der cAMP-Konzentration kehrt sich auch nach 48 h noch nicht wieder um, was möglicherweise auf eine größere Zellvitalität (s.u.) zurückzuführen ist (s. 3.4.1, Abb. 17b). Trotz der unterschiedlichen Stimulationskinetiken sind jedoch sowohl exogen zugeführtes als auch endogen durch Zugabe bakterieller Sphingomyelinase erzeugtes Ceramid in der Lage, die AC-II zu stimulieren. Diese Beobachtung wird noch durch ein zweites Experiment mit dem Ziel, den endogenen Ceramid-Level zu erhöhen, untermauert. Durch Inhibition der Ceramidase, die für den Abbau von Ceramid zu Sphingosin und freien Fettsäuren verantwortlich ist, kann ebenfalls die Konzentration intrazellulären Ceramids erhöht werden. Das zellpermeable D-*e*-MAPP inhibiert die alkalische Ceramidase (Bielawska *et al.*, 1996) und führt ebenso wie die Sphingomyelinase in den in dieser Arbeit untersuchten HEK 293 ACII Zellen zu einer Erhöhung der AC-II Aktivität gegenüber Kontrollzellen (s. 3.4.2, Abb. 18). Der höchste, unter den hier untersuchten Bedingungen gemessene Stimulationsfaktor liegt bei 2,7 (100 µM D-*e*-MAPP, 24 h), die Aktivierung der AC-II fällt also deutlich geringer als mit SMase aus. Dieses könnte möglicherweise daran liegen, daß D-*e*-MAPP nur die alkalische, nicht aber die saure Ceramidase inhibiert. Es wird vermutet, daß die lysosomal lokalisierte saure Ceramidase an den abbauenden Signalwegen des Sphingolipid-Metabolismus beteiligt ist (Bernardo *et al.*, 1995), während über die Bedeutung der in verschiedenen Geweben wie Niere, Gehirn, Leber oder Epidermis (Spence *et al.*, 1986, Slife *et al.*, 1989, Sugita *et al.*, 1975, Wertz & Downing, 1990) vorkommenden alkalischen Ceramidase noch weniger bekannt ist.

### 4.1.3 Ceramid stimuliert die AC-Isoformen I und V

Neben der Adenylyl Cyclase Typ II, die zur Subfamilie der durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine, zusammen mit  $\alpha_s$ , stimulierbaren ACs gehört, wurden mit der AC-I ( $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-stimulierbar; inhibierbar durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine) und der AC-V (Mitglied der  $\text{Ca}^{2+}$ -inhibierbaren Subfamilie) Isoformen der beiden anderen AC-Subfamilien hinsichtlich ihres Verhaltens in Bezug auf die Stimulation mit Ceramid untersucht. Sowohl die AC-I als auch die AC-V zeigen mit der Verdopplung ihrer Aktivität im Vergleich zur AC-II eine wesentliche schwächere Reaktion auf die Stimulation mit Ceramid (s. 3.1.3.2, Abb. 12). Ebenso unterscheiden sich die drei Isoformen der Adenylyl Cyclasen bezüglich ihrer Aktivität nach gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit Ceramid und Forskolin, eines natürlich vorkommenden Diterpens, das 1981 als direkter Aktivator der Adenylyl Cyclasen identifiziert wurde (Seamon *et al.*, 1981; Seamon & Daly, 1986). Während die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II durch Forskolin inhibiert wird, trifft dies auf die anderen beiden untersuchten Subtypen der AC nicht zu. Obwohl sich die Aktivitäten der AC-I bzw. AC-V nach zusätzlicher Stimulation mit Forskolin weiter erhöhen, liegen die cAMP-Konzentrationen in beiden Fällen jedoch noch unter den Werten, die nach alleiniger Aktivierung mit Forskolin beobachtet werden. Die Stimulationsraten in An- und Abwesenheit von Forskolin fallen nach Behandlung mit Ceramid von 27,5 auf 5,5 (AC-V) bzw. von 8,2 auf 3,2 (AC-I). Die Reaktionen dieser drei Subformen auf Ceramid und Forskolin könnten jedoch auf einen ähnlichen Signalweg hinweisen, bei dem die Aktivierungsmechanismen des Enzyms durch Ceramid und Forskolin miteinander interferieren. Die gleichzeitige Stimulation mit Ceramid und Forskolin ergibt in keinem Fall die höchste AC-Aktivität. Der Unterschied der drei Isoformen liegt hier darin, daß der „Hauptaktivator“ für die AC-I und die AC-V das Forskolin, für die AC-II jedoch das Ceramid ist, der jeweils durch den zweiten, schwächeren Aktivator gehemmt scheint.

Im Gegensatz zur Stimulation mit Forskolin ist die hormonelle Aktivierung der Adenylyl Cyclase Typ II über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) nach Gabe von Ceramid nicht inhibiert (s. 3.1.4, Abb. 13). Die gleichzeitige Aktivierung der AC-II mit Ceramid und Isoproterenol (Aktivierung der AC über den  $\beta$ -Adrenozeptor) liegt um den Faktor 1,6 höher als die allein mit Ceramid stimulierte Aktivität. Desweiteren scheint es sich in diesem Fall um eine synergistische Wirkung von Ceramid und der hormonellen Stimulation über G-Proteine zu handeln.

Da G-Proteine, deren Signale über die Bindung von spezifischen Liganden an Zelloberflächenrezeptoren generiert werden, bei der Aktivierung der Adenylyl Cyclase eine wichtige Rolle spielen, bestand auch in diesem Fall, die Möglichkeit einer Beteiligung am



untersuchten Effekt von Ceramid auf die AC. Sphingosin-1-Phosphat führt z.B. zum Absinken sowohl des basalen als auch des Isoproterenol- oder Forskolin-stimulierten cAMP-Levels in der Zelle (Goodemote *et al.*, 1995; Okajima *et al.*, 1997). Die Hemmung dieses Effektes durch Pertussistoxin ließe auf die Involvierung eines PTX-sensitiven G-Proteins ( $G_{i/o\alpha}$ ) bei der Übertagung des Signals schließen. Auf die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II hat Pertussistoxin jedoch keinen Einfluß. Diese Beobachtung führt zu der Vermutung, daß der hier untersuchte Effekt höchstwahrscheinlich nicht unter Beteiligung von  $G_{i/o\alpha}$  vermittelt wird.

#### 4.1.4 Ceramid induziert Zelltod

HEK 293 Zellen stellen eines der weit verbreitetsten Zellsysteme für die Expression von rekombinanten Proteinen dar. Einer ihrer Nachteile ist jedoch die schlechte Adhärenz an Zellkulturschalen (Robbins & Horlick, 1998). Dieses Phänomen tritt auch während der Inkubation der Zellen mit Ceramid verstärkt auf. Die Zellen werden kugelig, lösen sich vom Plastik der Schalen ab und schwimmen in Zellhaufen im Kulturmedium herum. Die derartigem Stress ausgesetzten Zellen unterliegen dabei mit steigender Inkubationsdauer in zunehmendem Maße dem Zelltod. Durch Trypanblaufärbung konnte gezeigt werden, daß nach einer 6stündigen Inkubation von HEK 293 ACII Zellen mit 20  $\mu$ M Ceramid bereits 50 % der Zellen tot sind (s. 3.1.1.3.1, Abb. 7). Dieser Anteil an toten Zellen erhöht sich nach 16 h auf 95 % und könnte zumindest auf indirektem Wege an dem beobachteten Rückgang der Aktivität der AC-II nach dem Maximum der cAMP-Konzentration nach 8-stündiger Inkubation mit Ceramid sowie an den starken Schwankungen sowohl der Basal- als auch der Ceramid-Werte beteiligt sein. Mit der steigenden Zellyse korreliert auch die Beobachtung, daß die intrazelluläre ATP-Konzentration in mit 20  $\mu$ M Ceramid (5 h) behandelten HEK 293 ACII Zellen um den Faktor 3,5 niedriger als in Kontrollzellen ist (Mollner, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies deutet entweder auf einen sehr starken Verbrauch von ATP zur Bildung von cAMP oder auf einen Zusammenbruch des ATP-generierenden Systems in der Zelle hin.

Die Tatsache, daß die Bildung von Ceramid durch Aktivierung des Sphingomyelin-Signaltransduktionsweges (z.B. über TNF, IL-1 oder Dexamethason) zur Apoptose von Zellen führt, ist seit einigen Jahren bekannt. Apoptose ist ein Prozeß, in dem der Zelltod in einer geordneten Art und Weise durch Aktivierung und/oder Synthese von für die zelluläre Selbstzerstörung notwendigen Genprodukten initiiert und abgeschlossen wird. Als physiologischer Zelltod wurde Apoptose ursprünglich auf der Basis von morphologischen

Veränderungen in betroffenen Zellen von der Nekrose (pathologischer Zelltod) unterschieden (Kerr *et al.*, 1971, Kerr *et al.*, 1972). Anders als Nekrose ruft Apoptose nur geringe Entzündungsreaktionen hervor, da die apoptotischen Zellen und Fragmente (apoptotische Körper) durch umliegende Zellen phagozytiert werden. Verschiedene Agentien und gentoxische Stoffe wie Viren, Toxine, Antikrebs-Medikamente, Glucokortikoide, radiologische Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, reaktive Sauerstoffspezies, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) induzieren Apoptose in einer Reihe von Zelltypen (Übersichtsartikel: Hickman, 1992, Schwartzman & Cidlowski, 1993, Thompson, 1995, Vaux & Strasser, 1996, Hale *et al.*, 1996). Das am besten definierte biochemische Ereignis hinsichtlich Apoptose ist das Schneiden der doppelsträngigen DNA an den Verbindungsstellen zwischen den Nukleosomen. Die entstehenden 180-200 Basenpaar großen Fragmente erscheinen in der Agarose-Gelelektrophorese als typisches Muster einer DNA-Leiter, wohingegen der DNA-Abbau bei Nekrose zufällig ist und im Gel als Schmier zu sehen ist (Wyllie, 1980, Arends *et al.*, 1990). Eine Methode zum Untersuchen von Zellen auf Apoptose stellt der Einsatz eines Anti-PARP-Serums dar, das den Nachweis über die Detektion einer für Apoptose spezifischen Bande der Poly-ADP-Ribose-Polymerase führt. Diese Bande wird in mit Ceramid behandelten HEK 293 ACII Zellen, in denen ein erhöhter cAMP-Spiegel beobachtet wird, nicht detektiert, was darauf hindeutet, daß in den untersuchten Zellen keine Apoptose vorliegt (s. 3.1.1.3.2, Abb. 8). In der Literatur wurden unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich des Einflusses von cAMP auf Apoptose beschrieben. Ein Ansteigen des intrazellulären cAMP-Levels führt u.a. im Gehirn während der pränatalen Entwicklung, in lymphoiden Zelllinien und in Thymozyten zu apoptotischem Zelltod (Kizaki *et al.*, 1990, Pratt & Martin, 1975, Daniel *et al.*, 1973, Walker *et al.*, 1983). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß cAMP z.B. in Neuronen (Rydel & Greene, 1988), in T-Zellhybridomen (Lee *et al.*, 1993) und in HL-60 Zellen (Jun *et al.*, 1998) in der Lage ist, Apoptose zu inhibieren.

Untersuchungen hinsichtlich des Nachweises von Nekrose wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es ist jedoch bekannt, daß Lipid-Botenstoffe amphiphatisch und Membran-aktiv reagieren (Hannun, 1994). Einige dieser Lipid-Effekte können aufgrund von Detergenz-artiger Aktivität zu Zellyse oder aber zu unspezifischen Effekten führen, in denen bestimmte Membran-assoziierte Enzyme und Proteine eine hydrophobe Umgebung für optimale Aktivität benötigen (Hannun, 1994). Cantrill *et al.* (1996) konnten dagegen zeigen, daß ein Anstieg an ungesättigten Fettsäuren in der Membran über die exogene Zugabe derselben zu einer Abnahme der Isoproterenol- und Prostaglandin E<sub>1</sub>-stimulierten cAMP-Bildung in U 937 Zellen führt. Sie vermuten, daß dieses entweder an einer reduzierten Rezeptor/Effektor-Kopplung als Folge der

erhöhten Membranfluidität (Clandinin *et al.*, 1983) liegt oder aber auf eine schwächer ausgeprägte Inhibierung der für den cAMP-Abbau verantwortlichen Phosphodiesterase-Aktivität durch IBMX zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang berichteten Dubois *et al.* (1992), daß Phosphodiesterasen durch mehrfach ungesättigte stärker als durch gesättigte Fettsäuren inhibiert werden. Desweiteren kamen Huang *et al.* (1998) zu dem Ergebnis, daß eine Beziehung zwischen durch Ceramid-Analoga induzierten Membrandefekten und deren Wirkung auf die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> besteht. Außerdem unterschieden sich die Effekte der kurzkettigen, membranpermeablen Ceramide von denen der natürlichen Ceramide. Dies deutet darauf hin, daß die häufig zur Untersuchung des Sphingomyelin-abhängigen Signaltransduktionswegs verwendeten kurzkettigen Derivate den Effekt der natürlichen Ceramide nicht vollständig imitieren können. Die Frage, inwieweit einige der oben beschriebenen Effekte auf die in dieser Arbeit untersuchte Aktivierung der AC-II durch Ceramid zutreffen, muß in späteren Arbeiten geklärt werden. Ebenso kann aufgrund des einen hier durchgeführten, ohne eindeutiges Ergebnis verlaufenden Experiments zur Untersuchung von Apoptose (Fehlen eines positiven Kontroll-experiments in dem hier untersuchten System), das Auftreten von Apoptose nach Ceramid-Stimulation nicht eindeutig ausgeschlossen werden.

