

# Lipidhomöostase bei S1P-Lyase-Defizienz in Maus und Mensch

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14)  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Anna Katharina Spohner**  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2021)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (14) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber  
Prof. Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf

Datum der Disputation: 19. April 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	vi
Gen- und Proteinverzeichnis .....	xii
Abbildungsverzeichnis.....	xv
Tabellenverzeichnis.....	xvii
1. Einleitung und theoretischer Hintergrund.....	1
1.1 Sphingolipide.....	1
1.1.1 Der Sphingolipid-Stoffwechsel.....	2
1.1.2 Ceramide .....	4
1.1.3 Bioaktives Sphingosin-1-Phosphat (S1P).....	5
1.1.4 Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs).....	7
1.1.5 Sphingosin-1-Phosphat Lyase (SGPL).....	7
1.2 Sphingosin-1-Phosphat Lyase Defizienz .....	8
1.2.1 Humanes-S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom (SPLIS).....	9
1.2.2 <i>Sgp1</i> -defiziente Mäuse .....	14
1.2.3 Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) <i>Sgp1</i> -defizienter Mäuse.....	17
1.3 Sphingolipidosen .....	18
1.4 Die Leber .....	20
1.4.1 Anatomie.....	21
1.4.2 Funktion .....	23
1.4.3 Hepatozyten .....	24
1.5 Cholesterinhomöostase.....	25
1.5.1 Cholesterinbiosynthese .....	26
1.5.2 Regulation der Cholesterinsynthese.....	28
1.6 Calciumhomöostase.....	29
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	33
2. Material & Methoden.....	34
2.1 Materialien .....	34
2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien .....	34
2.1.2 Antikörper.....	35

2.1.3	Plasmide .....	36
2.1.4	Primer .....	36
2.1.5	TaqMan-Sonden .....	37
2.1.6	Puffer .....	39
2.1.7	Chemikalien und Reagenzien.....	40
2.1.8	Reagenziensets .....	44
2.1.9	Geräte .....	44
2.1.10	Software.....	45
2.2	Methoden .....	46
2.2.1.1	Generierung Hepatozyten-spezifischer <i>Sgp1</i> knockout Mäuse.....	46
2.2.1.2	Genotypisierung .....	46
2.2.1.3	Präparation der Versuchstiere.....	47
2.2.1.4	Hepatozytenisolierung.....	47
2.2.1.5	Analyse verschiedener Parameter im Blut.....	48
2.2.1.6	Herstellung Paraffinblöcke.....	48
2.2.2	Zellkultur .....	49
2.2.2.1	Kultivierung der Zelllinien .....	49
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und -vitalität.....	49
2.2.2.3	Transiente Transfektion mittels Lipofectamin 2000.....	49
2.2.3	Proteinanalytik.....	50
2.2.3.1	Proteinlyse .....	50
2.2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	50
2.2.3.3	Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
2.2.3.4	Western Blot .....	51
2.2.4	Untersuchungen auf mRNS-Ebene .....	51
2.2.4.1	mRNS-Isolierung – TRI Reagenz® .....	51
2.2.4.2	mRNS-Isolierung – Säulen-basiert (Qiagen) .....	52
2.2.4.3	RNS-Konzentrationsbestimmung .....	52
2.2.4.4	RNS-Integrität .....	52
2.2.4.5	Reverse Transkription .....	53

2.2.4.6	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	53
2.2.4.7	TaqMan Genexpressionsanalyse (TaqMan Array) .....	54
2.2.5	Analyse der Calciumhomöostase .....	55
2.2.5.1	Calciummessung an Einzelzellen .....	55
2.2.5.2	Calciummessung in Zellsuspension .....	55
2.2.5.3	Verifizierung des Calciumphänotyps von <i>Sgp1</i> <sup>-/-</sup> MEFs .....	55
2.2.6	Färbungen.....	56
2.2.6.1	Kernfärbung mit Hoechst 33342.....	56
2.2.6.2	Kernfärbung mit DAPI .....	56
2.2.6.3	Cholesterinfärbung mit Filipin .....	57
2.2.6.4	Färbung von Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff LD540 .....	57
2.2.6.5	Hämatoxylin und Eosin (H & E) Färbung.....	57
2.2.6.6	Immunfärbung.....	58
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	59
2.2.8	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS/MS).....	59
2.2.9	Bestimmung des Sphingomyelins mittels LC-MS/MS .....	59
2.2.10	Bestimmung von Cholesterin, Nicht-Cholesterin-Sterolen und Oxysterolen mittels Gaschromatographie .....	60
2.2.11	Lumineszenz-Untersuchung mit Hilfe des Tango-Systems.....	60
2.2.12	Seahorse.....	61
2.2.13	Datenanalyse und Darstellung .....	64
3.	Ergebnisse .....	66
3.1	Hepatozytenspezifischer <i>Sgp1</i> -Knockout in der Maus ( <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> ) .....	66
3.1.1	Generierung von Mäusen mit hepatozytenspezifischem <i>Sgp1</i> -Knockout ( <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> ) .....	66
3.1.2	Basale Charakterisierung der <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäuse .....	68
3.1.3	Sphingolipidspiegel in <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen.....	71
3.1.4	Cholesterinhomöostase in <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen .....	78
3.1.5	Charakterisierung primärer Hepatozyten isoliert aus <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen .....	83
3.2	Ergebnisse an <i>Sgp1</i> -defizienten murinen Fibroblasten ( <i>Sgp1</i> <sup>-/-</sup> MEFs) .....	86

3.2.1	Untersuchungen zur PMCA in <i>Sgpl1</i> <sup>-/-</sup> MEFs.....	86
3.2.2	Zellmetabolismus in <i>Sgpl1</i> <sup>-/-</sup> MEFs .....	89
3.3	Ergebnisse an <i>Sgpl1</i> -defizienten humanen Fibroblasten (SPLIS-Patient) .....	89
3.3.1	Verifizierung der SGPL1-Defizienz .....	89
3.3.2	Calciumhomöostase.....	90
3.3.3	Cholesterinhomöostase.....	93
4.	Diskussion.....	95
4.1	Hepatozytenspezifischer <i>Sgpl1</i> Knockout in der Maus ( <i>Sgpl1</i> <sup>HepKO</sup> ).....	95
4.1.1	Basale Charakterisierung der <i>Sgpl1</i> <sup>HepKO</sup> Mäuse .....	95
4.1.2	Sphingolipidspiegel der <i>Sgpl1</i> <sup>HepKO</sup> Mäuse .....	96
4.1.3	Cholesterinhomöostase in <i>Sgpl1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen .....	100
4.1.4	Charakterisierung primärer Hepatozyten isoliert aus <i>Sgpl1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen .....	102
4.2	Die Rolle der S1P-Lyase in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) .....	103
4.3	Die Rolle der S1P-Lyase in humanen Patientenfibroblasten.....	104
4.4	Ausblick und offenen Fragen.....	106
5.	Zusammenfassung .....	108
6.	Literaturverzeichnis .....	112
7.	Anhang.....	132
7.1	Weitere Ergebnisse .....	132
7.2	Veröffentlichungen .....	139
7.2.1	Veröffentlichungen entstanden aus dieser Arbeit .....	139
7.2.2	Weitere Veröffentlichungen .....	139
7.3	Eidesstaatliche Versicherung .....	140

## Abkürzungsverzeichnis

**AAV-SGPL1** – Adeno-assoziierte Virus 9-vermittelte Übertragung des menschlichen SGPL1

**ABC-Transporter** – Transporter mit ATP-bindender Kassette

**Abcb1** – MDR1 kodierendes Gen

**Abcc1** – MRP1 kodierendes Gen

**Abcc2** – MRP2 kodierendes Gen

**Abcc3** – MRP3 kodierendes Gen

**Abcc4** – MRP4 kodierendes Gen

**Abcg2** – BCPR kodierendes Gen

**ACTB** –  $\beta$ -Aktin

**ADP** – Adenosindiphosphat

**AI** – Nebennierenrindeninsuffizienz (*adrenal insufficiency*)

**AKT** – Proteinkinase B

**AMP** – Adenosinmonophosphat

**ANOVA** – Varianzanalyse (*analysis of variance*)

**APOM** – Apolipoprotein M

**APP** – Amyloid-Vorläufer-Protein (*amyloid precursor protein*)

**APS** – Ammoniumperoxodisulfat

**Atp2a** – SERCA kodierendes Gen

**Atp2b** – PMCA kodierendes Gen

**Atp2c** – SPCA kodierendes Gen

**ATP** – Adenosintriphosphat

**BACE** –  $\beta$ -Sekretase

**BCRP** – *breast cancer resistance protein*

**BSA** – Rinderserumalbumin

**BUN** – Harnstoff-Stickstoff Gehalt des Bluts

**CDS** – Kodierungssequenz

**C1P** – Ceramid-1-Phosphat

**ca.** – circa

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** – intrazellulärer Calciumspiegel

**CaCl<sub>2</sub>** – Calciumchlorid

**CD147** – Basigin

**CDK** – Cyclin-abhängige Kinase (*cyclin dependent kinase*)

**Cdkn1A** – p21 kodierendes Gen

**cDNS** – komplementäre Desoxyribonukleinsäure

**CerS** – Ceramidsynthase

**CMT** – Charcot-Marie-Tooth

**CO<sub>2</sub>** – Kohlenstoffdioxid  
**CoA** – Coenzym A  
**COX** – Cytochrom-c-Oxidase  
**cPLA<sub>2</sub>** – zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>  
**DAG** – Diacylglycerol  
**DAPI** – 4',6-Diamidin-2-phenylindol  
**DEPC** – Diethyldicarbonat-Dimethylsulfoxid  
**DMEM** – Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium  
**DMSO** – Dimethylsulfoxid  
**DNS** – Desoxyribonukleinsäure  
**DPBS** – Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung  
**Dr.** – Doktor  
**DTT** – 1,4 Dithiothreitol  
**ECAR** – Azidifizierungsrate (*extracellular acidification rate*)  
**Edg** – Endothelzell-Differenzierungsgen (kodiert LPA- und S1P-Rezeptoren)  
**EDGA** – Ethylenglycoltetraessigsäure  
**EDTA** – Ethylendiamintetraessigsäure  
**Em** – Emission  
**ER** – Endoplasmatisches Retikulum  
**ESI** – Elektrosprayionisierung  
**et al.** – und Andere (*et alii*)  
**Ex** – Exzitation  
**FASN** – Fettsäuresynthase  
**FH** – Hydrops fetalis  
**FKS** – fetales Kälberserum  
**FSGS** – fokale segmentale Glomerulosklerose  
**Fura2/AM** – Fura-2/Acetoxymethylester  
**GAPDH** – Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase  
**g** – Gramm  
**gDNS** – genomische Desoxyribonukleinsäure  
**GFP** – grün fluoreszierendes Protein  
**GGT** – Gamma-Glutamyltransferase  
**GOT** – Glutamat-Oxalacetat-Transaminase  
**GPCR** – G-Protein-gekoppelter Rezeptor  
**GPN** – Glycyl-L-Phenylalanin-β-Naphthylamid  
**GPT** – Glutamat-Pyruvat-Transaminase  
**h** – Stunde  
**H3** – Histon H3