#### 4.1.5 Weitere Testsysteme

Aufgrund der unter Punkt 4.1.4 beschriebenen Nachteile des Tritium-Adenin-Tests (Zelltod u.a.) bei der Untersuchung des stimulierenden Effektes von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II wurden zwei Ausweichmöglichkeiten getestet, die beide jedoch nicht geeignet sind, den Tritium-Adenin-Test zu ersetzen.

Bei der *in vitro*-Stimulation von HEK 293 ACII Membranen mit Ceramid läßt sich der Anstieg des cAMP-Spiegels nicht reproduzieren (s. 3.2, Abb. 14b) und auch nach Membranpräparation von bereits mit 20 µM C<sub>18/24</sub>-Ceramid für 6 h vorstimulierten Zellen liegt der Stimulationsfaktor nur bei vernachlässigbaren 1,3 (s. 3.2, Abb.14a). In diesem Fall beträgt die Forskolin-stimulierte Aktivität (+ Ceramid) nur noch 75 % der Kontrollaktivität (- Ceramid). Dies bedeutet, daß Ceramid die Forskolin-stimulierte ACII-Aktivität partiell zu hemmen scheint und steht im Widerspruch zum *in vivo*-System, bei dem es genau umgekehrt zu sein scheint (partielle Inhibition der Ceramid-stimulierten ACII-Aktivität durch Forskolin). Dieses Phänomen kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten jedoch nicht erklärt werden und das getestete *in-vitro*-System der Membranpräparation ist nicht geeignet für Untersuchungen des Effekts von Ceramid auf die AC-II.

Ebenso zeigt die Messung der cAMP-Konzentration an mit 100 µg/ml Lysophosphatidylcholin (LPC) (10 min, 30°C) permeabilisierten HEK 293 ACII Zellen, daß dieses System nicht geeignet ist, den aktivierenden Effekt von Ceramid auf die AC-II weiter zu untersuchen (s. 3.3.2, Abb. 15). Zwar ist ein Anstieg der cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Ceramid deutlich meßbar (Faktor 2,8). Da jedoch LPC einen stark inhibierenden Einfluß auf die Aktivität der AC-II besitzt und somit der Aktivitätsbereich der mit LPC permeabilisierten Zellen nur noch bei ca. 2 % der nicht behandelten Zellen liegt (Mollner, 1998, unveröffentlichte Ergebnisse), ist auch dieses System für weitere Untersuchungen nicht geeignet. Aus diesem Grund wurden die unter Punkt 4.1.4 beschriebenen Nachteile des Tritium-Adenin-Test wie v.a. die hohe Zelltod-Rate in Kauf genommen, um den Effekt von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II hinsichtlich eines möglichen Signaltransduktionswegs weiter zu untersuchen.

## 4.2 Ceramid und die Proteinkinase C

### 4.2.1 PKC ζ

Eine bekannte Verbindung der beiden Signaltransduktionswege von Ceramid und der PKC besteht in der Aktivierung der atypischen PKC ζ durch Ceramid sowohl *in vitro* (Lozano *et al.*, 1994) als auch *in vivo* (Müller *et al.*, 1995). Letztere konnten zeigen, daß Ceramid in U937 Zellen in einer Konzentration von 0,5 nM zu einer bis zu vierfach erhöhten Autophosphorylierung der PKC ζ führt, wobei es spezifisch an die Kinase bindet. Ab einer Konzentration von 60 nM Ceramid werden wieder basale Aktivitätslevel erreicht.

In einem Experiment, bei dem das endogene Vorkommen verschiedener PKC-Isoformen untersucht worden ist, stellte sich jedoch heraus, daß die PKC ζ in HEK 293 ACII Zellen nicht nachzuweisen ist (s. 3.6.1.1, Tab. 3). Aus diesem Grund kann die Vermittlung der ACII-Stimulierung durch Ceramid über den zunächst als am wahrscheinlichsten angesehenen Signalweg der atypischen PKC ζ ausgeschlossen werden.

Mit PKC λ und ι konnten jedoch zwei andere atypische PKC-Isoformen in HEK 293 ACII Zellen nachgewiesen werden (s. 3.6.1.1, Tab. 3). Beides sind stark homologe Proteine, die unabhängig voneinander in Maus und Mensch identifiziert wurden und nicht mehr länger als unterschiedliche Isoformen bezeichnet werden (PKC λ/ι) (Akimoto *et al.*, 1996; Newton, 1995). Daß die murine PKC λ in HEK 293 ACII Zellen detektiert werden konnte, muß auf mangelnde Spezifität des Antikörpers zurückzuführen sein.

Die Aktivierung klassischer und neuer PKC-Isoformen führt im Allgemeinen zu deren Translokation vom Cytosol an die Membran. Nach Aktivierung der in HEK 293 ACII Zellen detektierten atypischen Subform  $\lambda/\iota$  mit Ceramid transloziert diese jedoch in umgekehrter Folge von der Membran ins Cytosol (s. 3.6.1.2, Abb. 21). Diese Beobachtung steht allerdings im Einklang mit ähnlichen Effekten anderer Arbeitsgruppen. Laut Sawai *et al.* (1997) führt die Stimulation von HL-60 Zellen, einer humanen Leukämie Zelllinie, mit N-Acetyl-Sphingosin (zellpermeables, synthetisches C<sub>2</sub>-Ceramid) zur Translokation der neuen PKCs  $\epsilon$  und  $\delta$  von der Membran ins Cytosol. Einen ähnlichen Effekt konnten Galve-Roperh *et al.* (1997) für die atypische PKC  $\zeta$  in Astrocyten mit C<sub>8</sub>-Ceramid beobachten. In beiden Fällen wird diese Translokation auch durch Zugabe von exogener Sphingomyelinase ausgelöst. Es wird vermutet, daß die Translokation der PKC-Isoformen ins Cytosol mit einer möglichen Beteiligung an der Ceramid-vermittelten Apoptose in Zusammenhang steht. Da durch Ceramid induzierte Apoptose in HEK 293 ACII Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde diese Fragestellung für die PKC  $\lambda/\iota$  im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

#### **4.2.2 Getrennte, aber gleichgerichtete Signalwege von Ceramid und Proteinkinase C**

Die PKC-Familie der Serin-/Threoninkinasen ist in die Signaltransduktion einer Vielzahl von biologischen Effekten involviert. Wie durch Phorbolster-vermittelte Aktivierung der PKC gezeigt werden konnte, beinhalten diese Effekte die zelluläre Transformation, Proliferation und Differenzierung sowie die Resistenz gegenüber Apoptose (Blobe *et al.*, 1994; Dekker & Parker, 1994). Die Behandlung der Zellen mit Phorbolestern schützt sie vor Apoptose, die sowohl durch TNF- $\alpha$  (Obeid *et al.*, 1993; Jarvis *et al.*, 1994a) und Chemotherapie (Grant *et al.*, 1992) als auch durch Entzug von Wachstumsfaktoren (Lotem *et al.*, 1991) oder Irradiation (Haimovitz-Friedman, 1994) ausgelöst werden kann. Die Inaktivierung der Proteinkinase C mit Hilfe spezifischer Inhibitoren dagegen kann den direkten Zelltod auslösen (Jarvis *et al.*, 1994b; McConkey *et al.*, 1989; Chmura *et al.*, 1996).

Andererseits konnte auch gezeigt werden, daß Phorbolster, im Gegensatz zu dem sonst beobachteten gegensätzlichen Einfluß von Ceramid und PKC auf Apoptose, in einigen Zelllinien in der Lage sind, über die Aktivierung der PKC Apoptose zu induzieren (Young *et al.*, 1994; Day *et al.*, 1994; Kizaki *et al.*, 1989; de Vente *et al.*, 1995). Auch die in dieser Arbeit beobachtete synergistische Aktivierung der Adenylyl Cyclase Typ II durch Ceramid und TPA läßt darauf schließen, daß es sich in diesem Fall nicht um eine typische Gegenregulierung der

Signaltransduktionswege von Glycero- und Phospholipiden handelt (s. 3.6.4, Abb. 24a/b). Der synergistische Effekt liegt hier bei Faktor 2 über einer rein additiven Stimulation der AC-II mit den beiden Komponenten (in Abwesenheit weiterer Aktivatoren der AC-II wie z.B. Forskolin). Eine der Zelllinien, in der gezeigt werden konnte, daß Phorbol ester über die Aktivierung der PKC Apoptose induzieren, also eine gleichgerichtete Reaktion von TPA und Ceramid stattfindet, ist die humane Prostata-Krebs Zelllinie LNCaP. In LNCaP Zellen konnten Garzotto *et al.* (1998) beobachten, daß Phorbol ester durch die Aktivierung der Ceramidsynthase eine erhöhte Bildung endogenen Ceramids auslösen. Das Ceramid wiederum ist an apoptotischen Vorgängen in der Zelle beteiligt. Eine mögliche Beteiligung der Ceramidsynthase im Falle der Aktivierung der AC-II in HEK 293 Zellen durch TPA erscheint aber eher unwahrscheinlich, da die Bildung von Ceramid nach Aktivierung von LNCaP Zellen frühestens nach 1 h zu detektieren ist, die AC-II aber nur für 15 min dem Stimulus TPA ausgesetzt ist. Auch wäre das allein keine plausible Erklärung für den Synergismus von TPA und Ceramid. Welche PKC-Isoformen in HEK 293 ACII Zellen durch TPA aktiviert werden, kann nicht eingegrenzt werden, da Phorbol ester sowohl klassische als auch neue – nicht aber atypische – Subformen aktivieren und es daher wahrscheinlich zu einer simultanen Stimulation mehrerer Isoformen der PKC kommt.

Von Ceramid sind außer der Aktivierung der nicht TPA-stimulierbaren PKC  $\zeta$  erst einige unterschiedliche Effekte auf wenige PKC-Isoformen bekannt. Für die PKC  $\alpha$  konnte gezeigt werden, daß Ceramid in HEL-37 Zellen (murine Epidermalzellen) die Translokation der Kinase vom Cytosol an die Membran inhibiert (Jones *et al.*, 1995) bzw. sie in Molt-4 Zellen (humane Leukämiezellen) – höchstwahrscheinlich über die Beteiligung einer Proteinphosphatase – inhibiert/inaktiviert (Lee *et al.*, 1996). Im Gegenteil zur PKC  $\alpha$  beobachteten Tanabe *et al.* (1998), daß Ceramid in PMN Zellen (murine polymorphonukleäre Leukozyten) die Bindung von TPA an die PKC  $\beta$  inhibiert und schließen daraus, daß Ceramid selbst an die Bindungsstelle der PKC  $\beta$  für Phorbol ester bindet. Erstaunlicherweise geht diese Hemmung aber weder mit einer Inhibierung der PKC  $\beta$ -Aktivität noch der TPA-induzierten Translokation der PKC  $\beta$  vom Cytosol an die Membran einher, so daß die Autoren von einer direkten Aktivierung der PKC  $\beta$  durch Ceramid sprechen. Hierbei muß allerdings angemerkt werden, daß laut Lee *et al.* (1996) die PKC  $\beta_{II}$  in einem *in vitro* Kinase-Assay durch Ceramid inhibiert wird. Dieses wird durch den Einsatz unterschiedlicher Zelllinien erklärt.

Es bestand also auch in dem hier untersuchten Fall der durch Ceramid stimulierten ACII-Aktivität die Möglichkeit, daß Ceramid und TPA über dieselbe oder eine benachbarte Bindungsstelle einer PKC-Isoform wirken. In Frage kommende Kandidaten wären die in HEK

293 ACII Zellen nachgewiesenen klassischen Subformen  $\alpha$  und  $\gamma$  sowie die neuen  $\delta$ ,  $\epsilon$  und in eingeschränktem Maße auch  $\theta$ . Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu überprüfen, bestand in dem Einsatz von PKC-Inhibitoren, von denen mit Staurosporin und Bisindolylmaleimid (BIM) zwei im Hinblick auf die Ceramid-vermittelte Stimulation der ACII-Aktivität in HEK 293 ACII Zellen getestet worden sind. Der Inhibitor BIM hat dabei bis zu einer Konzentration von 1  $\mu$ M keinen nennenswerten Einfluß auf die Ceramid-stimulierte, wohl aber auf die TPA-stimulierte Aktivität der AC-II (Inhibierung auf 3 %) (s. 3.6.3, Abb. 23a/b). Daß die basale ACII-Aktivität durch 1  $\mu$ M BIM ebenfalls auf 36 % gehemmt wird, läßt darauf schließen, daß die AC-II zu einem gewissen Prozentsatz auch ohne spezielle Aktivierung der PKC phosphoryliert ist. Einen vergleichbaren Effekt konnten auch Look *et al.* (1998) in C6-Glioma-Zellen beobachten. Diese Tatsache weist eher darauf hin, daß Ceramid seinen Effekt auf die AC-II nicht über die Aktivierung einer klassischen oder neuen PKC-Isoform vermittelt. Es gibt jedoch eine Arbeit, in der gezeigt werden konnte, daß BIM in Fibroblasten den potenzierenden Effekt von Phorbolestern auf die Ethanol-induzierte, Phospholipase C-vermittelte Hydrolyse von Phosphatidylethanolamin nicht inhibiert (Kiss *et al.*, 1995), so daß das Ergebnis relativiert werden muß.

Auch der zweite getestete, universelle PKC-Inhibitor Staurosporin inhibiert die durch Ceramid ausgelöste Aktivität der AC-II nicht (s. 3.6.2, Abb. 22a/b). Die ACII-Aktivität wird im Gegenteil durch Staurosporin sogar stimuliert und zwar sowohl basal (Faktor 9) als auch Ceramid-stimuliert (Faktor 2,5). Wiesner & Dawson konnten 1996 zeigen, daß Staurosporin die Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid in verschiedenen neuronalen Zelllinien stimuliert (möglicherweise über eine spezifische 60 kDa große Kinase) und so für eine Erhöhung des endogenen Ceramidpools sorgt. Auch Pavlovic-Surjancev *et al.* (1993) konnten nachweisen, daß durch Staurosporin eine Serin-/Threonin-Kinase aktiviert wird. Seit diesem Zeitpunkt wird Staurosporin verwendet, um in einer Vielzahl von Zellen Apoptose zu induzieren (Bertrand *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1994). Diese Tatsache kann jedoch den synergistischen Effekt zwischen Ceramid und Staurosporin allein nicht erklären.

Beide Ergebnisse zusammengenommen deuten darauf hin, daß weder klassische oder neue PKC-Isoformen, noch die atypische PKC  $\zeta$  an der Übermittlung des stimulierenden Effektes von Ceramid auf die ACII-Aktivität beteiligt sind.

### 4.3 Beteiligung einer Proteinphosphatase an der Ceramid-vermittelten

#### Aktivierung der AC-II?

Da die Phosphorylierung von Proteinen eine Vielzahl von Effekten intrazellulärer Signaltransduktionswege, wie auch die Aktivierung der Adenylyl Cyclasen, vermittelt, lag hier in bezug auf Ceramid ein Schwerpunkt in jüngerer Forschung. Es wäre durchaus wahrscheinlich, wenn eine Kaskade von Phosphorylierungen und/oder Dephosphorylierungen die stimulatorischen Effekte von Ceramid in bezug auf die AC-II vermittelt, ähnlich dem Diacylglycerol (DAG), dessen Effekte in großem Ausmaß auf der Aktivierung der PKC beruhen (Hannun *et al.*, 1986).

Dobrowsky *et al.* identifizierten 1992 eine cytosolische Serin-/Threoninphosphatase als direkten Angriffspunkt von Ceramid. CAPP (Ceramid-aktivierte-Proteinphosphatase) ist den Proteinphosphatasen des Typs 2A verwandt und wird als Heterotrimer mit verschiedenen funktionellen Domänen exprimiert (Wolff *et al.*, 1994). Ein Ansteigen des Ceramid-Levels in der Zelle bewirkt die Translokation von CAPP vom Cytosol an die Membran, wo es dann zur Dephosphorylierung von geeigneten Substraten kommt. Die CAPP wird spezifisch durch Ceramid aktiviert, Sphingomyelin und Sphingosin sind in dieser Hinsicht sehr viel weniger effektiv. In dieser Arbeit wurde eine mögliche Beteiligung einer Proteinphosphatase, v.a. des Typs 2A, am stimulatorischen Effekt des Ceramids auf die Aktivität der AC-II untersucht, und zwar durch Einsatz geeigneter Inhibitoren.

Okadainsäure als Inhibitor der Proteinphosphatase 2A (Takai *et al.*, 1987; Bialojan & Takai, 1988) ist auch tatsächlich in der Lage, in Konzentrationen bis zu 50 nM die Ceramid-vermittelte ACII-Aktivierung in HEK 293 ACII Zellen partiell zu inhibieren (40 – 70 %;  $\pm$  Forskolin) (s. 3.7.1.1, Abb. 25a). Auf die basale bzw. TPA-stimulierte ACII-Aktivität hat Okadainsäure in den eingesetzten Konzentrationen dagegen keinen Effekt (s. 3.7.1.1, Abb. 25b). In HL-60 Zellen führt der Einsatz von 100 nM Okadainsäure *in vivo* durch Inhibition einer Proteinphosphatase zu einer maximalen Stimulation der IL-8-Produktion (Sonoda *et al.*, 1997). Dieser Effekt kann durch Einsatz des PKC-Inhibitors Staurosporin wieder komplett aufgehoben werden, was darauf hindeutet, daß eine bestimmte basale Grundphosphorylierung Voraussetzung für den Effekt der Okadainsäure ist. Prinetti *et al.* (1997) konnten zeigen, daß Okadainsäure *in vivo* die Ceramid-vermittelte Differenzierung von Neuro2a Zellen (Neuroblastomazellen) inhibiert und daher die Beteiligung einer PP2A wahrscheinlich erscheinen läßt. Das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis läßt darauf schließen, daß eine Proteinphosphatase des Typs 2A an der hier untersuchten Reaktion zumindest teilweise beteiligt ist. Dabei wäre folgendes Modell denkbar: Ceramid



aktiviert direkt oder indirekt eine Proteinphosphatase des Typs 2A, die wiederum direkt durch Dephosphorylierung der AC-II oder indirekt durch Dephosphorylierung eines/einer am Signalweg beteiligten Proteins/Proteinkinase zur Aktivierung der AC-II beiträgt. (Im Fall einer Proteinkinase kann diese jedoch nicht vom Typ klassischer oder neuer PKCs sein, da Staurosporin und BIM keinen inhibierenden Einfluß auf die Ceramid-vermittelte ACII-Aktivität hatten.). Die Wirkung der Proteinphosphatase wird durch den Einsatz von Okadainsäure partiell wieder aufgehoben.

Eine Dephosphorylierung der Adenylyl Cyclase Typ II, die zu ihrer Aktivierung führt, ist in der Literatur nicht bekannt. Böhl *et al.* (1997a) konnten zeigen, daß die Stimulation der AC-II durch die PKC über eine Phosphorylierung des C-terminalen Endes stattfindet. Durch Mutagenese der AC-II, bei der Threonin 1057 durch Alanin substituiert wurde, konnte eine Mutante (AC-IIT1057A) hergestellt werden, die sich in wesentlich schwächerem Ausmaß durch die PKC stimulieren läßt (Böhl *et al.*, 1997b). Um die Vermutung einer möglichen Dephosphorylierung der AC-II durch Stimulation mit Ceramid zu untersuchen, wurden HEK 293 ACII Zellen mit [<sup>32</sup>P]-o-Phosphat markiert, wodurch sich in der Zelle [<sup>32</sup>P]-ATP bildet. Anschließend wurde der Einbau von radioaktivem Phosphat in die AC-II nach Stimulation mit Ceramid im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt. Die spezifische Aktivität des ATP's der mit Ceramid behandelten Zellen war um ca. 30 % erniedrigt (s. 3.9.1, Tab. 4). Dieses ist möglicherweise auf eine aus der Zellschädigung resultierende Beeinträchtigung des ATP-regenerierenden Systems zurückzuführen. Die Berechnung der Stöchiometrie der Phosphatmarkierung führte zu dem Ergebnis, daß der Einbau von Phosphat in die mit Ceramid stimulierte AC-II mit 2,12 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II um den Faktor 2,1 über dem in Kontrollzellen (1,02 mol [<sup>32</sup>P]/mol AC-II) liegt (s. 3.9.2, Tab. 5), was auf eine Phosphorylierung der AC-II durch Ceramid-Stimulation hindeutet. Dies widerlegt die Vermutung, die möglicherweise durch Ceramid aktivierte Proteinphosphatase könne zu einer direkten Dephosphorylierung der AC-II führen. Allerdings kann durch den Einsatz von 50 nM Okadainsäure der durch Ceramid stimulierte Einbau von radioaktivem Phosphat nur zu 14 % wieder aufgehoben werden (im Gegensatz zu 40-70 % der ACII-Aktivität). Diese Diskrepanz könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß die Beteiligung einer Proteinphosphatase nur eine Bedingung für die Aktivierung der AC-II durch Ceramid darstellt. Durch Ceramid könnte eventuell gleichzeitig eine Kinase aktiviert werden und erst beide (getrennte) Effekte zusammengenommen würden dann die Aktivitätserhöhung der AC-II auslösen. Es muß jedoch bedacht werden, daß dieses Experiment statistisch nicht ausreichend abgesichert ist, um die anderen Daten zu widerlegen.

Der Einbau von 1,02 mol [ $^{32}\text{P}$ ]/mol AC-II in Kontrollzellen erscheint etwas hoch (0,4-0,6 mol [ $^{32}\text{P}$ ]/mol C, Simmoteit, 1990, Promotion), läßt sich jedoch eventuell zum Teil mit einer Stimulation durch Ethanol erklären, die in der angewendeten Konzentration von 1 % final immerhin zu einer Aktivierung der AC-II um den Faktor 2,4 führt. Außerdem hat Simmoteit (1990) die Phosphatmarkierung in Thrombozyten, in denen ein Gemisch aus AC-Isomen vorliegt, bestimmt, von denen nicht alle phosphoryliert werden.

Zur Kontrolle wurde der Phosphateinbau in die mit TPA aktivierte Adenylyl Cyclase Typ II bestimmt, wobei sich ein Wert von 1,67 mol [ $^{32}\text{P}$ ]/mol AC-II ergibt. Dieses Ergebnis liegt in dem von Bül *et al.* (1997a) ermittelten Bereich von  $1,6\pm 0,2$  mol [ $^{32}\text{P}$ ]/mol AC-II.

Zur weiteren Eingrenzung der möglicherweise beteiligten Proteinphosphatase wurden weitere Inhibitoren getestet. Die Vermutung, daß CAPP an der Vermittlung des Effekts von Ceramid auf die AC-II beteiligt sein könnte, wurde durch den Einsatz von Calyculin A verifiziert (s. 3.7.1.2, Abb. 27a/b). Calyculin A ist ein sehr potenter Inhibitor sowohl der PP2A als auch der PP1, der ebenfalls in der Lage ist, die basale (nur Ceramid-stimulierte) und auch die zusätzlich mit Forskolin stimulierte ACII-Aktivität zu inhibieren (auf 41 % bzw. 26 %).

Dagegen hat Cyclosporin A als Inhibitor der Proteinphosphatase 2B (Calcineurin) in spezifischen Konzentrationen keinen nennenswerten Einfluß auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität (s. 3.7.2, Abb. 28). Hier ist eine nur für die Isoform AC-IX beobachtete Hemmung durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-stimulierbare PP2B bekannt (Paterson *et al.*, 1995). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, daß die AC-IX durch eine bislang unbekannte Proteinkinase aktiviert wird, deren Wirkung in spezifischer Art und Weise durch Calcineurin rückgängig gemacht wird (Antoni *et al.*, 1995). Ebenfalls keine inhibierende Wirkung in spezifischen Konzentrationen auf die Ceramid-stimulierte ACII-Aktivität hat auch Na-*o*-Vanadat als Inhibitor der Tyrosinphosphatasen (s. 3.7.3, Abb. 29). Die Wirkung von Na-*o*-Vanadat scheint allerdings nur die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II leicht zu inhibieren (Aktivitätserniedrigung um 28 %, 100  $\mu\text{M}$  Na-*o*-Vanadat), die zusätzlich mit Forskolin stimulierte Aktivität dagegen schwach zu aktivieren (Aktivitätserhöhung auf 142 %, 100  $\mu\text{M}$  Na-*o*-Vanadat). Daraus läßt sich keine eindeutige Aussage ableiten; sollte eine Tyrosinphosphatase am untersuchten Effekt beteiligt sein, so erscheint ihr Anteil gering, im Gegensatz zu der Möglichkeit, daß eine Proteinphosphatase des Typs 2A beteiligt ist. Aufgrund der Befunde in der Literatur (Dobrowsky *et al.*, 1992) könnte es sich hier höchstwahrscheinlich um die CAPP handeln, für die nachgewiesen ist, daß sie durch Ceramid aktivierbar ist.

Die Adenylyl Cyclase Typ V wird u.a. über eine negative Rückkopplung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) gehemmt (Iwami *et al.*, 1995). Durch den Einsatz des PKA-

Inhibitors H-89 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß dies auch für die AC-II zutrifft (s. 3.8.2, Abb. 31). Die TPA-stimulierte ACII-Aktivität wird durch den Einsatz von 5  $\mu$ M H-89 um den Faktor 1,9 erhöht. Die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II wird ebenfalls um den Faktor 1,8 erhöht, was darauf schließen läßt, daß in beiden Fällen eine negative Rückkopplung durch die PKA zum Absinken der ACII-Aktivität führt, die durch die Gabe von H-89 aufgehoben werden kann.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so läßt sich sagen, daß an der Vermittlung des stimulatorischen Effektes von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase II höchstwahrscheinlich eine Proteinphosphatase des Typs 2A beteiligt ist, diese aber nicht direkt die AC-II dephosphoryliert. Die Stimulation der AC-II mit Ceramid führt zu einem verstärkten Einbau von (radioaktivem) Phosphat, wobei diese Phosphorylierung wohl über eine nicht näher definierte/bekanntere Proteinkinase abläuft.