**H3K9** – Acetyl-Histon H3 (Lys9)  
**HBSS** – Hanks Salzlösung (*Hanks' Balanced Salt Solution*)  
**HCl** – Salzsäure  
**HDAC** – Histon-Deacetylasen  
**HDL** – Lipoproteine hoher Dichte (*high density lipoproteins*)  
**HE** – Hämatoxylin-Eosin  
**HEPES** – 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  
**HMG-CoA** – 3-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A  
**HMGCR** – HMG-CoA Reduktase  
**HPLC-MS/MS** – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Tandemmassenspektrometrie  
**HRP** – Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)  
**IFN $\gamma$**  – Interferon  $\gamma$   
**IL6** – Interleukin-6  
**Insig** – Insulininduziertes Gen  
**IP $_3$**  – Inositoltrisphosphat  
**IP $_3$ R** – Inositol-1,4,5-trisphosphat Rezeptor  
**Itpr** – IP $_3$ R kodierendes Gen  
**K $_2$ HPO $_4$**  – Dikaliumhydrogenphosphat  
**kDa** – Kilodalton, atomare Masseneinheit  
**KCl** – Kaliumchlorid  
**KH $_2$ PO $_4$**  – Kaliumhydrogenphosphat  
**l** – Liter  
**LDL** – Lipoproteine geringer Dichte (*low density lipoproteins*)  
**LDLR** – LDL Rezeptor (*low density lipoprotein receptor*)  
**LPA** – Lysophosphatidsäure (*lysophosphatidic acid*)  
**LPAR** – LPA-Rezeptor  
**LPP** – Lipidphosphat-Phosphatasen  
**LSM** – Laserscanningmikroskop  
**LXR** – Leber X Rezeptor  
**MCOLN** – Mucolipin  
**MDR** – *multidrug resistance gene product*  
**MEF** – murine embryonale Fibroblasten  
**MgCl $_2$**  – Magnesiumchlorid  
**min** – Minute  
**mg** – Milligramm  
**ml** – Milliliter  
**mM** – Millimolar

**mRNS** – messenger (Boten-) Ribonukleinsäure  
**MRP** – *multidrug resistance-related protein*  
**NaCl** – Natriumchlorid  
**NAD<sup>+</sup>/NADH** – Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)  
**NaF** – Natriumfluorid  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** – Dinatriumhydrogenphosphat  
**NaOH** – Natriumhydroxid  
**Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>** - Natriumpyrophosphat  
**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>** - Natriumorthovanadat  
**NEAA** – nicht-essentielle Aminosäuren (*non-essential amino acids*)  
**NF-κB** – Nuklearer Faktor κB  
**nm** – Nanometer  
**NPC** – Morbus Niemann Pick Typ C  
**NPC1** – NPC intrazellulärer Cholesterintransporter 1  
**NPC2** – NPC intrazellulärer Cholesterintransporter 2  
**NS** – nephrotisches Syndrom  
**OCR** – Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*)  
**ORAI** – durch Calciumfreisetzung aktiviertes Calciumkanalprotein  
**p21** – CDK-Inhibitor 1  
**pAKT** – phosphorylierte Form der AKT  
**PBS** – phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)  
**PBS-T** – PBS mit Tween 20  
**PCR** – Polymerasekettenreaktion  
**Pen/Strep** – Penicillin/Streptomycin  
**PFA** – Paraformaldehyd  
**PHB** – Prohibitin  
**PIM** – Proteaseinhibitor-Mix  
**PKC** – Proteinkinase C  
**PLC** – Phospholipase C  
**PLP** – Pyridoxal-5-Phosphat  
**PMCA** – Calcium-ATPase der Plasmamembran  
**pmol** – Pikomol  
**PMSF** – Phenylmethylsulfonylfluorid  
**PPAR<sub>γ</sub>** – Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ  
**PRESTO** – *parallel receptorome expression and screening via transcriptional output, with transcriptional activation following arrestin recruitment*  
**Prof.** – Professor/in  
**PSEN** – Presenilin

**PVDF** – Polyvinylidenfluorid  
**qPCR** – quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion  
**RNS** – Ribonukleinsäure  
**rpm** – Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)  
**RT**– Raumtemperatur  
**S1P** – Sphingosin-1-Phosphat  
**S1PR** – S1P-Rezeptor  
**saal** – Serumamyloide  
**SCAP** – SREBP-Spaltungsaktivierungsprotein  
**SDS** – Natriumdodecylsulfat  
**SDS-PAGE** – SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
**sec** – Sekunde  
**SEM** – Standardfehler (*standard error of the mean*)  
**SERCA** – Calciumpumpe des sarco-/endoplasmatischen Retikulums (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*)  
**SD** – Standardfehler (*standard deviation*)  
**SDS** – Natriumdodecylsulfat  
**SGPL** – S1P-Lyase  
**SGPP** – S1P-Phosphatasen  
**SLC** – *solute carrier* Transporter  
**SPCA** – Calcium-ATPase des sekretorischen Wegs (*Secretory Pathway Calcium ATPase*)  
**SPHK** – Sphingosinkinase  
**SPF** – spezifisch Pathogen-frei  
**SPLIS** – humanes-S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom  
**Sply** – S1P-Lyase Ortholog in *Drosophila melanogaster*  
**SPNS** – Spinster homologes Protein  
**SPTC** – Serin-Palmitoyltransferase  
**SPTS** – Serin-Palmitoyltransferase Untereinheit  
**SRE** – Sterolregulierendes Element  
**SREBP** – Sterol regulierendes Element Bindeprotein (*sterol regulatory element-binding protein*)  
**SRNS** – Steroidresistentes nephrotisches Syndrom  
**STIM** – Stromales Interaktionsmolekül  
**TAE** – Tris-Acetat-EDTA  
**TEV** – *Tobacco Etch Virus*  
**TG** – Thapsigargin  
**TMED** – Tetramethylethylendiamin  
**TNF** – Tumornekrosefaktor

**TSA** – Trichostatin A  
**TPCN** – Zwei-Poren-Segment-Kanal (*two pore segment channel*)  
**TRAF** – Tumor-Nekrosefaktor Rezeptor-assoziierter Faktor  
**Tris** – Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan  
**TRPML** – *transient receptor potential cation channel; mucolipin subfamily*  
**tTA** – Tetracyclin-Transaktivator  
**U** – Einheiten (*Units*)  
**UV/vis** – Ultraviolett/visible (sichtbares Licht)  
**ü. N.** – über Nacht  
**V** – Volt  
**V2R** – Vasopressin V2 Rezeptor  
**VLDL** – Lipoproteine sehr geringer Dichte (*very low density lipoproteins*)  
**z. B.** – zum Beispiel  
**ZNS** – zentrales Nervensystem  
**°C** – Grad Celcius  
**µg** – Mikrogramm  
**µl** – Mikroliter  
**µM** – Mikromolar  
**µm** – Mikrometer  
**λ<sub>em</sub>** - Emissionswellenlänge  
**λ<sub>ex</sub>** - Exzitationswellenlänge

**Gen- und Proteinverzeichnis**

<b>Gen</b>	<b>Protein</b>	<b>UniProt human</b>	<b>UniProt murin</b>
<i>Abca1</i>	ABCA1	O95477	P41233
<i>Abcb1</i>	MDR1	P08183	P21447
<i>Abcc1</i>	MRP1	P33527	O35379
<i>Abcc2</i>	MRP2	Q92887	Q8VI47
<i>Abcc3</i>	MRP3	O15438	B2RX12
<i>Abcc4</i>	MRP4	O15439	E9Q236
<i>Abcg1</i>	ABCG1	P45844	Q64343
<i>Abcg2</i>	BCRP	Q9UNQ0	Q7TMS5
<i>Actb</i>	ACTB	P60709	P60710
<i>Akt1</i>	PKB $\alpha$	P31749	P31750
<i>Akt2</i>	PKB $\beta$	P31751	Q60823
<i>Akt3</i>	PKB $\gamma$	Q9Y243	Q9WUA6
<i>ApoM</i>	APOM	O95445	Q9Z1R3
<i>App</i>	APP	P05067	P12023
<i>Atp2a1</i>	SERCA1	O14983	Q8R429
<i>Atp2a2</i>	SERCA2	P16615	O55143
<i>Atp2a3</i>	SERCA3	Q93084	Q64518
<i>Atp2b1</i>	PMCA1	P20020	G5E829
<i>Atp2b2</i>	PMCA2	Q01814	Q9R0K7
<i>Atp2b3</i>	PMCA3	Q16720	
<i>Atp2b4</i>	PMCA4	P23634	Q6Q477
<i>Atp2c1</i>	SPCA1	P98194	Q80XR2
<i>Atp2c2</i>	SPCA2	O75185	A7L9Z8
<i>Avpr2</i>	V2R	P30518	O88721
<i>Bace1</i>	BACE1	P56817	P56818
<i>Bsg (CD147)</i>	BSG (CD147)	P35613	P18572
<i>CerS1</i>	CERS1	P27544	P27545
<i>CerS2</i>	CERS2	Q96G23	Q924Z4
<i>CerS3</i>	CERS3	Q8IU89	Q1A3B0
<i>CerS4</i>	CERS4	Q9HA82	Q9D6J1
<i>CerS5</i>	CERS5	Q8N5B7	Q9D6K9
<i>CerS6</i>	CERS6	Q6ZMG9	Q8C172