#### **4.4 Aktivierung der AC-II durch langkettige Fettsäuren und Fettsäureamide**

Die Beobachtung, daß Dihydroceramide nicht wie bei anderen Ceramid-ausgelösten Effekten als Negativ-Kontrolle fungieren, sondern in ähnlicher Art und Weise zur Stimulation der Adenylyl Cyclase führen, läßt die Frage aufkommen, inwieweit überhaupt ein Sphingosin-Derivat zur Aktivierung der AC-II notwendig ist. Von ungesättigten Fettsäuren wie Arachidon- oder Oleinsäure ist z.B. bekannt, daß sie die PKC aktivieren (McPhail *et al.*, 1984; Murakami & Routtenberg, 1985; Nihikawa *et al.*, 1988; Sekiguchi *et al.*, 1987; Sekiguchi *et al.*, 1988; Naor *et al.*, 1988; Shearman *et al.*, 1989; Buday & Faragaó, 1990). Später konnte sogar eine synergistische Wirkung von DAG und ungesättigten Fettsäuren gezeigt werden (Verkest *et al.*, 1988; Seifert *et al.*, 1988; El Touny *et al.*, 1990; Shearman *et al.*, 1991), so daß eine mögliche Rolle dieser Moleküle als „Second-Messenger“ postuliert wurde. Es ist dabei jedoch zu beachten, daß die Ergebnisse insgesamt betrachtet alle relativ inkonsistent sind, was möglicherweise auf die hohe Anzahl unterschiedlicher PKC-Isoformen sowie deren Substrate zurückzuführen ist. Ebenso besitzen langkettige Fettsäureamide physiologische Aktivität. Sie spielen z.B. eine Rolle als Schlaf-induzierende Agentien (Oleamid, Cravatt *et al.*, 1995) oder als endogene Liganden von Cannabinoid-Rezeptoren (Anandamid, Devane *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu gelten langkettige gesättigte Fettsäuren nicht als physiologisch aktiv.

Aus den oben aufgeführten Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch langkettige Fettsäuren (C<sub>16</sub>-Palmitinsäure [gesättigt], C<sub>24</sub>-Nervonsäure [einfach-*cis*-ungesättigt]) sowie ein Fettsäureamid (C<sub>16</sub>- Palmitinamid) auf ihr stimulatorisches Potential hinsichtlich der Aktivierung der Adenylyl Cyclase Typ 2 untersucht (s. 3.5, Abb. 19/20). Auch diese Agentien sind in der Lage, die ACII-Aktivität zu erhöhen. Im Allgemeinen liegt die Aktivität der AC-II in diesen Fällen etwas niedriger, es gab jedoch auch Experimente, wo die Aktivitäten von Ceramiden und Fettsäuren bzw. Fettsäureamide annähernd gleich waren. Grundsätzlich scheint die Höhe der Aktivität der AC-II eher von der Kettenlänge der eingesetzten Agentien abzuhängen, auch wenn sich C<sub>16</sub>-Ceramid schon bei niedrigeren Konzentration potent zeigt (2,5 µM), wohingegen erste meßbare Effekte nach Stimulation mit dem Fettsäureamid bzw. der Fettsäure gleicher Kettenlänge erst ab 5 µM und signifikante Effekte erst ab 20 µM auftreten (s. 3.5, Abb. 20). Ein weiterer Unterschied zur Stimulation mit Ceramiden läßt sich bei gleichzeitiger Aktivierung der AC-II durch Forskolin beobachten (s. 3.5, Abb. 19). Hier zeigt sich nämlich im Vergleich zur basalen (nur mit Palmitinsäure / -amid stimulierten) Aktivität kein signifikanter Unterschied. Diese Beobachtung gilt jedoch für Nervonsäure nur in abgeschwächtem Maße. Und der hieraus resultierenden Vermutung, daß möglicherweise doch getrennte „Signaling“-Wege von Ceramid und langkettigen Fettsäuren sowie Fettsäureamiden im Hinblick auf die Aktivierung der AC-II vorliegen, widersprechen die folgenden Ergebnisse: Sowohl die partielle Hemmung der ACII-Aktivität durch Gabe des PP2A-Inhibitors Okadainsäure und die synergistische Stimulation mit dem Phorbolster TPA sowie dem PKC-Inhibitor Staurosporin als auch die negative Reaktion (keine Hemmung) des PKC Inhibitors Bisindolylmaleimid, die bei gleichzeitiger Stimulation mit Ceramid im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, werden hinsichtlich der simultanen Stimulation mit Palmitin-/Nervonsäure sowie Palmitinamid beobachtet. Diese Effekte zusammengenommen deuten auf einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg von Ceramiden und langkettigen Fettsäuren sowie Fettsäureamiden in bezug auf die Stimulation der Adenylyl Cyclase II hin.

Eine mögliche Erklärung für das Zusammentreffen beider Wege wäre z.B. der Einbau der langkettigen Fettsäuren in endogenes Ceramid im Rahmen der Ceramid-Synthese. Die saure Ceramidase ist in der Lage, aus freien Fettsäuren und Sphingol Ceramid zu synthetisieren, diese Reaktion wird sogar im Rahmen eines Tests eingesetzt (Yavin & Gatt, 1969). Okabe *et al.* (1977) konnten zeigen, daß die saure Ceramidase in einer Art Recyclingprozeß neue Fettsäuren mit Sphingol zusammenführt, ohne das Sphingol für andere Reaktionen freizusetzen.

Für langkettige Fettsäuren sind weitere physiologische Aktivitäten bekannt. Arachidonsäure und Oleinsäure stimulieren die dosisabhängige Bildung von „Lipid-Bodies“ über einen Zeitraum von

0,5–1 h (Weller *et al.*, 1991). Diese „Lipid-Bodies“ sind nicht-membrangebundene, cytoplasmatische Einschlüsse, die als Quelle für z.B. verestertes Arachidonat dienen und vermehrt in Zellen, in denen eine Entzündungsreaktion abläuft, vorkommen (Galli *et al.*, 1985, Willingham & Pastan, 1985, Weller & Dvorak, 1985, Weller *et al.*, 1989). Die Bildung und Funktion der „Lipid-Bodies“ ist in den meisten Zelltypen weitgehend unbekannt. Weller *et al.* (1991) konnten jedoch in humanen polymorphonukleären Leukozyten (PMN) zeigen, daß die Bildung durch Aktivierung der PKC vermittelt wird und vorzugsweise durch *cis*-ungesättigte Fettsäuren, die in der Lage sind, die PKC zu aktivieren (Dell & Severson, 1989, McPhail *et al.*, 1984, Murakami *et al.*, 1986), sowie durch andere PKC-Aktivatoren (Castagna *et al.*, 1982, Fujita *et al.*, 1984, O’Flaherty *et al.*, 1984) ausgelöst werden kann. Ein Zusammenhang mit dem hier untersuchten Effekt ist jedoch eher unwahrscheinlich, da die Beteiligung einer Proteinkinase C nahezu auszuschließen ist (s. 3.6).

Eine interessante Beobachtung wurde 1996 von Glick *et al.* gemacht. Sie konnten zeigen, daß Arachidonat und verwandte ungesättigte Fettsäuren die Bindung von GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit von  $G_z$  unterdrücken und so zur Inaktivierung von  $G_{z\alpha}$  führen ( $G_{z\alpha}$  inhibiert die AC-Isoformen I und V). In früheren Studien wurde ebenfalls nachgewiesen, daß die Behandlung von Platelets mit hohen Konzentrationen an exogen zugeführtem Arachidonat zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP’s führt (Linder & Goodman, 1982, Kowalska *et al.*, 1988). In HeLa-Zellen, die den 5HT<sub>7</sub>-Rezeptor exprimieren, stimuliert Oleamid, das primäre Amid der Oleinsäure, die cAMP-Akkumulation (Thomas *et al.*, 1997). Alle diese Beobachtungen zeigen verschiedene potentielle Mechanismen auf, in denen langkettige Fettsäuren oder Fettsäureamide in das cAMP-„Signaling“ involviert sind. Dieses läßt auch für den hier untersuchten stimulatorischen Effekt von Ceramid und langkettigen Fettsäuren sowie Fettsäureamiden einen physiologischen Effekt als möglich erscheinen. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Effekte hier durch gesättigte Varianten ausgelöst wurden, die als physiologisch nicht aktiv gelten. Andererseits wiederum ahmen Palmitat und Myristat als gesättigte Fettsäuren selektiv den verstärkten Effekt von Glucose auf die Insulinfreisetzung in Abwesenheit von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  nach (Komatsu & Sharg, 1998).

## **4.5 Beteiligung neu synthetisierter Proteine an der Ceramid-vermittelten**

### **Aktivierung der AC-II?**

Die physiologisch gesehen lange Stimulationsdauer des Ceramids (erste Effekte nach 1 h, maximale Aktivierung nach 8 h) ließen vermuten, daß ein Teil der Aktivierung der AC-II auf

eine *de novo* Synthese von Proteinen zurückzuführen ist. Cycloheximid, ein üblicherweise zur Hemmung der Translation eingesetztes Antibiotikum (Chow *et al.*, 1995), führt zu einer partiellen Inhibierung des untersuchten Effektes (Hemmung auf 76 % mit 10 µg/ml CHX), somit kann eine Beteiligung neu synthetisierter Proteine nicht ausgeschlossen werden.

## 4.6 Ausblick

Die weitere Untersuchung der hier erhobenen Daten wäre am besten in einem neu entwickelten Testsystem möglich, in dem die Zellvitalität durch die Stimulierung mit exogenem Ceramid weniger stark negativ beeinflusst werden würde. Dies könnte z.B. eine andere Zelllinie sein, in der verschiedene Isoformen der Adenylyl Cyclase stabil überexprimiert werden würden. Es wäre dann auch denkbar, einen Weg zu finden, den endogenen Ceramid-Spiegel so zu erhöhen, daß die Aktivität der AC-II meßbar ansteigt, ohne daß die Zellen gleichzeitig so stark geschädigt werden. Hier konnte z.B. in p388, HL-60 und U937 Zellen gezeigt werden, daß Daunorubicin die Ceramid-Bildung über die Aktivierung der Ceramidsynthase über eine Dauer von mehreren Stunden stimuliert (Bose *et al.*, 1995, Boland *et al.*, 1997). Auch die Suche nach einem Permeabilisierungsreagenz, das keine inhibierende Wirkung auf die Aktivität der Adenylyl Cyclasen ausübt (wie z.B. Saponin), wäre eine weitere Möglichkeit, ein verbessertes Testsystem aufzubauen. Grundsätzlich wäre es wünschenswert, verschiedene Testsysteme zur Verifizierung und weiteren Untersuchung des Effekts zur Verfügung zu haben.

Darauf aufbauend könnte es zur Untersuchung offengebliebener Fragen hinsichtlich des Signaltransduktionswegs der Aktivierung der Adenylyl Cyclase des Typs II durch Ceramid kommen. Folgende interessante Fragen bleiben zu klären: 1) Wo und in welchem Maße ist eine Proteinphosphatase des Typs 2A bei der Signalübertragung beteiligt? 2) Wird Ceramid in der Zelle metabolisiert und wenn ja, in welches Derivat, das den stimulierenden Effekt auf die cAMP-Bildung übermitteln könnte, wird Ceramid überführt? 3) Wirken Ceramid und Forskolin über benachbarte oder ineinanderübergreifende Aktivierungsstellen an der AC-II? 4) Wo liegen die Schnittstellen der beiden Signaltransduktionswege von Glycerophospho- und Phosphosphingolipiden? 5) Ist eventuell ein an die AC-II assoziiert vorliegender niedermolekularer Metabolit bzw. ein Protein beteiligt, das im Laufe des Ceramid-aktivierten-Signalwegs durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an der Aktivierung der AC-II beteiligt sein könnte? Letztere könnte beim Lysieren der Zellen zur Membranpräparation durch die starke Verdünnung (1:100) von der AC-II abdiffundieren, was den Verlust der Ceramid-

stimulierbaren ACII-Aktivität an Membranen erklären könnte. Zur Identifizierung einer möglichen Protein-Komponente könnte während der Permeabilisierung der Zellen ein Vernetzer von Proteinen eingesetzt werden.

Ein interessanter Ansatz wäre auch der Einsatz des Gegenspielers von Ceramid, des Sphingosin-1-Phosphats (SPP). Van Koppen *et al.* (1996) konnten zeigen, daß SPP in HEK 293 Zellen einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert, der vorwiegend an PTX-sensitive  $G_i$ -Proteine bindet. Darüber kommt es zur Inhibierung der Forskolin-stimulierten cAMP-Bildung in diesen Zellen.  $G_{i\alpha}$  ist in der Lage, die AC-Isotypen I, V und VI, nicht aber die AC-II zu inhibieren. Weitere Untersuchungen könnten sich also mit der AC-I und der AC-V beschäftigen. Für die AC-II käme dieses Modell nicht in Frage, da sie nicht durch G-Proteine inhibierbar ist und auch sonst kein direkter Inhibitor dieser Isoform bekannt ist.

## 5 Zusammenfassung

Adenylyl Cyclasen höherer Organismen werden u.a. durch Phosphorylierung verschiedener Kinasen wie den Proteinkinasen C und A reguliert. Der in jüngerer Zeit entdeckte „Lipid-Second-Messenger“ Ceramid stimuliert verschiedene Effektorsysteme, u.a. konnte ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels gezeigt werden. Als direkte Zielproteine von Ceramid sind bisher eine Prolin-„directed“ Proteinkinase (CAP Kinase), eine Serin/Threonin Proteinphosphatase (CAP Phosphatase) und die Proteinkinase C  $\zeta$  bekannt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Etablierung eines Testsystems und Untersuchung eines möglichen Signalweges bei der Wirkung von Ceramid auf die Adenylyl Cyclase Typ II erbrachten folgende Resultate:

Stabil in HEK 293 Zellen exprimierte Adenylyl Cyclase Typ II (AC-II) zeigte nach Stimulation mit exogen zugeführtem Ceramid eine über 100fach erhöhte Aktivität (Maximum nach 8 h). Dieser stimulatorische Effekt war von der Kettenlänge des Ceramids abhängig. Das Gemisch natürlicher Ceramide ( $C_{18/24}$ ) löste die stärkste Aktivierung der AC-II aus, wohingegen kurzkettige Ceramide ( $C_2$ ) nahezu ohne Effekt waren. Ebenso wurde die ACII-Aktivität auch durch langkettige Fettsäuren sowie Fettsäureamide stimuliert. Entgegen der Erwartung zeigten Dihydro-Ceramide, die u.a. als Negativkontrollen bezüglich Ceramid-vermittelter Effekte eingesetzt werden, einen nur wenig geringeren Effekt als ihre ungesättigten Gegenstücke (60-80 % der Aktivität). Zusätzlich zur AC-II wurden ebenfalls die Isoformen I und V, wenn auch in wesentlich geringerem Maße, durch Ceramid stimuliert.