<i>Fasn</i>	FASN	P49327	P19096
<i>Hdac1</i>	HDAC1	Q13547	O09106
<i>Hdac2</i>	HDAC2	Q92769	P70288
<i>Hmgcr</i>	HMGCR	P04035	Q01237
<i>Il6</i>	IL6	P05231	P08505
<i>Infg</i>	INFG	P01579	P01580
<i>Insig1</i>	INSIG1	O15503	Q8BGI3
<i>Insig2</i>	INSIG2	Q9Y5U4	Q91WG1
<i>Itpr1</i>	IP3R1	Q14643	P11881
<i>Itpr2</i>	IP3R2	Q9Z329	Q14571
<i>Itpr3</i>	IP3R3	P70227	Q14573
<i>Lpar1</i>	LPAR1	Q92633	P61793
<i>Lpar2</i>	LPAR2	Q9HBW0	Q9JL06
<i>Lpar3</i>	LPAR3	Q9UBY5	Q9EQ31
<i>Ldlr</i>	LDLR	P01130	P35951
<i>Lxra</i>	LXR $\alpha$	Q13133	Q9Z0Y9
<i>Lxr<math>\beta</math></i>	LXR $\beta$	P55055	Q60644
<i>Mcoln1</i>	MCOLN1, TRPML1	Q9GZU1	Q99J21
<i>Mcoln2</i>	MCOLN2, TRPML2	Q8IZK6	Q8K595
<i>Npc1</i>	NPC1	O15118	O35604
<i>Npc2</i>	NPC2	P61916	Q9Z0J0
<i>Orai1</i>	ORAI1	Q96D31	Q8BWG9
<i>Orai2</i>	ORAI2	Q96SN7	Q8BH10
<i>Orai3</i>	ORAI3	Q9BRQ5	Q6P8G8
<i>Phb2</i>	PHB2	Q99623	O35129
<i>Ppar<math>\gamma</math></i>	PPARG	P37231	P37238
<i>Psen1</i>	PSN1	P49768	P49769
<i>Psen2</i>	PSN2	P49810	Q61144
<i>S1pr1</i>	S1PR1	P21453	O08530
<i>S1pr2</i>	S1PR2	O95136	P52592
<i>S1pr3</i>	S1PR3	Q99500	Q9Z0U9
<i>S1pr4</i>	S1PR4	O95977	Q9Z0L1
<i>S1pr5</i>	S1PR5	Q9H228	Q91X56

---

<i>Saa1</i>	SAA1	P0DJI8	P05366
<i>Saa2</i>	SAA2	P0DJI9	P05367
<i>Saa3</i>	SAA3	nicht exprimiert	P04918
<i>Saa4</i>	SAA4	P35542	P31532
<i>Scap</i>	SCAP	Q12770	Q6GQT6
<i>Sgpl1</i>	SGPL1	O95470	Q8R0X7
<i>Sgpp1</i>	SGPP1	Q9BX95	Q9JI99
<i>Sgpp2</i>	SGPP2	Q8IWX5	Q810K3
<i>Sphk1</i>	SPHK1	Q9NYA1	Q8CI15
<i>Sphk2</i>	SPHK2	Q9NRA0	Q9JIA7
<i>Spns1</i>	SPNS1	Q9H2V7	Q8R0G7
<i>Spns2</i>	SPNS2	Q8IVW8	Q91VM4
<i>Sptc1</i>	SPTC1	O15269	O35704
<i>Sptc2</i>	SPTC2	O15270	P97363
<i>Sptc3</i>	SPTC3	Q9NUV7	Q8BG54
<i>Sptssa</i>	SPTSA	Q969W0	Q8R207
<i>Sptssb</i>	SPTSB	Q8NFR3	Q925E8
<i>Srebp1</i>	SREBP1	P36956	Q9WTN3
<i>Srebp2</i>	SREBP2	Q12772	Q3U1N2
<i>Stim1</i>	STIM1	Q13586	P70302
<i>Stim2</i>	STIM2	Q9P246	P83093
<i>Tnf</i>	TNF	P01375	P06804
<i>Tpc1</i>	TPCN1	Q9ULQ1	Q9EQJ0
<i>Tpc2</i>	TPCN2	Q8NHX9	Q8BWC0
<i>Traf2</i>	TRAF2	Q12933	P39429

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundgerüst der Sphingolipide. ....	1
Abbildung 2: Strukturformeln und Schlüsselenzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels. ....	3
Abbildung 3: Signalweiterleitung von S1P. ....	6
Abbildung 4: Ausgewählte Sphingolipidosen. ....	20
Abbildung 5: Aufbau eines Leberläppchens. ....	22
Abbildung 6: Lokalisation wichtiger ABC-Transporter in Hepatozyten. ....	25
Abbildung 7: Strukturformel des Steroids Cholesterin. ....	26
Abbildung 8: Regulation der Cholesterinhomöostase. ....	29
Abbildung 9: Lokalisation der wichtigsten Calciumkanäle und -transporter in der Zelle. ....	31
Abbildung 10: Signalweg der Phosphoinositolkaskade. ....	32
Abbildung 11: Verifizierung des Calciumphänotyps <i>Sgp1</i> -defizienter Mausfibroblasten. ....	56
Abbildung 12: Schematische Übersicht eines Tango-Plasmids. ....	60
Abbildung 13: Signalweg im PRESTO-Tango-Versuch. ....	61
Abbildung 14: Schematischer Zellstoffwechsel. ....	62
Abbildung 15: Expression der S1P-Lyase in Leberhomogenaten. ....	67
Abbildung 16: Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere. ....	68
Abbildung 17: Leberschnitte gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin. ....	69
Abbildung 18: Leberenzyme bestimmt im Blut von <i>Sgp1</i> <sup>Kontrolle</sup> und <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen. ....	70
Abbildung 19: Blutzellzahlen der <i>Sgp1</i> <sup>Kontrolle</sup> und <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäuse. ....	71
Abbildung 20: S1P- und Sphingosinkonzentration in Leber und Plasma. ....	72
Abbildung 21: Altersvergleich der S1P- und Sphingosinakkumulation. ....	72
Abbildung 22: Ceramidspiegel in Leber und Plasma. ....	75
Abbildung 23: Expression der Ceramidsynthasen in der Leber. ....	75
Abbildung 24: Sphingolipidkonzentration in der Galle. ....	76
Abbildung 25: Glucosylceramidspiegel in der Galle. ....	77
Abbildung 26: Expression der <i>Sptlc</i> und zahlreicher Transporter in der Leber. ....	78
Abbildung 27: Konzentration an HDL-Cholesterin und Triglyceriden. ....	79
Abbildung 28: Plasmakonzentration an HDL- und LDL-Cholesterin. ....	79
Abbildung 29: Gesamtcholesterin und Desmosterol in Leber und Plasma. ....	80
Abbildung 30: Expression der HMGCR und des LDLRs in Leberhomogenaten. ....	81
Abbildung 31: Expression von PPAR $\gamma$ und APOM in Leberhomogenaten. ....	82
Abbildung 32: Expression zentraler Gene des Lipidstoffwechsels in Leberhomogenaten. ....	83
Abbildung 33: SGPL1- und PPAR $\gamma$ -Expression primärer Hepatozyten. ....	84
Abbildung 34: Färbung des Cholesterins und neutraler Lipide in primären Hepatozyten. ....	85
Abbildung 35: S1P-Sekretion primärer Hepatozyten. ....	86
Abbildung 36: Expression und Lokalisation der PMCA1 in MEFs. ....	87

Abbildung 37: Basigin Expression und Lokalisation in MEFs. ....	87
Abbildung 38: Expression der glykosylierten Basiginformen in MEFs. ....	88
Abbildung 39: Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-abhängige Atmung in <i>Sgp1</i> <sup>-/-</sup> MEFs. ....	89
Abbildung 40: SGPL1- und NPC1-Expression in Patientenfibroblasten. ....	90
Abbildung 41: Intrazelluläre Calciumkonzentration in Patientenfibroblasten (Suspension)....	91
Abbildung 42: Intrazelluläre Calciumkonzentration in Patientenfibroblasten (Einzelzellen). ..	91
Abbildung 43: Genexpressionsanalyse des SPLIS-Patienten im Vergleich zur Kontrolle. ....	92
Abbildung 44: Expression der PMCA1 in Patientenfibroblasten. ....	93
Abbildung 45: Färbung des Cholesterins und neutraler Lipide in Patientenfibroblasten. ....	94
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Lipidakkumulation und -sekretion in <i>Sgp1</i> <sup>HepKO</sup> Mäusen. ....	109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Ceramidsynthasen und ihre Spezifität .....	4
Tabelle 2: Identifizierte SPLIS Patienten und ihre Mutationen der <i>SGPL1</i> .....	9
Tabelle 3: Zellkulturmedium der kultivierten Zellen .....	34
Tabelle 4: Primäre Antikörper .....	35
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper .....	36
Tabelle 6: Plasmide .....	36
Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen der Genotypisierung .....	36
Tabelle 8: Oligonukleotidsequenzen der Ceramidsynthasen .....	37
Tabelle 9: Oligonukleotidsequenzen der Polymerase Kettenreaktion .....	37
Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Puffer .....	39
Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien .....	40
Tabelle 12: Reagenziensets .....	44
Tabelle 13: Geräte .....	44
Tabelle 14: Verwendete Software .....	45
Tabelle 15: Programm zur Entwässerung der Paraffinblöcke .....	48
Tabelle 16: Schema der Sondenbeschichtung der <i>TaqMan Array</i> Platten .....	54
Tabelle 17: Entparaffinierung der Paraffinschnitte .....	58
Tabelle 18: Verwendete Exzitationswellenlängen und Emissionsfilter .....	59

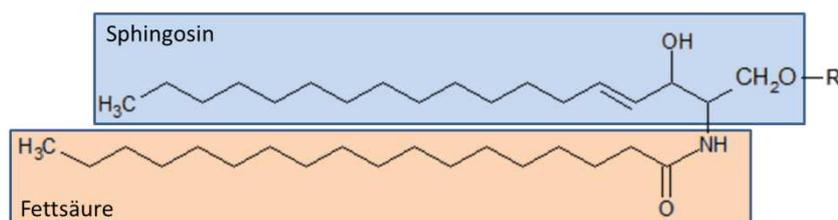
## 1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

Das nachfolgende Kapitel gibt einen Überblick über den theoretischen Hintergrund dieser Arbeit. Unter anderem wird eine Einführung in den Sphingolipid-Metabolismus, mit besonderem Augenmerk auf das Sphingosin-1-Phosphat (S1P), gegeben. Ebenfalls werden die Auswirkungen einer S1P-Lyase-Defizienz in Mensch und Maus detailliert betrachtet.

### 1.1 Sphingolipide

Die Stoffklasse der Sphingolipide wurde bereits in den 1880er Jahren durch den Arzt Johann Ludwig Wilhelm Thudichum beschrieben. Ihm gelang die Isolierung von Sphingolipiden aus Ochsen-, sowie Menschengehirnen. Er ordnete ihnen zunächst lediglich eine Funktion als reiner Speicherstoff zu (Thudichum 1884). Sphingolipide sind jedoch an zahlreichen grundlegenden Prozessen, wie Proliferation, Migration und Apoptose, beteiligt (Zhang et al. 1990; Obeid et al. 1993; Olivera und Spiegel 1993; Wang et al. 1999). Des Weiteren spielen die Metabolite des Sphingosins eine zentrale Rolle in zellulären Steuerungsprozessen, wie der Calciumhomöostase (siehe 1.6). Weiter zeigten Patton und Lester, dass mehr als 90 % der Sphingolipide in der Plasmamembran lokalisiert sind und mit einem Anteil von circa 30 % einen ubiquitären Bestandteil der Zellmembranen ausmachen (Patton und Lester 1991).

Die Gruppe der Sphingolipide (siehe Abbildung 1) unterscheidet sich lediglich durch einen Aminoalkohol als Grundgerüst von anderen Membranlipiden, wie den Glycerolipiden oder den Isoprenoiden. Die allgemeine Struktur eines Sphingolipids besteht aus einem Sphingosin-Grundgerüst und einer Fettsäure variabler Länge. Die Fettsäure ist kovalent mit ihrem C1-Atom an die Aminogruppe des Sphingosins (Amidbindung) gebunden. Die einzelnen Untergruppen der Sphingolipide unterscheiden sich an der primären Hydroxylgruppe durch einen variablen Rest R. Die Untergruppe der Ceramide besitzt an dieser Stelle ein Wasserstoffatom. Andere funktionale Gruppen, wie Phosphocholin oder ein Saccharidmolekül bilden Sphingomyelin oder Glycosphingolipide.



**Abbildung 1: Grundgerüst der Sphingolipide.** Die allgemeine Struktur eines Sphingolipids besteht aus einem Sphingosin-Grundgerüst und einer Fettsäure variabler Länge (exemplarisch C18), welche kovalent über eine Amidbindung verbunden sind. Der variable Rest R unterscheidet sich je nach Untergruppe (Ceramid, wenn R = Wasserstoff; Sphingomyelin, wenn R = Phosphocholin; Glycosphingolipid, wenn R = Saccharid).

### 1.1.1 Der Sphingolipid-Stoffwechsel

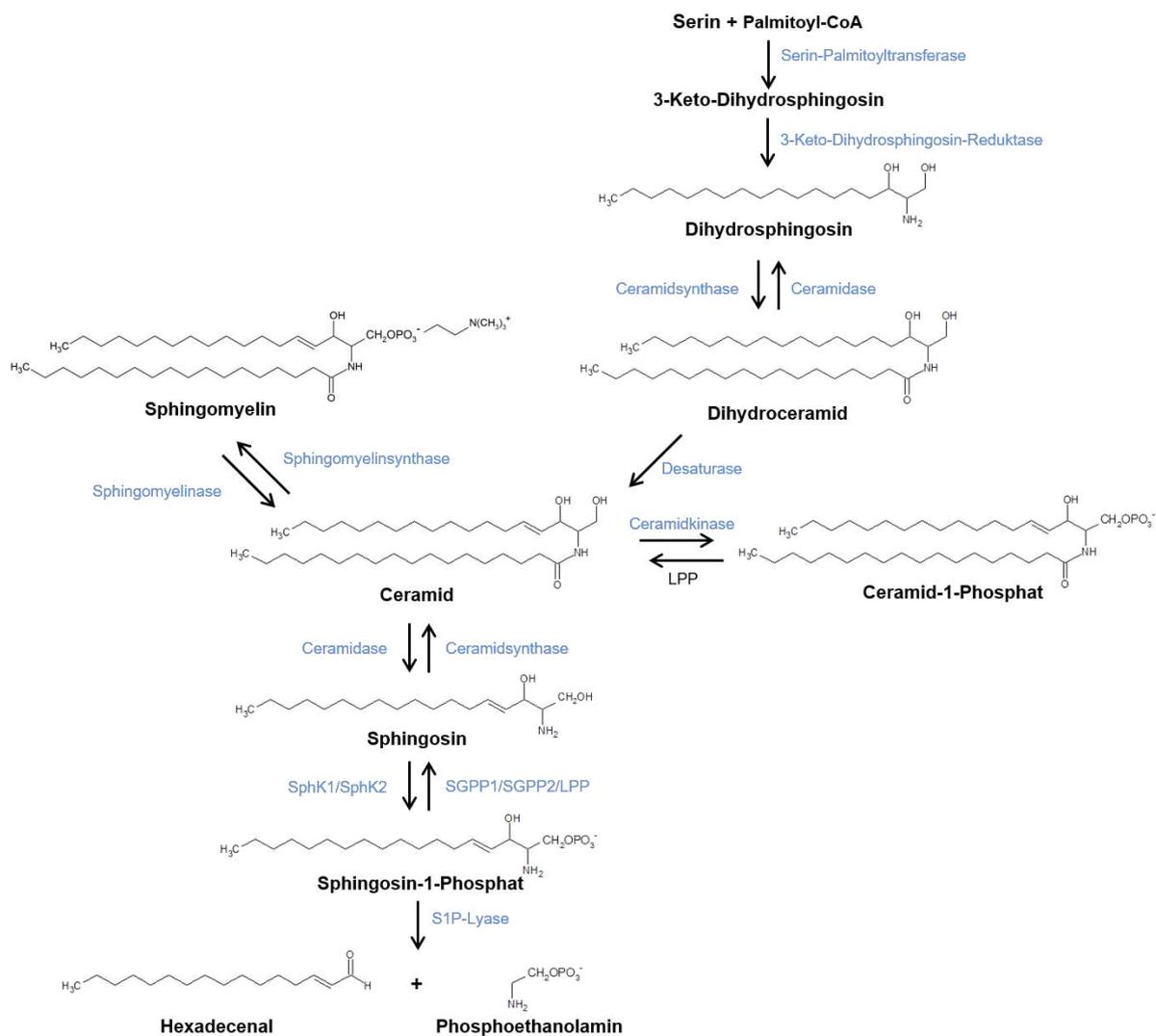
Der Sphingolipid-Stoffwechsel wird in zahlreichen Übersichtsartikeln dargestellt und diskutiert (Sweeley 1991; Hannun und Obeid 2008; Pitson 2011; Hannun und Obeid 2018).

Der erste Schritt des Sphingolipid-Metabolismus' ist die Ceramid *de novo* Synthese, welche auf der zytoplasmatischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) erfolgte (siehe Abbildung 2). Hierbei ist der initiale Schritt die Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Keto-Dihydrosphingosin (Springson und Coulon 1954; Weiss 1963). Diese Reaktion wird von der Serin-Palmitoyltransferase katalysiert (Hanada 2003). Nachfolgend wird 3-Keto-Dihydrosphingosin zu Dihydrosphingosin (Sphinganin) reduziert. Mittels einer der sechs bekannten Ceramidsynthasen (CERS1-6, siehe 1.1.2) erfolgt anschließend eine N-Acylierung des Dihydrosphingosins. Durch die geringe Substratspezifität der Ceramidsynthasen werden aktivierte Fettsäuren variabler Kettenlänge verbaut. Hierdurch entstehen abhängig von den verbauten Fettsäuren unterschiedliche Dihydroceramide (Guillas et al. 2001; Schorling et al. 2001; Wegner et al. 2016). Das Dihydroceramid wird nachfolgend zum entsprechenden Ceramid reduziert. Diese Reaktion wird von der Desaturase katalysiert (Michel et al. 1997).

Anschließend können die Ceramide vom ER zum Golgi-Apparat transportiert werden. Dies dient der Bildung von Sphingomyelin durch die Sphingomyelinsynthase oder alternativ dem Aufbau von komplexen Glycosphingolipiden im Lumen des Golgi-Apparats über das Zwischenprodukt Glucosylceramid. Sowohl Sphingomyelin als auch komplexe Glycosphingolipide können mit Hilfe von Vesikeln an die Plasmamembran transportiert werden (Hannun und Obeid 2018). Der Abbau von Spingomyelin zu Ceramiden und Phosphorylcholin geschieht hingegen über die Sphingomyelinase (sauer, alkalisch oder neutral je nach pH-Optimum) (Kanfer et al. 1965; Gatt et al. 1978; Chatterjee und Ghosh 1989; Spence et al. 1989; Schuchman et al. 1991). Dieser Signalweg wird unter anderem durch Stressfaktoren, wie UV-Strahlung, oxidativen Stress und den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), aktiviert (Charruyer et al. 2005; Li et al. 2012; Newcomb et al. 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur Metabolisierung von Ceramiden ist die Phosphorylierung durch die Ceramidkinase. Das entstehende Ceramid-1-Phosphat (C1P) kann die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) direkt aktivieren und hierdurch Arachidonsäure aus der Zellmembran freisetzen. Dementsprechend kann C1P die Eicosanoid-Signalwege und die Bildung der respektiven Substrate, wie Leukotriene, Prostaglandine oder Thromboxan beeinflussen (Pettus et al. 2004). Die direkte Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> durch Ceramide wurde ebenfalls beschrieben (Huwiler et al. 2001).

Der zweite Schritt des Sphingolipid-Metabolismus‘ beschreibt den Ceramidkatabolismus über Hexadecenal und Phosphoethanolamin (siehe Abbildung 2). Die Bildung von Sphingosin aus Ceramid, durch Abspaltung des variablen Fettsäurerests, wird durch die Ceramidase vermittelt. Mit Hilfe der Sphingosinkinasen 1 und 2 (SPHK1/SPHK2) wird unter ATP-Verbrauch Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) phosphoryliert. Sowohl S1P-spezifische S1P-Phosphatasen (SGPP1/SGPP2), als auch unspezifische Lipidphosphatphosphatasen (LPP) können S1P reversibel dephosphorylieren (Hannun und Obeid 2008; Pitson 2011). Zuletzt kann S1P irreversibel durch die S1P-Lyase am ER zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin abgebaut werden (van Veldhoven und Mannaerts 1991; Ikeda et al. 2004).