Die Aktivierung der AC-II konnte ebenfalls durch Anhebung des endogenen Ceramid-Spiegels erreicht werden, zum einen durch Zugabe von Sphingomyelinase zum Kulturmedium (7,4fache Stimulation gegenüber Kontrollzellen), zum anderen durch Einsatz des Ceramidase-Inhibitors D-e-MAPP (2,7fache Stimulation).

Der Phorbolster TPA führte mit Ceramid zu einer synergistischen Aktivierung der AC-II. Der PKC-Inhibitor BIM hatte auf die Ceramid-vermittelte Erhöhung der ACII-Aktivität keinen Einfluß, wohingegen durch Staurosporin, ebenfalls ein Inhibitor der Proteinkinase C, die Ceramid-stimulierte Aktivität der AC-II weiter potenziert wurde. Diese Ergebnisse lassen die Beteiligung klassischer oder neuer PKC's an der Übermittlung des stimulierenden Effektes von Ceramid auf die AC-II eher unwahrscheinlich erscheinen.

Die Ceramid-vermittelte Aktivierung der AC-II konnte durch Okadainsäure (Inhibitor der Proteinphosphatase 2A) partiell inhibiert werden (40 – 70 %), was darauf schließen läßt, daß eine PP2A an der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Reaktion zumindest teilweise beteiligt



ist. Durch Einsatz geeigneter *Inhibitoren* konnte die Beteiligung einer Proteinphosphatase 2B (*Cyclosporin A*) bzw. einer Tyrosinphosphatase (*Na-o-Vanadat*) weitgehend ausgeschlossen werden.

## 6 Abkürzungen

AC	Adenylyl Cyclase
$\alpha_{\text{gust}}$	$\alpha$ -Untereinheit des Gustducins
$\alpha_t$	$\alpha$ -Untereinheit des Transducins
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ASM	‚air smooth muscle‘
BBC	‚Bovine brain cortex‘
$\beta$ -gal	$\beta$ -Galaktosidase
BIM	Bisindolylmaleimid
BSA	Rinderserumalbumin (‚bovine serum albumin‘)
c	Zellen
CaM	Calmodulin
CAPK	Ceramid-aktivierte Proteinkinase
CAPP	Ceramid-aktivierte Protein Phosphatase
CD 28	‚cluster designation 28‘
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase (‚calf intestinal phosphatase‘)
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freies PBS
cpm	Zählwerte pro Minute (‚counts per minute‘)
CRD	Cystein-reiche Domäne
CRE	‚cAMP responsive element‘
CREB	CRE-bindendes Protein
CSA	Cyclosporin A
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetan-3,2‘-(5‘-chlor)tricyclo (3.3.1.13,7)decan)-4-yl)phenylphosphat
d	desoxy
DAG	Diacylglycerin
DEAE	Dethylaminoethyl
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DOSPER	1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propyl-amid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAK	‚p125 focal adhesion kinase‘
FCS	fötales Kälberserum (‚fetal calf serum‘)
$G_\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins
$G_{\beta\gamma}$	$\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins
$G_i$	inhibitorisches G-Protein der Adenylyl Cyclase
$G_s$	stimulatorisches G-Protein der Adenylyl Cyclase
G-Protein	Guanylnucleotid-bindendes Protein
GTPase	Guanosin-5‘-Triphosphatase
$^3\text{H}$	Tritium
H-89	N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isochinolinsulfonamid

HEK	‚Human embryonal kidney‘
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N‘-2-ethansulfonsäure
HIV	‚human immunodeficiency virus‘
HPLC	‚high-performance liquid chromatography‘
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICE	‚Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme‘
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin-1
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
kb	Kilobasen
LPC	L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	‚Minimum essential medium‘
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NGF	‚nerve growth factor‘
O.A.	‚Okadaic acid‘
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PA	Phosphatidsäure
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	‚phosphate buffered saline‘
PDE	Phosphodiesterase
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNpp	Paranitrophenylphosphat
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PP2B	Protein Phosphatase 2B
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rb	Retinoblastoma-Genprodukt
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (‚rotation per minute‘)
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	Sphingomyelin
s.o.	siehe oben
SPP	Sphingosin-1-Phosphat

STI	Sojabohnen Trypsin Inhibitor
TCA	Trichloressigsäure (,Trichloroacetic acid‘)
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta_1$	,transforming growth factor $\beta_1$ ‘
TLCK	,N- $\alpha$ -Tosyl(lysin)chloromethylketon
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TPCK	N- $\alpha$ -Tosyl(phenylalanin)chloromethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit für Enzymaktivität (,unit‘)
x-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

## 7 Literaturverzeichnis

**Akimoto, K.**, Takahashi, R., Moriya, S., Nishioka, N., Takayanagi, J., Rimura, K., Fukui, Y., Osada, S-i., Mizuno, K., Hirai, S-i., Kazlauskas, A. and Ohno, S.

**EMBO J.** 15 (1996) 788-798

EGF or PDGF receptors activate atypical PKC  $\lambda$  through phosphatidylinositol 3-kinase

**Antoni, F.A.**, Barnard, R.J.O., Shipston, M.J., Smith, S.M., Simpson, J. and Paterson, J.M.

**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 28055-28061

Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation

**Arends, J.J.**, Morris, R.G. and Wyllie, H.A.

**Am. J. Pathol.** 136 (1990) 593-608

Apoptosis. The role of the endonuclease

**Ausubel, M.**, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.K., Smith, J.A. and Struhl, K.

**Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York (1987)**

Current Protocols in molecular biology

**Avidor-Reiss, T.**, Bayewitch, M., Levy, R., Matus-Leibovitch, N., Nevo, I. and Vogel, Z.

**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 29732-29738

Adenylylcyclase supersensitization in mu-opioid receptor-transfected chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment

**Ballou, L.R.**, Laulederkind, S.J.F., Rosloniec, E.F. and Raghow, R

**Biochim. Biophys. Acta** 1301 (1996) 273-287

Ceramide signalling and the immune response

**Barnholz, Y.**, Roitman, A. and Gatt, S.

**J. Biol. Chem.** 241 (1966) 3731

Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. II. Hydrolysis of sphingomyelin by an enzyme from rat brain

**Becker, H.G.O.**, Domschke, D., Fanghänel, E., Fischer, M., Gewalt, K., Mayer, R., Pavel, D., Schmidt, H. and Schwetlick, K

**Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1990)**

Organikum

**Bernardo, K.**, Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R.J., Ferlinz, K., Schuchman, E.H. and Sandhoff, K.

**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 11098-11102

Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase

**Berridge, M.J.**

**Ann. NY Acad. Sci.** 766 (1995) 31-43

Inositol trisphosphate and calcium signaling

- Bertolaso, L.,** Gibellini, D., Secchiero, P., Previati, M., Falgione, D., Visani, G., Rizzoli, R., Capitani, S. and Zauli, G.  
**Br. J. Haematol.** 100 (1998) 541-549  
Accumulation of catalytically active PKC-zeta into the nucleus of HL-60 cell line plays a key role in the induction of granulocytic differentiation mediated by all-trans retinoic acid
- Bertrand, R.,** Solary, E., O'Conner, P., Kohn, K.W. and Pommier, Y.  
**Exp. Cell Res.** 211 (1994) 314-321  
Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine
- Bialojan, C.** and Takai, A.  
**Biochem. J.** 256 (1988) 283-290  
Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics
- Bielawska, A.,** Crane, H.M., Liotta, D., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** 268 (1993) 26226-26232  
Selectivity of ceramide-mediated biology
- Bielawska, A.,** Greenberg, M.S., Pery, D., Jayadev, S., Shayman, J.A., McKay, C. and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** 271 (1996) 12646-12654  
(1*S*,2*R*)-*D*-erythro-2-(*N*-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase
- Bishop, W.R.** and Bell, R.M.  
**Oncogene Res.** 2 (1988) 205-218  
Functions of diacylglycerol in glycerolipid metabolism, signal transduction and cellular transformation
- Blobe, G.C.,** Obeid, L.M. and Hannun, L.A.  
**Cancer Metastasis Rev.** 13 (1994) 411-431  
Regulation of protein kinase C and role in cancer biology
- Böl, G.-F.,** Hülster, A. and Pfeuffer, T.  
**Biochem. Biophys. Acta** 1358 (1997a) 307-313  
Adenylyl cyclase type II is stimulated by PKC via C-terminal phosphorylation
- Böl, G.-F.,** Gros, C., Hülster, A., Bösel, A. and Pfeuffer, T.  
**Biochem. Biophys. Res. Com.** 237 (1997b) 251-256  
Phorbol ester induced sensitisation of adenylyl cyclase type II is related to phosphorylation of threonine 1057
- Boland, M.,** Foster, S. and O'Neill, L.  
**J. Biol. Chem.** 272 (1997) 12952-12960  
Daunorubicin activates NFκB and induces κB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells

- Borelli, E.,** Montmayeur, J.P., Foulkes, N.S. and Sassone-Corsi, P.  
**Crit. Rev. Oncog.** 3 (1992) 321-338  
Signal transduction and gene control: the cAMP pathway
- Bose, R.,** Verheij, M., Haimovitz-Friedman, A., Scotto, K., Fuks, Z. and Kolesnick, R.  
**Cell** 82 (1995) 405-414  
Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals
- Bradford, M.M.**  
**Anal. Biochem.** 72 (1976) 248-254  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
- Bronstein, I.,** Voyta, J.C., Murphy, O.J., Bresnick, L. and Kricka, L.J.  
**BioTechniques** 12 (1992) 748-753  
Improved chemiluminescent western blotting procedure
- Buday, L.** and Faragaó, A.  
**FEBS Lett.** 276 (1990) 223-226  
Dual effect of arachidonic acid on protein kinase C isoenzymes isolated from rabbit thymus cells
- Burnette, W.N.**  
**Anal. Biochem.** 112 (1981) 195-203  
Western Blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated protein A
- Cantrill, R.C.,** Patterson, P.P., Ells, G.W. and Horrobin, D.F.  
**Cancer Letters** 100 (1996) 17-21  
Exogenous gamma-linolenic acid alters hormone stimulated cyclic AMP levels in U937 cells
- Castagna, M.,** Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano., K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.  
**J. Biol. Chem.** 257 (1982) 7847-7851  
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol-esters
- Charbonneau, H.,** and Tonks, N.K.  
**Annu. Rev. Cell Biol.** 8 (1992) 463-493  
1002 protein phosphatases
- Chen, C. &** Okayama, H.  
**BioTechniques** 6 (1988) 632-638  
Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA

- Chijiwa, T.**, Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. and Hidika, H  
**J. Biol. Chem.** 265 (1990) 5267-5272  
Inhibition of Forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, *N*-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells
- Chmura, S.J.**, Nodzenski, E., Weichselbaum, R.R. and Quintans, J.  
**Cancer Res.** 56 (1996) 2711-2714  
Protein kinase C inhibition induces apoptosis and ceramide production through activation of a neutral sphingomyelinase
- Chow, S.C.**, Peters, I. and Orrenius, S.  
**Exp. Cell Res.** 216 (1995) 149-159  
Reevaluation of the role of *de novo* protein synthesis in rat thymocyte apoptosis
- Clandinin, M.T.**, Foot, M. and Robson, L.  
**Comp. Biochem. Physiol.** 76B (1983) 335-339  
Plasma membrane: can its structure and function be modulated by dietary fat?
- Clapham, D.E.** and Neer, E.J.  
**Nature** 365 (1993) 403-406  
New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling
- Comb, M.**, Birnberg, N.C., Seasholtz, A., Herbert, E. and Goodman, H.M.  
**Nature** 323 (1986) 353-356  
A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element
- Cook, H.W.**, Ridgway, N.D. and Byers, D.M.  
**Biochim. Biophys. Acta** 1390 (1998) 103-117  
Involvement of phospholipase D and protein kinase C in phorbol ester and fatty acid stimulated turnover of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in neural cells
- Cravatt, B.F.**, Prospero-Garcia, O., Siuzdak, G., Gilula, N.B., Henriksen, S.J., Boger, D.L. and Lerner, R.A.  
**Science** 268 (1995) 1506-1509  
Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep
- Daniel, V.**, Litwack, G. and Tomkins, G.M.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 70 (1973) 76-79  
Induction of cytolysis of cultured lymphoma cells by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and the isolation of resistant variants
- Day, M.L.**, Zhao, X., Wu, S., Swanson, P.E. and Humphrey, P.A.  
**Cell Growth Differ.** 5 (1994) 735-741  
Phorbol ester-induced apoptosis is accompanied by NGFI-A and c-fos activation in androgen-sensitive prostate cancer cells



- Dekker, L.** and Parker, P.  
**Trends Biochem. Sci.** 19 (1994) 73-77  
Protein kinase C – a question of specificity
- Dell, K.R.** and Severson, D.L.  
**Biochem. J.** 258 (1989) 171-175  
Effect of cis-unsaturated fatty acids on aortic protein kinase C activity
- De Simone, C.**, Cifone, M.G., Roncaioli, P., Moretti, S., Famularo, G.  
**Immunol. Today** 17 (1996) 48  
Ceramide, AIDS and long-term survivors
- Devane, W.A.**, Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. and Mechoulam, R.  
**Science** 258 (1992) 1946-1949  
Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor
- Devaux, P.F.**  
**Biochemistry** 30 (1991) 1163-1173  
Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes
- Di Francesco, D.** and Tortora, P.  
**Nature** 351 (1991) 145-147  
Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP
- Dobrowsky, R.T.** and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** 267 (1992) 5048-5051  
Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase
- Dobrowsky, R.T.** and Hannun, Y.A.  
**Adv. Lipid Res.** 25 (1993) 91-104  
Ceramide-activated protein phosphatase: partial purification and relationship to protein phosphatase 2A
- Dobrowsky, R.T.**, Kamibayashi, C., Mumby, M.C. and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** 268 (1993) 15523-15530  
Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A
- Downward, J.**  
**Cell** 83 (1995) 831-834  
KSR, a novel player in the Ras pathway
- Dubois, M.**, Croset, M., Némoy, G., Lagarde, M. and Prigent, A.F.  
**Lipids** 27 (1992) 746-754  
Modulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by dietary fats in rat heart
- El Touny, S.**, Khan, W. and Hannun, Y.  
**J. Biol. Chem.** 265 (1990) 16437-16443  
Regulation of platelet protein kinase C by oleic acid

**Exton, J.H.**

**Physiol. Rev.** 77 (1997) 303-320

Phospholipase D: Enzymology, mechanisms of regulation, and function

**Federman, A.D., Conklin, B.R., Schrader, K.A., Reed, R.R. and Bourne, H.**

**Nature** 356 (1992) 159-161

Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through G<sub>i</sub>-protein βγ subunits

**Fishbein, J.D., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Garrett, S. and Hannun, Y.A.**

**J. Biol. Chem.** 268 (1993) 9255-9261

Ceramide-mediated growth inhibition and CAPP are conserved in *Saccharomyces cerevisiae*

**Fujita, I., Irita, K., Takeshige, K. and Minakami, S.**

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 120 (1984) 318-324

Diacylglycerol, 1-oleyl-2-acetyl-glycerol, stimulates superoxide-generation from human neutrophils

**Galli, S.J., Dvorak, A.M., Peters, S.P., Schulman, E.S., MacGlashan, Jr., D.W., Isomura, T., Pyne, K., Harvey, V.S., Hammel, I., Lichtenstein, L.M. and Dvorak, H.F.**

**In Prostaglandins, leukotrienes, and lipoxins. Bailey, J.M., editors. Plenum New York.** 221-239

Lipid bodies. Widely distributed cytoplasmic structures that represent preferential nonmembrane repositories of exogenous [<sup>3</sup>H] arachidonic acid incorporated by mast cells, macrophages, and other cell types

**Galve-Roperh, I., Haro, A. and Diaz-Laviada, I.**

**FEBS Letters** 415 (1997) 271-274

Ceramide-induced translocation of protein kinase C ζ in primary cultures of astrocytes

**Gao, B. and Gilman, A.G.**

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88 (1991) 10178-10182

Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase

**Garzotto, M., White-Jones, M., Jiang, Y., Ehleiter, D., Liao, W-C., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z. and Kolesnick, R.**

**Cancer Res.** 58 (1998) 2260-2264

12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis in LNCaP cells is mediated through ceramide synthase

**Geilen, C.C., Wieprecht, M., Wieder, T. and Reutter, W.**

**FEBS Letters** 309(3) (1992) 381-384

A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, *N*-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells

**Gilman, A.G.**

**Annu. Rev. Biochem.** 56 (1987) 615-649

G-Proteins: transducer of receptor-generated signals

**Girault, J.-A.**

**Neurotransmissions** **X(3)** (1994) 1-6

Protein kinases and phosphatases

**Glick, J., Santoyo, G. and Casey, P.J.**

**J. Biol. Chem.** **271** (1996) 2949-2954

Arachidonate and related unsaturated fatty acids selectively inactivate the guanine nucleotide-binding regulatory protein, G<sub>z</sub>

**Goodemote, K.A., Mattie, M.E., Berger, A. and Spiegel, S.**

**J. Biol. Chem.** **270** (1995) 10272-10277

Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the mitogenic signalling pathways of sphingosine 1-phosphate

**Gordon, J.A.**

**Meth. Enzymol.** **201** (1991) 477-482

Use of vanadate as protein phosphotyrosine phosphatase inhibitor

**Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. and Nairn, R.**

**J. Gen. Virol.** **36** (1977) 59-72

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5

**Grant, S., Jarvis, W.D., Swerdlow, P., Turner, A., Traylor, R., Wallace, H., Lin, P., Petti, G. and Gewirtz, D.**

**Cancer Res.** **52** (1992) 6270-6278

Potential of the activity of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine by the protein kinase C activator bryostatins 1 in HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature DNA

**Gulbins, E., Coggeshall, K.M., Baier, B., Telford, D., Langlet, C., Baier-Bitterlich, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A. and Altman, A.**

**Mol. Cell Biol.** **14** (1994) 4749-4758

Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for ras by phorbol esters and diglycerides

**Hacker, B.M., Tomlinson, J.E., Wayman, G.A., Sultana, R., Chan, G., Villacres, E., Disteche, C. and Storm, D.R.**

**Genomics** **50** (1998) 97-104

Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9)

**Haimovitz-Friedman, A., Balaban, N., McLoughlin, N., Ehleiter, D., Micheali, J., Vlodaysky, I. And Fuks, Z.**

**Cancer Res.** **54** (1994) 2591-2597

Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation induced apoptosis

**Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C. and Williams, G.T.**

**Eur. J. Biochem.** **236** (1996) 1-26

Apoptosis: molecular regulation of cell death

- Hannun, Y.A.**, Loomis, C.R., Merrill, A.H. and Bell, R.M.  
**J. Biol. Chem.** 261 (1986) 12604-12609  
Sphingosine inhibition of protein kinase C and of phorbol dibutyrate binding *in vitro* and in human platelets
- Hannun, Y.A.** and Linares, C.M.  
**Biochim. Biophys. Acta** 1154 (1993) 223-236  
Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids
- Hannun, Y.A.**  
**J. Biol. Chem.** 269 (1994) 3125-3128  
The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide
- Hannun, Y.A.**  
**Science** 274 (1996) 1855-1859  
Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress
- Helmreich, E.J.M.** and Pfeuffer, T.  
**Trends Pharmacol. Sci.** 6 (1985) 438-443  
Regulation of signal transduction by  $\beta$ -adrenergic hormone receptors
- Hepler, J.R.** and Gilman, A.G.  
**Trends Biochem. Sci.** 17 (1992) 383-387  
G Proteins
- Hickman, J.A.**  
**Cancer Metastasis Rev.** 11 (1992) 121-139  
Apoptosis induced by anticancer drugs
- Hofman, P.L.** and Tabakoff, B.  
**FASEB J.** 4 (1990) 2612-2622  
Ethanol and guanine nucleotide binding proteins: A selective interaction
- Huang, H-w.**, Goldberg, E.M. and Zidovetzki, R.  
**Eur. Biophys. J.** 27 (1998) 361-366  
Ceramides perturb the structure of phosphatidylcholine bilayers and modulate the activity of phospholipase A<sub>2</sub>
- Hülster, A.**  
**Dissertation (1997)**  
Untersuchungen zur Topologie der Adenylyl Cyclase Typ I: Identifizierung der Bindungsstelle für  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine
- Huwiler, A.**, Fabbro, D., Stabel, S. and Pfeilschifter, J.  
**FEBS Letters** 300 (1992) 259-262  
Immunocharacterization of  $\delta$ - and  $\zeta$ -isoenzymes of protein kinase C in rat renal mesangial cells

- Huwiler, A., Brunner, J., Hummel, R., Ver Voordeldonk, M., Stabel, S., Van Den Bosch, H. and Pfeilschifter, J.**  
**Proc. Natl. Acad. Sci. 93 (1996) 6959-6963**  
Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase
- Iwami, G., Kawabe, J.-I., Ebina, T., Cannon, P.J., Homcy, C.J. and Ishikawa, Y.**  
**J. Biol. Chem. 270 (1995) 12481-12484**  
Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A
- Jacobowitz, O. and Iyengar, R.**  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 10630-10634**  
Phorbol ester-induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2
- Jacobson, M.D., Burne, J.F. and Raff, M.C.**  
**EMBO J. 13 (1994) 1899-1910**  
Staurosporine activates the death pathway in oligodendrocytes
- Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gewirtz, D.A. and Grant, S.**  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994a) 73-77**  
Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway
- Jarvis, W.D., Turner, A.J., Porvirk, L.F., Traylor, R.S. and Grant, S.**  
**Cancer Res. 54 (1994) 1707-1714**  
Induction of apoptotic DNA damage and cell death in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C
- Jarvis, W.D., Fornari, F.A. Jr, Browning, J.L., Gewirtz, D.A. Kolesnick, R.N. and Grant, S.**  
**J. Biol. Chem. 268 (1994c) 31685-31692**  
Attenuation of ceramide-induced apoptosis by diacylglyceride and pharmacological activators of protein kinase C in human myeloid leukemia cells
- Jarvis, W.D., Grant, S. and Kolesnick, R.N.**  
**Clin. Cancer Res. 2 (1996) 1-6**  
Ceramide and the induction of apoptosis
- Ji, L., Zhang, G., Uematsu, S., Akahori, Y. and Hirabayashi, Y.**  
**FEBS Letters 358 (1995) 211-214**  
Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide
- Jones, M.J. and Murray, A.W.**  
**J. Biol. Chem. 270 (1995) 5007-5013**  
Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C- $\alpha$  translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D
- Joseph, C.K., Byun, H.S., Bittman, R. and Kolesnick, R.**  
**J. Biol. Chem. 268 (1993) 20002-20006**  
Substrate recognition by ceramide-activated protein kinase: evidence that kinase activity is proline directed

- Jun, C-D.,** Pae, H-O., Yoo, J-C., Kwak, H-J., Park, R-K. and Chung, H-T.  
**Cellul. Immunol.** 183 (1998) 13-21  
Cyclic adenosine monophosphate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells
- Karasavvas, N.,** Erukulla, R.K., Bittman, R., Lockshin, R. and Zakeri, Z.  
**Eur. J. Biochem.** 236 (1996) 729-737  
Stereospecific induction of apoptosis in U937 cells by *N*-octanoyl-sphingosine stereoisomers and *N*-octyl-sphingosine
- Katada, T.** and Ui, M.  
**J. Biol. Chem.** 256 (1981) 8310-8317  
Islet-activating protein. A modifier of receptor-mediated regulation of rat islet adenylate cyclase
- Katada, T.** and Ui, M.  
**J. Biol. Chem.** 257 (1982) 7210-7216  
ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity
- Kateo, Y.,** Fusetani, N., Matsunaga, S. and Hashimoto, K.  
**J. Am. Chem. Soc.** 108 (1986) 2780-2781  
Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*
- Kawabe, J.,** Iwami, G., Ebina, T., Ohno, S., Katada, T., Ueda, Y., Homcy, C.J. and Ishikawa, Y.  
**J. Biol. Chem.** 269 (1994) 16554-16558  
Differential activation of adenylate cyclase by protein kinase C isoenzymes
- Keown, W.A.,** Campbell, C.R. and Kucherlapati, R.S.  
**Methods Enzymol.** 185 (1990) 527-537  
Methods for introducing DANN into mammalian cells
- Kerr, J.F.R.**  
**J. Pathol.** 105 (1971) 13-20  
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death
- Kerr, J.F.R.** and Wyllie, A.H.  
**Br. J. Cancer** 26 (1972) 239-257  
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics
- Kiss, Z.,** Phillips, H. and Anderson, W.H.  
**Biochim. Biophys. Acta** 1265 (1995) 93-95  
The bisindolylmaleimide GF 109203X, a selective inhibitor of protein kinase C, does not inhibit the potentiating effect of phorbol ester on ethanol-induced phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylethanolamine

- Kizaki, H.**, Tadakuma, T., Odaka, C., Muramatsu, J. and Ishimura, Y.  
**J. Immunol.** 143 (1989) 1790-1794  
Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters
- Kizaki, H.**, Suzuki, K., Tadakuma, T. and Ishimura, Y.  
**J. Biol. Chem.** 265 (1990) 5280-5284  
Adenosine receptor-mediated accumulation of cyclic AMP-induced T-lymphocyte death through internucleosomal DNA cleavage
- Kolesnick, R.** and Golde, D.W.  
**Cell** 77 (1994) 325-328  
The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling
- Kowalska, M.A.**, Rao, A.K. and Disa, J.  
**Biochem. J.** 253 (1988) 255-262  
High concentrations of exogenous arachidonate inhibit calcium mobilization in platelets by stimulation of adenylyl cyclase
- Krupinski, J.**, Lehman, T.C., Frankenfield, C.D., Zwaagstra, J.C. and Watson, P.A.  
**J. Biol. Chem** 267 (1992) 24858-24862  
Molecular diversity in the adenylyl cyclase family
- Kunz, J.** and Hall, M.N.  
**Trends Biochem. Sci.** 18 (1993) 334-338  
Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression
- Laemmli, U.K.**  
**Nature** 227 (1970) 680-685  
Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>
- Law, B.**, and Rossie, S.  
**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 12808-12813  
The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2-ceramide
- Lee, M.R.**, Liou, M.L., Lion, M.L., Yang, Y.F. and Lai, M.Z.  
**J. Immunol.** 151 (1993) 5208-5217  
CAMP analogs prevent activation-induced apoptosis of T cell hybridomas
- Lee, M.W.** and Severson, D.L.  
**Am. J. Physiol.** 267 (1994) 659-678  
Signal-transduction in vascular smooth muscle – diacylglycerol second messengers and PKC action
- Lee, J.Y.**, Hannun, Y.A. and Obeid, L.M.  
**J. Biol. Chem.** 271 (1996) 13169-13174  
Ceramide inactivates cellular protein kinase C  $\alpha$