**Abbildung 2: Strukturformeln und Schlüsselenzyme des Sphingolipid-Stoffwechsels.** Vereinfachte Darstellung des *de novo* Sphingolipid-Stoffwechsels, sowie des katabolen Sphingolipid-Stoffwechsels. Die N-Acetylierung des Dihydrosphingosins durch Ceramidsynthasen führt zu einer Reihe verschiedener Dihydroceramide, abhängig von der Kettenlänge der angehängten Fettsäure. Die Abbildung zeigt den Mechanismus exemplarisch für C18-(Dihydro-) Ceramid-Metabolite. CoA, Coenzym A; LPP, Lipidphosphat-Phosphatasen; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; SGPP1, S1P-Phosphatase 1; SGPP2, S1P-Phosphatase 2; SPHK1, Sphingosinkinase 1; SPHK2, Sphingosinkinase 2.

### 1.1.2 Ceramide

Ceramide stehen im Mittelpunkt des 'Sphingolipid-Metabolismus' und bilden das Grundgerüst komplexer Sphingolipide, wie zum Beispiel Sphingomyelin (siehe 1.1.1). Neben der strukturellen Funktion der Ceramide in der Zellmembran, zählen sie als sekundäre Botenstoffe ebenfalls zur Gruppe der bioaktiven Lipide und übernehmen wichtige Aufgaben bei Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Entzündungen (Okazaki et al. 1990; Dobrowsky und Hannun 1992; Obeid et al. 1993; Hannun 1996; Teichgräber et al. 2008; Mullen und Obeid 2012). Des Weiteren spielen Ceramide eine wichtige Rolle bei zahlreichen Krankheiten. Hierzu zählen verschiedene Krebsarten, zystische Fibrose, aber auch neurodegenerative Krankheiten, wie HIV-assoziierte Demenz und Alzheimer (Cutler et al. 2004a; Cutler et al. 2004b; Ogretmen und Hannun 2004; Teichgräber et al. 2008). Eine detaillierte Übersicht liefern Ben-David und Futermann (Ben-David und Futerman 2010).

Die Bildung der Ceramide wird von sechs humanen Ceramidsynthasen mit unterschiedlicher Spezifität katalysiert (siehe Tabelle 1). Die Produkte der Ceramidsynthasen unterscheiden sich strukturell anhand der Kettenlänge ihres Fettsäurerestes am Stickstoffatom (Pitson 2011; Grösch et al. 2012).

**Tabelle 1: Humane Ceramidsynthasen und ihre Spezifität**

Ceramidsynthase	Kettenlänge des Ceramids
CERS 1	C18/C20
CERS 2	C20-C26
CERS 3	C18-C32
CERS 4	C18/C20
CERS 5	C16
CERS 6	C14/C16/C18

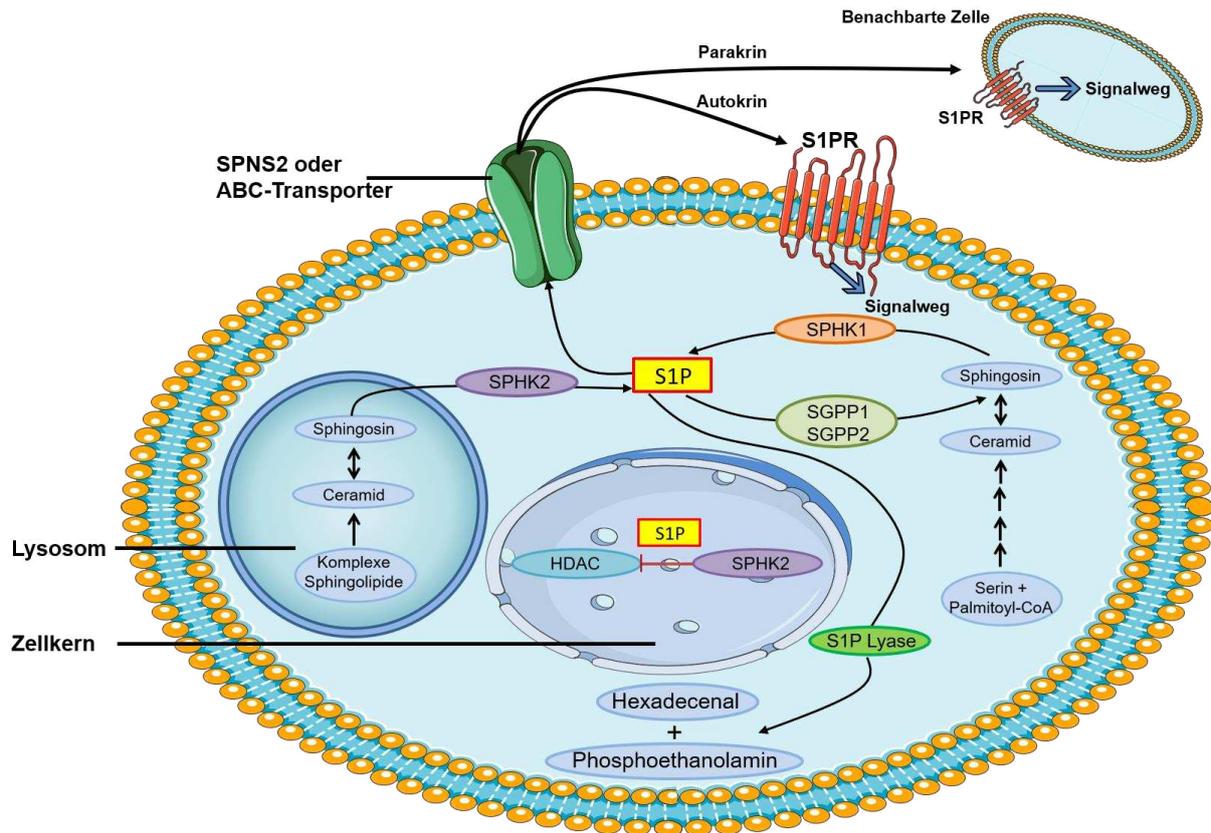
Zahlreiche Eigenschaften der Ceramide sind von ihrer Kettenlänge abhängig, beispielsweise ob sie einen proliferatorischen oder einen apoptotischen Effekt besitzen. Grösch et al. geben einen Überblick über zahlreiche Ceramide sowie ihren Apoptose- und Wachstumseffekt in Tumoren (Levy und Futerman 2010; Grösch et al. 2012). Studien zeigten, dass das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Ceramiden abhängig von ihrer Kettenlänge eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Autophagie und der Apoptose spielt. Ceramide mit einer Kettenlänge von C24:0, sowie C24:1 beispielsweise wirken schützend. Das Ceramid C16:0 hingegen begünstigt die Apoptose (Hartmann et al. 2012). Die CERS2 katalysiert die Synthese von sehr langkettigen Ceramiden. Im Vergleich zu anderen Organen, wie dem Herzen, wird sie vor allem in der Leber und den Nieren stark exprimiert (Levy und Futerman 2010; Grösch et al. 2012).

### 1.1.3 Bioaktives Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

Ein wichtiges Signalmolekül der Sphingolipide ist das Lysosphingolipid S1P. S1P steht in einem Gleichgewicht mit Ceramiden und Sphingosin. Hierbei werden den Ceramiden und dem Sphingosin eine pro-apoptotische, hingegen dem S1P eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben (Cuvillier et al. 1996). S1P beeinflusst somit sowohl Proliferation, Zellüberleben, als auch Migration der Zelle (Zhang et al. 1991; Olivera und Spiegel 1993; Cuvillier et al. 1996; Wang et al. 1999). Das sogenannte *Sphingolipid rheostat model* besagt, dass das Verhältnis von Sphingosin und Ceramid zu S1P entscheidet, ob eine Zelle in den programmierten Zelltod geht (Cuvillier et al. 1996). Heutzutage weist diese Theorie jedoch komplexere Zusammenhänge auf (Newton et al. 2015).

Kihara et. al. zeigten 2003 mit Hilfe radioaktiver Untersuchungen, dass extrazelluläres S1P in embryonalen Karzinomzellen nicht über die Zellmembran aufgenommen werden kann (Kihara et al. 2003). Im Gegensatz dazu kann S1P jedoch über ABC-Transporter, wie ABCA1, ABCC1 und ABCG2, sowie den spezifischen S1P-Transporter Spinster 2 (SPNS2) aus dem Zytosol in den Extrazellularraum transportiert werden (Mitra et al. 2006; Sato et al. 2007; Kawahara et al. 2009; Takabe et al. 2010). Das extrazelluläre S1P kann sowohl autokrin als auch parakrin G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aktivieren (siehe Abbildung 3). Die Wirkungsweise von GPCRs ist unter 1.1.4 genauer beschrieben.

Einerseits hat S1P, wie zuvor beschrieben, eine extrazelluläre Wirkung als Agonist an GPCRs, andererseits konnte gezeigt werden, dass S1P auch intrazellulär wirken kann. Als Cofaktor des „*tumor-necrosis factor receptor-associated factor 2*“ (TRAF2) ist S1P ein indirekter Aktivator des proliferatorischen Transkriptionsfaktors „*nuclear factor κB*“ (NF-κB) (Alvarez et al. 2010). Des Weiteren hat das durch SPHK2 gebildete S1P in den Mitochondrien und im Zellkern intrazelluläre Zielstrukturen, wie Prohibitin 2 (PHB2) und die Histon-Deacetylasen HDAC1 und HDAC2. PHB2 ist für die korrekte Funktion der Mitochondrien, sowie die Aktivität des für die Atmungskette essentiellen Bestandteils Cytochrom-c-Oxidase (COX) verantwortlich (Strub et al. 2011). HDAC1 und HDAC2 können direkt durch im Zellkern metabolisiertes S1P gehemmt werden. Somit wirkt sich die zelluläre S1P-Konzentration direkt auf die epigenetische Genomregulation aus (siehe Abbildung 3) (Hait et al. 2009). Des Weiteren beschrieben Panneer Selvam et al. die Stabilisierung der humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) durch direkte S1P-Bindung. Diese allosterische Nachahmung der Proteinphosphorylierung beeinflusst die Regulation der telomerabhängigen Kontrolle von Telomerschäden und verzögert die zelluläre Seneszenz (Panneer Selvam et al. 2015). Das Signalmolekül S1P kann daher sowohl extrazellulär als Agonist an GPCRs, als auch intrazellulär als sekundärer Botenstoff wirken.