**Linder, B.L.** and Goodman, D.S.

**Blood** 60 (1982) 436-445

Studies on the mechanism of the inhibition of platelet aggregation and release induced by high levels of arachidonate

**Liscovitch, M.** and Cantley, L.

**Cell** 77 (1994) 329-334

Lipid second messengers

**Liu, B.,** Obeid, L.M. and Hannun, Y.A.

**Sem. Cell Dev. Biol.** 8 (1997) 311-322

Sphingomyelinases in cell regulation

**Liu, J.**

**Trends Pharm. Sci.** 14 (1993) 182-188

FK506 and ciclosporin: molecular probes for studying intracellular signal transduction

**Liu, J.,** Mathias, S., Yang, Z. and Kolesnick, R.N.

**J. Biol. Chem.** 269 (1994) 3047-3052

Renaturation and TNF- $\alpha$  stimulation of a 97 kDa ceramide-activated protein kinase

**Lotem, J.,** Cragoc, E.J. and Sachs, L.

**Blood** 78 (1991) 953-960

Rescue from programmed cell death in leukemic and normal myeloid cells

**Lozano, J.,** Berra, E., Municio, M.M., Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L. and Moscat, J.

**J. Biol. Chem.** 269 (1994) 19200-19202

Protein kinase C isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase

**Luthin, G.R.,** and Tabakoff, B.

**J. Pharmacol. Exp. Ther.** 228 (1984) 579-587

Activation of adenylyl cyclase by alcohols requires the nucleotide-binding protein

**Mathias, S.,** Dressler, K. and Kolesnick, R.

**Proc. Natl. Acad. Sci.** 88 (1991) 10009-10013

Characterisation of a ceramide activated protein kinase: stimulation by tumor necrosis factor  $\alpha$

**Mathias, S.,** Pena, L.A. and Kolesnick, R.N.

**Biochem. J.** 335 (1998) 465-480

Signal transduction of stress via ceramide

**McConkey, D.J.,** Hartzell, P., Jondal, M. and Orrenius, S.

**J. Biol. Chem.** 264 (1989) 13399-13402

Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C



- McPhail, L.C.**, Clayton, C.C. and Snyderman, R.  
**Science** **224** (1984) **622-625**  
A potential second messenger role for unsaturated fatty acids: activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase
- Merrill, A.H.** and Jones, D.D.  
**Biochim. Biophys. Acta** **1044** **1-12**  
An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism
- Merrill, A.H.**, Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder, J.J., Riley, R.T., Voss, K.A. and Wang, E.  
**Toxicol. Appl. Pharmacol.** **142** (1997) **208-225**  
Sphingolipids – The enigmatic lipid class: Biochemistry, physiology, and pathophysiology
- Mollner, S.** and Pfeuffer, T.  
**Eur. J. Biochem.** **171** (1988) **265-271**  
Two different adenylyl cyclases in brain distinguished by monoclonal antibodies
- Mollner, S.**, Simmoteit, R., Palm, D. and Pfeuffer, T.  
**Eur. J. Biochem.** **195** (1991a) **281-286**  
Monoclonal antibodies against various forms of the adenylyl cyclase catalytic subunit and associated proteins
- Mollner, S.**, Deppisch, H. and Pfeuffer, T.  
**Eur. J. Biochem.** **210** (1991b) **539-544**  
The alpha subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein forms high-molecular-mass aggregates, concomitant with iloprost-induced desensitization of human platelet adenylyl cyclase
- Montminy, M.R.**, Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G. and Goodman, R.  
**Proc. Natl. Acad. Sci.** **83** (1986) **6682-6686**  
Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene
- Müller, G.**, Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. and Pfizenmaier, K.  
**EMBO J.** **14** (1995) **1961-1969**  
PKC  $\zeta$  is a molecular switch in signal transduction of TNF- $\alpha$ , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid
- Müller, G.**, Storz, P., Bourteele, S., Doppler, H., Pfizenmaier, K., Mischak, H., Philipp, A., Kaiser, C. and Kolch, W.  
**EMBO J.** **17** (1998) **732-742**  
Regulation of Raf-1 kinase by TNF via its second messenger ceramide and cross talk with mitogenic signalling
- Murakami, K.** and Routtenberg, A.  
**FEBS Lett.** **192** (1985) **189-193**  
Direct activation of purified protein kinase C by unsaturated fatty acids (oleate and arachidonate) in the absence of phospholipids and Ca<sup>2+</sup>

- Murakami, Y.**, Oshima, Y., and Yasumoto, T.  
**Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 48 (1982) 69-72  
Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate  
*Prorocentrum lima*
- Murakami, Y.**, Chan, S.Y. and Routtenberg, A.  
**J. Biol. Chem.** 261 (1986) 15424-15429  
Protein kinase C activation by *cis*-fatty acid in the absence of Ca<sup>2+</sup> and phospholipids
- Naor, Z.**, Shearman, M.S., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y.  
**Mol. Endocrinol.** 2 (1988) 1043-1048  
Calcium-independent activation of hypothalamic type I protein kinase C by unsaturated fatty acids
- Neer, E.J.**  
**Cell** 80 (1995) 249-257  
Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals
- Negishi, T.**, Chik, C.L. and Ho, A.K.  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.** 244 (1998) 57-61  
Ceramide selectively inhibits calcium-mediated potentiation of  $\beta$ -adrenergic-stimulated cyclic nucleotide accumulation in rat pinealocytes
- Newton, A.C.**  
**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 28495-28498  
Protein kinase C: Structure, function, and regulation
- Nickels, J.T.** and Broach, J.R.  
**Genes Dev.** 10 (1996) 382-394  
A ceramide-activated protein phosphatase mediates ceramide-induced G1 arrest of *Saccharomyces*
- Nishikawa, M.**, Hidaka, H. and Shirakawa, S.  
**Biochem. Pharmacol.** 37 (1988) 3079-3089  
Possible involvement of direct stimulation of protein kinase C by unsaturated fatty acids in platelet activation
- Nishizuka, Y.**  
**Nature (London)** 334 (1988) 661-665  
The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation
- Obeid, L.M.**, Linaudic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A.  
**Science** 259 (1993) 1769-1771  
Programmed cell death induced by ceramide
- O'Flaherty, J.T.**, Schmitt, J.D., McCall, C.E. and Wykle, R.L.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123 (1984) 64-70  
Diacylglycerols enhance human neutrophil degranulation responses: relevancy to a multiple mediator hypothesis of cell function

- Ohanian, J.**, Liu, G., Ohanian, V. and Heagerty, A..  
**Acta Physiol. Scand.** **164** (1998) 533-548  
Lipid second messengers derived from glycerolipids and sphingolipids, and their role in smooth muscle function
- Ohno, S.**, Akita, Y., Hata, A., Osada, S., Kubo, K., Konno, Y., Akimoto, K., Mizuno, K., Saïdo T., Kuroki, T. and Suzuki, K.  
**Adv. Enzyme Regul.** **31** (1991) 287-303  
Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC
- Okabe, H.** and Kishimoto, Y.  
**J. Biol. Chem.** **252** (1977) 7068-7073  
*In vivo* metabolism of ceramides in rat brain
- Okajima, F.**, Tomura, H., Sho, K., Rimura, T., Sato, K., Im, D.-S., Akbar, M and Kondo, Y.  
**Endocrinology** **138** (1997) 220-229  
Sphingosine 1-phosphate stimulates hydrogen peroxide generation through activation of phospholipase C-Ca<sup>2+</sup> system in FRTL-5 thyroid cells: Possible involvement of guanosine triphosphate-binding proteins in the lipid signaling
- Okazaki, T.**, Bell, R.M. and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** **264** (1989) 19076-19080  
Sphingomyelin turnover induced by vitamin D<sub>3</sub> in HL-60 cells
- Okazaki, T.**, Bielawska, A., Domae, N., Bell, R.M. and Hannun, Y.A.  
**J. Biol. Chem.** **269** (1994) 4070-4077  
Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced HL-60 cell differentiation
- Paterson, J.M.**, Smith, S.M., Harmar, A.J. and Antoni, F.A.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** **214** (1995) 1000-1008  
Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin
- Pavlovic-Surjancev, B.**, Cahill, A.L. and Perlman R.L.  
**J. Neurochem.** **61** (1993) 697-703  
Staurosporine activates a 60.000 M<sub>r</sub> protein kinase in bovine chromaffin cells that phosphorylates myelin basic protein in vitro
- Posner, B.I.**, Faure, R., Burgess, J.W., Bevan, A.P., Lachance, D., Zhang-Sun, G., Fantus, I.G., Ng, J.B., Hall, D.A. and Lum, B.S.  
**J. Biol. Chem.** **269** (1994) 4596-4604  
Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics
- Pratt, R.M.** and Martin, G.R.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **72** (1975) 874-877  
Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development

- Premont, R.T.**, Jacobowitz, O. and Iyengar, R.  
**Endocrinology** **131** (1992) 2774-2783  
Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by G<sub>s</sub> in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation
- Prinetti, A.**, Bassi, R., Riboni, L. and Tettamanti, G.  
**FEBS Lett.** **414** (1997) 475-479  
Involvement of a ceramide activated protein phosphatase in the differentiation of neuroblastoma Neuro2a cells
- Pyne, S.** and Pyne, N.J.  
**Biochem. J.** **315** (1995) 917-923  
The differential regulation of cyclic AMP by sphingomyelin-derived lipids and the modulation of sphingolipid-stimulated extracellular signal regulated kinase-2 in airway smooth muscle
- Quest, F.G.**, Raben, D.M. and Bell, R.M.  
**In: R.M. Bell, J.H. Exton & S.M. Prescott (eds) *Handbook of lipid*, Plenum Press New York (1996) 1-58**  
Diacylglycerols. Biosynthetic (eds) intermediates and lipid second messengers.
- Rabin, R.A.** and Molinoff, P.B.  
**J. Pharmacol. Exp. Ther.** **227** (1983) 551-556  
Multiple sites of action of ethanol on adenylyl cyclase
- Rao, B.** and Spence, M.  
**J. Lipid Res.** **17** (1976) 506  
Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0
- Redinbaugh, M.G.** and Campbell, W.H.  
**Anal. Biochem.** **147** (1985) 144  
Adaption of the dye-binding protein assay to microtiter plates
- Robbins, A.K.** and Horlick, R.A.  
**BioTechniques** **25** (1998) 240-244  
Macrophage scavenger receptor confers an adherent phenotype to cells in culture
- Rydel, R.E.** and Greene, L.A.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **85** (1988) 1257  
CAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor
- Saba, J.D.**, Obeid, L.M. and Hannun, Y.A.  
**Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B** **351** (1996) 233-240  
Ceramide: an intracellular mediator of apoptosis and growth suppression
- Saini, K.S.** and Walker, N.I.  
**Mol. Cell. Biochem.** **178** (1998) 9-25  
Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis

- Saito, T.**, Lee, J.M. and Tabakoff, B.  
**J. Neurochem.** 44 (1985) 1037-1044  
Ethanol's effects on cortical adenylate cyclase activity
- Salomon, Y.**, Londos, C. and Rodbell, M.  
**Anal. Biochem.** 58 (1974) 541-548  
A highly sensitive adenylate cyclase assay
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F. and Maniatis, T.  
**Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3<sup>rd</sup> edition (1990)**  
Molecular cloning. A laboratory manual
- Sanes, J.R.**, Rubenstein, J.L. and Nicolas, J.F.  
**EMBO J.** 5 (1986) 3133-3142  
Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos
- Sasaki, T.**, Hazeki, K., Ui, M. and Katada, T.  
**Biochem. J.** 315 (1996) 1035-1040  
Focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin are substrates for sphingomyelinase-induced tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 fibroblasts
- Sawai, H.**, Okazaki, T., Takeda, Y., Tashima, M., Sawada, H., Okuma, M., Kishi, S., Umehara, H. and Domae, N.  
**J. Biol. Chem.** 272 (1997) 2452-2458  
Ceramide-induced translocation of protein kinase C- $\delta$  and - $\epsilon$  to the cytosol
- Schwartzman, R.A.** and Cidlowski, J.A.  
**Endocr. Rev.** 14 (1993) 133-151  
Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death
- Seamon, K.B.**, Padgett, W. and Daly, J.W.  
**Proc. Natl. Acad. Sci.** 78 (1981) 3363-3367  
Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells
- Seamon, K.B.**, and Daly, J.W.  
**Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.** 20 (1986) 1-150  
Forskolin: its biological and chemical properties
- Seifert, R.**, Schächtele, C., Rosenthal, W. Shultz, G.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 154 (1988) 20-26  
Activation of protein kinase C by cis- and trans-fatty acids and its potentiation by diacylglycerol
- Sekiguchi, K.**, Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 145 (1987) 797-802  
Three distinct forms of rat brain protein kinase C: differential response to unsaturated fatty acids