**Abbildung 3: Signalweiterleitung von S1P.** S1P steuert Prozesse sowohl autokrin als auch parakrin über S1P-Rezeptoren. S1P wird durch den Abbau komplexer Sphingolipide generiert und irreversibel durch die S1P-Lyase abgebaut. Durch SPNS2 und ABC-Transporter kann S1P exportiert werden. Intrazellulär in einem Komplex mit der SPHK2 hemmt S1P HDAC1 und HDAC2. ABC-Transporter, *adenosine triphosphate binding cassette-transporter*; CoA, Coenzym A; HDAC, Histon-Deacetylase; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; S1PR, S1P-Rezeptoren; SGPP1, S1P-Phosphatase 1; SGPP2, S1P-Phosphatase 2; SPHK1, Sphingosinkinase 1; SphK2, Sphingosinkinase 2; SPNS2, Spinster 2.

Die Konzentration des ubiquitär vorkommenden S1Ps ist, im Gegensatz zu Geweben, im Blutplasma sehr hoch (0,2 – 0,9  $\mu\text{M}$ ) (Yatomi et al. 1995; Yatomi et al. 1997a; Edsall und Spiegel 1999; Murata et al. 2000). Zwischen Gewebe und Blut entsteht dadurch ein Konzentrationsgradient, der essentiell für die Lymphozytenmigration ist (Schwab et al. 2005). Im Blutplasma liegt das S1P nicht frei, sondern in Komplexen mit anderen Proteinen, vor. Der Großteil des S1Ps, mit circa 97 %, ist in *high density lipoproteins* (HDL-) Partikeln gebunden (Murata et al. 2000; Sattler et al. 2010). Hierbei ist hauptsächlich das Apolipoprotein M (ApoM) der Bindungspartner (Christoffersen et al. 2011). Weitere Bindungspartner sind unter anderem *very low density lipoprotein* (VLDL-) und *low density lipoprotein* (LDL-) Partikel. S1P kann ebenso in einem Komplex gebunden an Albumin vorliegen (Aoki et al. 2005).

#### 1.1.4 Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs)

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bilden eine wichtige Klasse der Membranrezeptoren. Sie übertragen extrazelluläre Signale in das Zellinnere und sind somit verantwortlich für unterschiedlichste Signale, wie Duftstoffe, Geschmacksstoffe, Hormone, Photonen oder Neurotransmitter (Rosenbaum et al. 2009). Auf Grund ihrer sieben Transmembrandomänen, welche durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind, zählen die GPCRs zur Superfamilie der heptahelikalen Transmembranproteine. Sie besitzen eine Ligandenbindungsdomäne und koppeln intrazellulär an G-Proteine.

Bereits im Jahr 1990 beschrieben Hla und Maciag das „*endothelial differentiation gene*“ (*edg*), welches auf Grund seiner Struktur als GPCR identifiziert wurde. Später wurden die Lipide S1P und Lysophosphatidsäure (LPA) als Agonisten der Rezeptoren der Edg-Gruppe identifiziert. (Hla und Maciag 1990) Inzwischen umfasst die Gruppe der Edg-Rezeptoren acht GPCRs, welche spezifische LPA- oder S1P-Rezeptoren sind. Fünf dieser GPCRs zählen zur S1P-Rezeptorfamilie und werden als S1P<sub>1-5</sub>-Rezeptoren bezeichnet (An et al. 1997; Lee et al. 1998; Zondag et al. 1998; Chun et al. 2002; Im 2010).

Zahlreiche Zusammenfassungen gehen genauer auf die Wirkung dieser Rezeptoren ein und beschreiben unter anderem den Einfluss der S1P-Rezeptoren auf die Funktionen des kardiovaskulären Systems, des Immunsystems, des Nervensystems und zahlreicher Organe (Marsolais und Rosen 2009; Maceyka et al. 2012; Rosen et al. 2013; Meacci und Garcia-Gil 2019). Die S1P-Rezeptoren stellen, auf Grund ihrer Expression in verschiedenen Geweben und ihrer unterschiedlichen Signalweiterleitung über diverse G-Proteine, einen möglichen Angriffspunkt für Therapeutika dar. Beispielsweise dient Fingolimod (Gilenya®, Novartis), ein Struktur analogon des Sphingosins, zur Therapie von multipler Sklerose. Fingolimod kann über die S1P-Signalwege die chemotaktische Reaktion und die Lymphozytenwanderung beeinflussen (Brinkmann et al. 2002). Eine sehr detaillierte Zusammenfassung über das Therapeutikum Fingolimod, seine Wirkung und Zielstrukturen geben Huwiler et al. (Huwiler und Zangemeister-Wittke 2018).

#### 1.1.5 Sphingosin-1-Phosphat Lyase (SGPL)

Das Enzym Sphingosin-1-Phosphat Lyase katalysiert den letzten Schritt des Sphingolipidkatabolismus und spaltet S1P dadurch irreversibel (van Veldhoven und Mannaerts 1991; Saba et al. 1997). Die humane S1P-Lyase weist eine Molekularmasse von 63,5 kDa und eine Sequenzhomologie von 92 % zum murinen Homolog auf (van Veldhoven et al. 2000; Fyrst und Saba 2008). Die S1P-Lyase gehört zur Klasse der Pyridoxal 5'-Phosphat abhängigen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Lyasen, genauer zur Unterklasse der Aldehydlyasen. Das

Enzym wirkt auf die Derivate von Sphingoidbasen, die eine Phosphatgruppe an der ersten Position besitzen. Als Spaltprodukte entstehen ein aliphatisches Fettaldehyd sowie ein Ethanolaminphosphat. (van Veldhoven und Mannaerts 1991) Jedoch wird jeweils nur das D-(+)-Erythro-Isomer der Substrate erkannt, da diese Konfiguration der natürlich vorkommenden Sphingoidbasen darstellt (Stoffel und Bister 1973; van Veldhoven und Mannaerts 1991).

Die S1P-Lyase gehört zur Familie der Singlepass-Typ-III-Membranproteine, die auch als Typ-I ohne spaltbare N-terminale Signalsequenz bezeichnet werden (van Veldhoven und Mannaerts 1991; Ikeda et al. 2004). Diese Membranproteine besitzen lediglich ein Transmembransegment, welches in der Nähe des N-Terminus liegt und dem ER-Lumen zugewandt ist. Die katalytische Domäne hingegen ist dem Zytosol zugewandt und erleichtert so die Verfügbarkeit des Substrats für das aktive Zentrum (van Veldhoven und Mannaerts 1991). Die Enzymaktivität wird auf mehreren Ebenen reguliert, einschließlich epigenetischer, transkriptionaler und posttranslationaler Regulation. Ebenfalls konnten mehrere Proteinkinase-spezifische Phosphorylierungsstellen (7 Ser-, 3 Thr- und 7 Tyr-Reste) durch Proteinsequenzanalyse vorhergesagt werden, obwohl diese Tatsache experimentell noch nicht verifiziert werden konnte (Huang et al. 2005).

Säugetiere exprimieren die S1P-Lyase in vielen Geweben unterschiedlich stark, mit Ausnahme von Thrombozyten und Erythrozyten (Yatomi et al. 1997b; Ito et al. 2007). Mäuse und Ratten beispielsweise exprimieren die S1P-Lyase vor allem in Thymus, Dünndarm, Haut und Leber. Wohingegen die Expression beispielsweise im Gehirn deutlich geringer ist (Genter et al. 2003; Serra und Saba 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines rekombinanten humanen SGPL1-GFP Fusionsproteins in HEK293-Zellen sowohl Apoptose als auch die Produktion Stress-bedingter Ceramide verstärken kann (Reiss et al. 2004). Die S1P-Lyase ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase und angemessene Reaktionen auf das Zellschicksal. Deshalb wird angenommen, dass die Dysregulation der S1P-Lyase zu Krankheiten, wie Krebs, beitragen kann. Sie könnte hierbei eine zentrale Rolle spielen, da sie in zahlreichen Tumoren herabreguliert ist (Oskouian et al. 2006; Bandhuvula und Saba 2007).

## **1.2 Sphingosin-1-Phosphat Lyase Defizienz**

Zahlreiche Krankheiten können mit dem Sphingolipidmetabolismus assoziiert werden. In den nachfolgenden Unterpunkten wird ein besonderes Augenmerk auf die Defizienz der

S1P-Lyase gesetzt. Hierbei wird ebenfalls auf das humane S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom (SPLIS) im Menschen, sowie den Knockout in Mäusen näher eingegangen.

### 1.2.1 Humanes-S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom (SPLIS)

Im Jahr 2017 berichteten mehrere Gruppen unabhängig voneinander über ein neuartiges Syndrom im Kindesalter (Atkinson et al. 2017; Janecke et al. 2017; Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017; Bamborschke et al. 2018; Linhares et al. 2018). Alle Fälle konnten auf eine rezessive Mutation des Gens *SGPL1*, welches die S1P-Lyase kodiert, zurückgeführt werden. Verschiedene Mutationen, welche zur humanen Krankheit SPLIS führen, konnten nachgewiesen werden. Jedoch treten starke Unterschiede in Stärke, Phänotyp und Art der Symptome auf. Die aktuell identifizierten Mutationen, der jeweilige Phänotyp, sowie die dazugehörige Referenz sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Identifizierte SPLIS Patienten und ihre Mutationen der *SGPL1***

Mutation	Phänotyp	Tod	Referenz
c.7dup; p.Ser3Lysfs*11	Ichthyose, NI, SRNS	1/3 0/1	Lovric et al. Prasad et al.
c.44A>G; Y15C	Leukozytose, Thrombozytose, neurologische Symptome	0/1	Zhao et al.
c.261+1G>A; p.S65Rfs*6	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	0/2	Prasad et al.
c.395A>G; p.Glu132Gly c.832delA; p.Arg278Glyfs*17	Ichthyose, NI, SRNS	0/2	Lovric et al.
c.511A>G; p.N171D	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	1/1	Maharaj et al.
c.551T>C; p.Ile184Thr c.1082C>G; p.Ser361*	Periphere Neuropathie	0/2	Atkinson et al.
c.605C>T; p.Ser202Leu c.946G>A; p.Ala316Thr	Periphere Neuropathie, SRNS, Immunschwäche	0/1 0/1	Lovric et al. Zhao et al.
c.664C>T; p.Arg222Trp	NI, SRNS, 2x fötaler Tod	4/4	Lovric et al.
c.665G>A; Arg222Gln	NI, SRNS, neurologische Symptome	1/3 0/4 0/2 0/1	Lovric et al. Prasad et al. Settas et al. Zhao et al.

c.868T>C; p.Phe290Leu c.993C>G; p.Tyr331*	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	1/1	Taylor et al.
**c.934delC; p.Leu312Phefs*30	NI, SRNS	0/1	Janecke et al.
c.1018C>T; p.Arg340Trp	NI, SRNS	2/2	Linhares et al.
c.1037G>T; p.Ser346Ile	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche, 2x fötaler Tod	5/5	Lovric et al.
c.1077del; G360Afs*49 c.1058A>G; K353R	NI, Lymphopenie, neurologische Symptome	1/1	Zhao et al.
c.1079G>T; G360V	SRNS, Niereninsuffizienz, neurologische Symptome,	1/1 1/1	Zhao et al. Saygili et al.
c.1233delC; p.Phe411Leufs*56	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	1/1	Bamborschke et al.
c.1247A>G; p.Tyr416Cys	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	0/1	Lovric et al.
c.1513C>T; p.Arg505*	NI, SRNS	2/2	Janecke et al.
c.1566+2T>C c.854G>A; C285Y	NI, Lymphopenia, Hydrops fetalis, neurologische Symptome	1/1	Zhao et al.
c.1633_1635delTTC; p.F545del	Ichthyose, NI, SRNS, neurologische Symptome, Immunschwäche	1/1	Prasad et al.

\* SRNS, Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom; NI, Nebenniereninsuffizienz

\*\* Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fibroblasten dieser Patienten analysiert.

Quellen der veröffentlichten Mutationen: (Atkinson et al. 2017; Janecke et al. 2017; Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017; Bamborschke et al. 2018; Linhares et al. 2018; Settas et al. 2019; Taylor et al. 2019; Maharaj et al. 2020b; Zhao et al. 2020; Saygili et al. 2019a, 2019b).

Insgesamt konnten unter 46 Patienten (vier bereits als Fötus verstorben) 26 verschiedene Mutationen identifiziert werden. Das Geschlechterverhältnis beträgt 3:2 (m:w) und 23 der SPLIS Patienten sind inzwischen verstorben, vier von ihnen bereits vor der Geburt (Stand November 2021). Während die meisten Mutationen jeweils nur in einer Familie beobachtet wurden, konnten homozygote Mutationen, die das Arg222 betreffen, in circa 30 % der SPLIS-Fälle identifiziert werden. Das Arginin trägt zum einen beispielsweise zu

Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Aminosäuren an der Dimer-Grenzfläche und zum anderen zur Stabilisierung der Struktur an der katalytischen Stelle bei. Einige SGPL1-Mutationen führen neben einer Reduzierung der Wasserstoffbrückenbindungen gleichzeitig zu sterischen Konflikten und/oder beeinflussen direkt das cofaktorbindende Lysin. Diese Mutationen scheinen die Bedingung für die schlechtesten klinischen Ergebnissen zu sein. Eine detaillierte Zusammenfassung über die Interaktion der bisher aufgeklärten Mutationen und ihrem SPLIS-Phänotyp liefern Choi et al., Maharaj et al., sowie Saba et al. (Choi und Saba 2019; Maharaj et al. 2020b; Saba et al. 2021).

Choi und Saba fassten 2019 den aktuellen Stand der Erforschung der SPLIS Erkrankung zusammen. Sie berichteten, dass die Inaktivierung der S1P-Lyase eine Reihe molekularer Effekte auf die kodierende mRNA und das Protein selbst hat. Interessanterweise gehören dazu sowohl Missense-Mutationen, welche die Lokalisation, Stabilität oder katalytische Aktivität des Proteins beeinflussen, aber auch Mutationen, die zu Proteintrunkierung, Frameshifts, Nonsense-vermitteltem mRNA-Zerfall und Spleißdefekten führen. Jedoch konnte bisher keine Hemmung der Proteindimerisierung festgestellt werden. Anhand der Vielzahl an Mutationen lässt sich das breite Spektrum an Schweregraden und Phänotypen erklären (Choi und Saba 2019).

Die *Sgpl1* Defizienz beschreibt eine multisystemische Krankheit, bei der überwiegend Nierenproblemen auftreten. Dies lässt sich durch die hohe *Sgpl1*-Expression im ER glomerulärer Nierenzellen (Podozyten, Mesangialzellen und Endothelzellen) erklären (Lovric et al. 2017). Eines der Hauptsymptome ist das Steroid-resistente nephrotische Syndrom (SRNS). Hinter einem angeborenen nephrotischen Syndrom (NS) verbirgt sich eine chronische Nierenerkrankung, deren Symptome vor oder unmittelbar nach der Geburt auftreten. Zu den Symptomen zählen unter anderem massive Proteinurie mit daraus resultierender Hypoalbuminämie. Diese wiederum führt zur Ausbildung von Ödemen (Kark et al. 1958). Der Zusammenhang dieser Symptome wurde bereits 1830 von Richard Bright beschrieben (Bright 1831; Osman 1937). SRNS wird diagnostiziert, wenn Patienten mit nephrotischem Syndrom nicht mehr auf die standardisierte Therapie mit Glukokortikoiden ansprechen. Dies führt häufig zu Nierenversagen und hat eine Dialyse oder Nierentransplantation zur Folge (Hoefele et al. 2018; Linhares et al. 2018).

Des Weiteren leiden zahlreiche Patienten unter einer primären Nebenniereninsuffizienz (NI). Diese lebensbedrohliche Erkrankung ist definiert durch die Unfähigkeit der Nebennierenrinde Hormone, wie Cortisol, in ausreichender Menge zu produzieren. Häufige Symptome sind unter anderem Anorexie, Gedeihstörungen, Salzsucht, Müdigkeit und Schwäche (Keele 1969; Ellis 2009; Linhares et al. 2018; Martin-Grace et al. 2020).

Mit insgesamt neun identifizierten Mutationen der S1P-Lyase in sieben unterschiedlichen Familien untersuchten Lovric et al. die größte Kohorte. Die Mutationen wurden mittels Exom-Sequenzierung (WES, *whole exome sequencing*) eines weltweiten Patientensatzes mit diagnostiziertem SRNS identifiziert (Lovric et al. 2017). Nierenbiopsien der Patienten wiesen chronische Veränderungen, unter anderem fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und diffuse mesangiale Sklerose auf. Zusätzlich wurden Ichthyose, Nebenniereninsuffizienz und andere endokrine oder gonadale Defekte, sowie neurologische Defizite diagnostiziert. Etwa die Hälfte der Patienten wies schwere Immunschwäche mit manifestierter Lymphopenie und multiple bakterielle Infektionen auf (Lovric et al. 2017).

Prasad et al. untersuchten in ihrer Studie insgesamt acht Patienten aus fünf verschiedenen Familien im Kindes- und Jugendalter. Sie identifizierten hierbei vier weitere homozygote Mutationen der S1P-Lyase, welche mit Nebenniereninsuffizienz und SRNS assoziiert werden konnten (Prasad et al. 2017). Im Gegensatz zu den Patienten mit homozygoten *SGPL1*-Mutationen wiesen die heterozygoten Eltern keine Beeinflussung auf. In dieser Studie entwickelten nahezu alle untersuchten Patienten bereits im Kindesalter eine Nebenniereninsuffizienz und somit benötigte mehr als die Hälfte eine Nierentransplantation. Teilweise wurden neurologische Auffälligkeiten in Bezug auf sprachliche, grobmotorische und soziale Fähigkeiten nachgewiesen (Prasad et al. 2017). Des Weiteren wiesen diese Patienten unter anderem auch Ichthyosis, Hypothyreose und eine Lageanomalie des Hodens (Kryptorchismus) auf (Prasad et al. 2017). Der durch Mutation verursachte Funktionsverlust der S1P-Lyase hatte ebenfalls als Konsequenz, dass S1P- und Ceramidlevel, sowie Cholesterin und Triglyceride im Serum der Patienten stark erhöht waren. Zwei der untersuchten Patienten litten an Lymphopenie (Prasad et al. 2017).

Atkinson et al. konnten den Zusammenhang des Funktionsverlusts der S1P-Lyase mit der Krankheit Charcot-Marie-Tooth (CMT) nachweisen (Atkinson et al. 2017). CMT ist eine sich oft im Kindesalter manifestierende, erbliche periphere Neuropathie mit fortschreitender Muskelschwäche (Atkinson et al. 2017). In dieser Studie wurde ein Geschwisterpaar mit einer atypischen Form der axonalen peripheren Neuropathie untersucht und gezeigt, dass der Phänotyp auf den teilweisen Verlust der *SGPL1*-Funktion zurückzuführen ist (Atkinson et al. 2017). Genau wie Prasad et al. wiesen auch Atkinson et al. deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen an S1P, sowie ein erhöhtes Verhältnis von Sphingosin zu Dihydro-Sphingosin nach (Atkinson et al. 2017; Prasad et al. 2017). Des Weiteren wurde die neuronenspezifische Herunterregulierung des S1P-Lyase Orthologons *Sply* in *Drosophila melanogaster* untersucht. Dies führte zu einer verminderten Lebensfähigkeit und zur Behinderung der Ausbildung motorischer Endplatten und einer progressiven

Neurodegeneration (Atkinson et al. 2017; Lovric et al. 2017). Diese Ergebnisse suggerieren, dass ein teilweiser Verlust der *SGPL1*-Funktion zu einer ausgeprägten Form der CMT führen kann.

Zwei weitere homozygote, trunkierende *SGPL1*-Mutationen stehen in Verbindung mit Nebennierenverkalkung, Hypogonadismus und Gefäßveränderungen in Kombination mit einem angeborenem nephrotischem Syndrom (Janecke et al. 2017). Auf Grund des angeborenem nephrotischen Syndroms wiesen die Patienten eine massive Proteinurie, Hypoalbuminämie und allgemeines Ödem auf, welches sich innerhalb der ersten drei Lebensmonate manifestierte (Janecke et al. 2017). Diese Patienten wiesen ebenfalls erhöhte Spiegel an S1P und Sphingosin im Blut sowie in den Fibroblasten auf (Janecke et al. 2017).

Eine weitere Mutation wurde bei einem dreijährigen Mädchen mit diagnostiziertem nephrotischen Syndrom und Nebenniereninsuffizienz identifiziert (Linhares et al. 2018). Des Weiteren litt sie unter Proteinurie und wies erhöhte Werte an Triglyceriden, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin auf. Sie verstarb im Alter von nicht einmal vier Jahren (Linhares et al. 2018). Der Bruder des Mädchens wies denselben Phänotyp auf und verstarb ebenfalls frühzeitig (Pezzuti et al. 2014). Bamborschke et al. beschrieben einen weiteren Patienten mit angeborenem nephrotischem Syndrom und Nebenniereninsuffizienz sowie einer angeborenem Hirnfehlbildung und Hydrops fetalis (FH) (Bamborschke et al. 2018). Der betroffene Patient wies zahlreiche weitere Symptome auf, unter anderem Hypothyreose, adrenale Verkalkungen und Immunschwäche mit Lymphopenie. Er verstarb im Alter von sechs Wochen (Bamborschke et al. 2018).