- Sekiguchi, K.**, Tsukuda, M., Ase, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.  
**J. Biochem. Tokyo** 103 (1988) 759-765  
Mode of activation and kinetic properties of three distinct forms of protein kinase C from rat brain
- Shearman, M.S.**, Naor, Z., Sekiguchi, K., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y.  
**FEBS Lett.** 243 (1989) 177-182  
Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites
- Shearman, M.S.**, Shinomura, T, Oda, T. and Nishizuka, Y.  
**FEBS Lett.** 279 (1991) 261-264  
Protein kinase C subspecies in adult rat hippocampal synaptosomes
- Simbulan-Rosenthal, C.M.**, Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, A.H. and Smulson, M.E.  
**J. Biol. Chem.** 273 (1998) 13703-13712  
Transient poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis
- Simmoteit, R.**  
**Promotion (1990)**  
Phorbolster induzierte Modifikation des Adenyllylzyklase-Systems in humanen Thrombozyten
- Slife, C.W.**, Wang, E., Hunter, R., Wang, S., Burgess, C., Liotta, D.C. and Merrill, A.H., Jr.  
**J. Biol. Chem.** 264 (1989) 10371-10377  
Free sphingosine formation from endogenous substrates by a liver plasma membrane system with a divalent cation dependence and a neutral pH optimum
- Sonoda, Y.**, Kasahara, T., Yamaguchi, Y., Kuno, K., Matsushima, K. and Mukaida, N.  
**J. Biol. Chem.** 272 (1997) 15366-15372  
Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline
- Spence, M.W.**, Beed, S. and Cook, H.W.  
**Biochem. Cell Biol.** 64 (1986) 400-404  
Acid and alkaline ceramidases of rat tissues
- Spence, M.W.**, Byers, D.M., Palmer, F.B. and Cook, H.W.  
**J. Biol. Chem.** 264 (1989) 5358-5363  
A new Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum
- Spiegel, S.**, Foster, D. and Kolesnick, R.  
**Curr. Opin. Cell Biol.** 8 (1996) 159-167  
Signaltransduction through lipid 2<sup>nd</sup> messengers

- Suganuma, M.**, Fujiki, H., Furuya-Suguri, H., Yoshizawa, S., Yasumoto, S; Kato Y., Fusetani, N., Sugimura, T.  
**Cancer Res.** 50 (1990) 3521-3525  
Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin
- Sugita, M.**, Williams, M., Dulaney, J.T. and Moser, H.W.  
**Biochim. Biophys. Acta** 398 (1975) 125-131  
Ceramidase and ceramide synthesis in human kidney and cerebellum. Description of a new alkaline ceramidase
- Sunahara, R.K.**, Dessauer, C.W. and Gilman, A.G.  
**Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 36 (1996) 461-480  
Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases
- Suzuki, A.**, Iwasaki, M., Kato, M. and Wagai, N.  
**Exp. Cell Res.** 233 (1997) 41-47  
Sequential operation of ceramide synthesis and ICE cascade in CPT-11-initiated apoptotic death signaling
- Sweely, C.C.**  
**In: D.E. Vance & J.E. Vance (eds) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes** 20 (1991) 327-361  
Sphingolipids
- Tachibana, K.**, et al.  
**J. Am. Chem. Soc.** 103 (1981) 2469-2471  
Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*
- Takai, A.**, Bialojan, C., Troschka, M. and Rüegg, J.C.  
**FEBS Lett.** 217 (1987) 233-239  
Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin
- Tanabe, F.**, Cui, S-H. and Ito, M.  
**Biochem. Biophys. Res. Com.** 242 (1998) 129-133  
Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C  $\beta$  in murine polymorphonuclear leukocytes
- Tang, W.-J.** and Gilman, A.G.  
**Science** 254 (1991) 1500-1503  
Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein  $\beta\gamma$  subunits
- Taussig, R.**, Iniguez-Luhi, J. and Gilman, A.G.  
**Science** 261 (1993) 218-221  
Inhibition of adenylyl cyclase by  $G_{i\alpha}$
- Taussig, R.**, Tang, W.-J., Hepler, J.R. and Gilman, A.G.  
**J. Biol. Chem.** 269 (1994) 6093-6100  
Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclase

**Taussig, R.** and Gilman, A.G.

**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 1-4

Mammalian membrane-bound adenylyl cyclase

**Therrien, M.**, Chang; H.C., Solomon, N.M., Karim, F.D., Wassarman, D.A. and Rubin, G.M.

**Cell** 83 (1995) 879-888

KSR, a novel protein kinase required for Ras signal transduction

**Thompson, C.B.**

**Science** 267 (1995) 1456-1462

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease

**Towbin, H.**, Staehelin, T. and Gordon, J.

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76 (1979) 4350-4354

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications

**Van Koppen, C.J.**, Meyer zu Heringdorf, D., Laser, K.T., Zhang, C. and Jakobs, K.H.

**J. Biol. Chem.** 271 (1996) 2082-2087

Activation of a high affinity G<sub>i</sub> protein-coupled plasma membran receptor by sphingosine-1-phosphate

**Van Veldhoven, P.P.**, Matthews, T.J., Bolognesi, D.P. and Bell, R.M.

**Biophys. Res. Commun.** 187 (1992) 209-216

Changes in bioactive lipids, alkylacylglycerol and ceramide, occur in HIV-infected cells

**Vaux, D.L.** and Strasser, A.

**Proc. Natl. Acad. Sci. AUS** 93 (1996) 2239-2244

The molecular biology of apoptosis

**Venable, M.E.**, Lee, M.J., Bielawska, A and Obeid, L.M.

**J. Biol. Chem.** 270 (1995) 30701-30708

Role of ceramide in cellular senescence

**Venable, M.E.**, Bielawska, A. and Obeid, L.M.

**J. Biol. Chem.** 271 (1996) 24800-24805

Ceramide inhibits phospholipase D in a cell-free system

**de Vente, J.E.**, Kukoly, C.A., Bryant, W.A., Posekany, K.J., Chen, J., Fletcher, D.J., Parker, P.J., Pettit, G.J., Lozano, G., Cook, P.P. and Ways, D.K.

**J. Clin. Invest.** 96 (1995) 1874-1886

Phorbol esters induce death in MCF-7 breast cancer cells with altered expression of protein kinase C isoforms. Role for p53-independent induction of gadd-45 in initiating death

**Verkest, V.**, McArthur, M. and Hamilton, S.

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 152 (1988) 825-829

Fatty acid activation of protein kinase C: dependence on diacylglycerol



- Voet, D.** and Voet, J.  
**VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (1992)**  
Biochemie
- Walker, C.,** Kristensen, F., Bettens, F. and deWeck, A.L.  
**J. Immunol. 130 (1983) 1770-1773**  
Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production
- Wallach, J.,** Droste, M., Kluxen, F.W., Pfeuffer, T. and Frank, R.  
**FEBS Lett. 338 (1994) 257-263**  
Molecular cloning and expression of a novel type V adenylyl cyclase from rabbit myocardium
- Weller, P.F.** and Dvorak, A.M.  
**Blood 65 (1985) 1269-1274**  
Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils
- Weller, P.F.,** Ackermann, S.J., Nicholson-Weller, A. and Dvorak, A.M.  
**Am J. Pathol. 135 (1989) 947-959**  
Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes
- Weller, P.F.,** Ryeom, S.W., Picard, S.T., Ackermann, S.J. and Dvorak, A.M.  
**J. Cell Biol. 113 (1991) 137-146**  
Cytoplasmic lipid-bodies of neutrophils: Formation induced by *cis*-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C
- Wertz, P.W.** and Downing, D.T.  
**FEBS Lett. 270 (1990) 110-112**  
Ceramidase activity in porcine epidermis
- Wetsel, W.C.,** Khan, W.A., Merchantlaler, I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M., Negro-Vilar, A. and Hannun, Y.A.  
**J. Cell Biol. 117 (1992) 121-133**  
Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes
- Wiegmann, K.,** Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D. and Kronke, M.  
**Cell 78 (1994) 1005-1015**  
Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signalling
- Wiesner, A.D.,** and Dawson, G.  
**J. Neurochem. 66 (1996) 1418-1425**  
Staurosporine induces programmed cell death in embryonic neurons and activation of the ceramide pathway
- Willingham, M.C.** and Pastan, I.  
**Academic Press, Inc., Orlando, FL. 22-23**  
An atlas of immunofluorescence in cultured cells

**Wolff, R.A.**, Dobrowsky, T.R., Bielaswka, A. and Hannun, Y.A.

**J. Biol. Chem.** **269** (1994) **19605-19609**

Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction

**Wyllie, A.H.**

**Nature (London)** **284** (1980) **555-556**

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation

**Yao, B.**, Zhang, Y., Delikat, S., Mathias, S., Basu, S. and Kolesnick, R.

**Nature** **378** (1995) **307-310**

Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase

**Yasumoto, T.**, et al.

**Am. Chem. Soc.** (1984) **207-214**

Diarrhetic shellfish poisoning (In 'Seafood toxins')

**Yasumoto, T.**, Murata, M., Oshima; Y. and Sano, M.

**Tetrahedron** **41** (1985) **1019-1025**

Diarrhetic shellfish toxins

**Yavin, E.** and Gatt, S.

**Biochemistry** **8** (1969) **1692-1698**

Enzymatic hydrolysis of sphingolipids. 8. Further purification and properties of rat brain ceramidase

**Yoshimura, M.** and Cooper, D.M.F.

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89** (1992) **6716-6720**

Cloning and expression of a Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells

**Yoshimura, M.** and Tabakoff, B.

**Alcohol Clin. Exp. Res.** **19** (1995) **1435-1440**

Selective effects of ethanol on the generation of cAMP by particular members of the adenylyl cyclase family

**Young, C.Y.**, Murtha, P.E. and Zhang, J.

**Oncol. Res.** **6** (1994) **203-210**

Tumor-promoting phorbol ester-induced cell death and gene expression in a human prostate adenocarcinoma cell line

**Yu, H.J.**, Ma, H. and Green, R.D.

**Mol. Pharmacol.** **44** (1993) **689-693**

Calcium entry via L-type calcium channels acts as a negative regulator of adenylyl cyclase activity and cyclic AMP levels in cardiac myocytes

**Zhang, J.H.**, Yao, B., Delikat, S., Bayoumy, S., Lin, X-H., Basu, S., McGinley, M., Chan-Hui, P-Y., Lichenstein, H. and Kolesnick, R

**Cell** **89** (1997) **63-72**

Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase

Teile der Ergebnisse wurden aus Prioritätsgründen bereits veröffentlicht:

**Böl, G.F., Kluxen, F.W., Mollner, S., Bösel, A. and Pfeuffer, T.**

**Biol. Chem. Hoppe-Seyler 377 (1996) S147 (Abstract)**

PKC phosphorylates adenylyl cyclase type II on its C terminus

**Böl, G.-F., Gros, C., Hülster, A., Bösel, A. and Pfeuffer, T.**

**Biochem. Biophys. Res. Com. 237 (1997) 251-256**

Phorbol ester induced sensitisation of adenylyl cyclase type II is related to phosphorylation of threonine 1057

**Bösel, A. and Pfeuffer, T.**

**FEBS Letters 422 (1998) 209-212**

Differential effects of ceramides upon adenylyl cyclase subtypes

## Lebenslauf

Familienname: Bösel  
Vorname: Angela  
geb.: 15.02.1967, Celle  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Bildungsgang:

1973 – 1977                      Grundschule, Hannover  
1977 – 1986                      Gymnasium Goetheschule, Hannover, Abitur

Okt. 1986 – Mär. 1989            Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin,  
Pharmazieschule Dr. Kurt Blindow, Hannover

Apr. 1989 – Sep. 1989            Tätigkeit als pharmazeutisch-technische Assistentin,  
Turmapotheke, Hannover

Okt. 1989 – Feb. 1995            Studium der Biochemie, Universität Hannover  
Feb. 1995 – Aug. 1995            Diplomarbeit am Institut für Molekularpharmakologie,  
Medizinische Hochschule in Hannover

Okt. 1995 – Mär. 1999            Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für  
Physiologische Chemie II, Medizinische Einrichtungen der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Seit Apr. 1999                      Tätigkeit als Clinical Research Associate, Solvay Arzneimittel  
GmbH, Hannover

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. H. Müller, danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die Tatsache, daß er jederzeit ein offenes Ohr für auftretende Probleme hatte.

Für die freundliche Übernahme des Korreferates möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Resch recht herzlich bedanken.

Für die Überlassung des interessanten Themas bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Th. Pfeuffer.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. G. Böhl, Frau Dr. E. Pascher und Herrn Dr. J. Napiwotzki für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihr nie nachlassendes Interesse trugen sehr zum Fortgang dieser Arbeit bei.

Allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie II danke ich für die Hilfsbereitschaft bei experimentellen und theoretischen Problemen im Laboralltag. Ein großes Dankeschön gilt Frau U. Winner und Frau M. Gehrke, ohne die das Forschen nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Frau Dr. G. Böhl danke ich für die Überlassung der Zelllinie HEK 293 ACII, Frau Dr. A. Hülster für die Überlassung der Zelllinien HEK 293 ACI und HEK 293 ACII sowie Herrn Dr. S. Mollner für die Überlassung der monoklonalen Antikörper BBC 1 und BBC 2.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. M. Schinner für die Hilfe beim Korrekturlesen und Frau Dr. B. Ullrich für die Hilfe beim Einscannen der Abbildungen.

Bei Herrn Dr. A. Wilde und Frau Dr. S. Müller möchte ich mich ganz besonders für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.