Vor Kurzem konnten weitere Studien zwei neue *SGPL1*-Mutationen identifizieren (Taylor et al. 2019; Maharaj et al. 2020b). Hierbei konnte eine Verknüpfung zwischen SPLIS und einer mitochondrialen Dysregulation, einschließlich einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials und der Einleitung der mitochondrialen Apoptose, hergestellt werden (Maharaj et al. 2020a).

Zum aktuellen Zeitpunkt können lediglich die Symptome von SPLIS-Patienten behandelt werden und nicht die Ursache, da noch keine adäquate und universelle Therapiemöglichkeit besteht. Jedoch sind erste Ansatzpunkte für neue Therapiemöglichkeiten vorhanden.

Der *SGPL1*-Cofaktor Pyridoxal-5-Phosphat (PLP), welcher die aktive Form des Vitamin B6 darstellt, kann bei angeborenem Stoffwechselstörungen, an denen PLP-abhängige Enzyme beteiligt sind, als Chaperon fungieren (Cellini et al. 2014). Zhao et al. untersuchten kürzlich die Supplementierung mit supraphysiologischer Vitamin B6 Konzentrationen als eine erste

Behandlungsmöglichkeit bei SPLIS. Diese Therapie hat bei zwei der vier Studienteilnehmer angeschlagen und konnte den Verlust an Wasserstoffbrückenbindungen kompensieren. Des Weiteren verbesserte diese Behandlung die Proteinfaltung und -stabilität, sowie die kinetische Aktivität der SGPL1. Wie zuvor beschrieben, wurde in ca. 30 % der SPLIS-Patienten eine homozygote Mutation, die das Arg222 betrifft, identifiziert. Diese Mutation führt zu einer Verzerung der Helix, die an der Cofaktor-Bindung beteiligt ist, und reduziert somit die PLP-Affinität erheblich. Eine effektive Wirkung der Vitamin B6 Therapie konnte bei einem Patienten mit R222Q Variante nachgewiesen werden. Zhao et al. beschrieben mit ihrer Studie zur Cofaktor-Supplementierung somit das erste vielversprechende Therapeutikum zur Behandlung von SPLIS, auf die circa 30 % der Patienten ansprechen könnten (Zhao et al. 2020).

Eine weitere universelle Methode zur Behandlung von SPLIS stellt die Adeno-assoziierte Virus 9-vermittelte Übertragung des menschlichen SGPL1 (AAV-SGPL1) dar. Zhao et al. prüften diese Methode in einem Mausmodell. Hierbei wurde globalen *Sgpl1* Knockoutmäusen das AAV-SGPL1 ein bis zwei Tage nach der Geburt intravenös injiziert. Diese Mäuse hatten eine deutlich verlängerte Lebensdauer und die frühe AAV-SGPL1 Behandlung verhinderte Nephrose, Lipidose, neurologische Beeinträchtigungen, sowie die verzögerte Entwicklung der Mäuse. Diese Studie diente einem sogenannten „*proof of concept*“ und ist der erste Schritt für eine neue universelle Behandlungsmethode (Zhao et al. 2021).

Zusammenfassend beschreibt SPLIS einen neu erkannten und oft tödlich verlaufenden angeborenen Fehler im Fettstoffwechsel. Anhand der zuvor beschriebenen Studien werden die speziesübergreifende Bedeutung des Sphingolipidstoffwechsels und die multisystemische Auswirkung einer SGPL1 Defizienz für die neuronale Funktion, sowie Erkrankungen der Niere deutlich (Atkinson et al. 2017; Janecke et al. 2017; Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017; Bamborschke et al. 2018; Linhares et al. 2018; Maharaj et al. 2020b). Diese Berichte bestätigen eine wichtige und bisher unerkannte Rolle der S1P-Lyase in der Nebenniere, welche mit Nebennierenverkalkung und vaskulären Anomalien assoziiert ist.

### **1.2.2 *Sgpl1*-defiziente Mäuse**

Die Bedeutung der S1P-Lyase wird bei der genauen Betrachtung von *Sgpl1* Knockoutmäusen sehr deutlich. Zahlreiche Studien beschreiben einen ausgeprägten Phänotyp. Dazu gehören Wachstumsstörungen, der Tod in den ersten Lebenswochen und ein deutlich verringertes Körpergewicht in Kombination mit stark reduziertem Fettgewebe (Schmahl et al. 2007; Vogel et al. 2009; Bektas et al. 2010; Allende et al. 2011). Darüber hinaus wurden multiple Organschädigungen einschließlich Gefäß- und Skelettfehlbildungen, neurologische

Entwicklungsverzögerungen und Glukokortikoidmangel, sowie Störungen der Nierenfunktion festgestellt (Schmahl et al. 2007; Zhao et al. 2021). Die Nierenfunktionsstörung wird durch eine geringere Größe, sowie einen drastisch erhöhten Spiegel an Harnstoff-Stickstoff im Blut (BUN) angezeigt (Schmahl et al. 2007). Ein weiteres Symptom kann eine auftretende Proteinurie sein (Schümann et al. 2015). Des Weiteren führt eine S1P-Lyase Insuffizienz zu einer Zerstörung des S1P-Blut-Gewebe-Gradienten. Da dieser, wie bereits erwähnt, jedoch essentiell für die Lymphozytenzirkulation ist, entsteht in *Sgpl1*-defizienten Mäusen häufig eine Lymphopenie (Schwab et al. 2005; Schmahl et al. 2007; Vogel et al. 2009; Allende et al. 2011). Vogel et al. zeigten, dass das Immunsystem sehr empfindlich auf Veränderungen der SGPL1-Aktivität reagiert. Histologische Untersuchungen an Lunge, Herz, Harnwegen und Knochen wiesen in *Sgpl1*-defizienten Mäusen starke Läsionen in nicht-lymphatischen Zielorganen auf (Vogel et al. 2009). Diese histologischen Auffälligkeiten entwickeln sich im Gegensatz zum immunologischen Phänotyp jedoch nur bei völliger Abwesenheit der S1P-Lyase (Vogel et al. 2009). In weiteren Studien an Mäusen mit globalem *Sgpl1* Knockout konnte gezeigt werden, dass diese einen proentzündlichen Phänotyp mit Neutrophilie aufweisen, jedoch eine beeinträchtigte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe von statten geht (Allende et al. 2011). Einige Proteine der akuten Entzündungsphase, wie Serumamyloide (SAA1-4) und das LPS-bindende Protein waren in der Leber stark erhöht, was auf akute Entzündungsprozesse hinweist. Des Weiteren lassen erhöhte Spiegel an proentzündlichen Zytokinen wie Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Interleukin-6 (IL6) im Serum auf eine systemische Entzündung schließen (Allende et al. 2011). Interessanterweise haben Mäuse mit einem heterozygoten Knockout normale Blutzellzahlen und keine erhöhten Werte an Serumzytokinen. Das deutet darauf hin, dass der Immunphänotyp nur ausgelöst wird, wenn das Enzym auf beiden Allelen ausgeschaltet wird (Allende et al. 2011). Die Ergebnisse dieser Studien implizieren, dass die S1P-Lyaseaktivität ein Regulator der Entzündungsreaktion und der Neutrophilenwanderung ist.

Ein Mangel an S1P-Lyase beeinflusst nicht nur die zelluläre Konzentration an S1P, sondern auch der Sphingolipide stromaufwärts (vgl. Abbildung 1). Daher sind nicht nur S1P, sondern auch Sphingosin und zahlreiche Ceramide im Serum und Gewebe der globalen *Sgpl1* Knockoutmäuse stark erhöht (Vogel et al. 2009; Bektas et al. 2010; Allende et al. 2011). Darüber hinaus konnten stark erhöhte Konzentrationen dieser Sphingolipide im Thymus nachgewiesen werden. Erhöhte Ceramidspiegel im Thymus inhibieren die postnatale Thymusentwicklung, weshalb der Thymus, verglichen mit den Kontrollmäusen, circa 10-fach verkleinert und leichter war. Dieser Phänotyp weist eine dramatisch gestörte Thymozytenentwicklung auf (Weber et al. 2009).

Eine Studie über das Lipidprofil in Leber und Serum dieser Mäuse zeigte deutliche Veränderungen im Sphingolipidmetabolismus, sowie in Nicht-Sphingolipid Metaboliten, wie Phospholipiden, Triglyceriden, Diacylglycerin und Cholesterin (Bektas et al. 2010). Das freie und gesamte Cholesterin, Cholesterinester, sowie Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL), Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) und Lipoproteine hoher Dichte (HDL) sind im Serum von Mäusen mit Lyasemangel stark erhöht (Bektas et al. 2010). Die Leber als Hauptort des Lipidstoffwechsels weist ebenfalls deutlich erhöhte Spiegel an S1P, Sphingosin, sowie einiger Ceramide mit kürzerer Kettenlänge und Sphingomyelin auf (Bektas et al. 2010). Darüber hinaus sind in der Leber die Spiegel an Triacylglycerin, Cholesterinestern, aber nicht von freiem Cholesterin erhöht (Bektas et al. 2010). Die Studie von Bektas et al. zeigte einen Zusammenhang zwischen einem Mangel an S1P-Lyase und der Cholesterinhomöostase. Dabei wurde eine mechanistische Beteiligung des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) vermutet, denn PPAR $\gamma$  wird auf mRNA-Ebene in der Leber von globalen *Sgpl1* Knockoutmäusen deutlich stärker exprimiert, als in den Kontrollmäusen (Bektas et al. 2010).

Auf Grund der frühen Letalität der *Sgpl1* Knockoutmäuse wurden weitere Studien mit induzierbaren *Sgpl1* Knockoutmäusen beziehungsweise pharmakologischer S1P-Lyase Hemmung durchgeführt. Diese Mäuse wiesen jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger weißes Fettgewebe bei deutlich erhöhter Knochenbildung, -masse und -festigkeit auf (Weske et al. 2018). Erklärbar ist dies durch eine Stimulation der Osteoblastogenese auf Kosten der Adipogenese. Dies geschieht durch eine umgekehrte Regulierung, wobei der Transkriptionsfaktor Osterix bzw. Sp7 aktiviert und PPAR $\gamma$  hingegen gehemmt wird. Gleichzeitig wird auch die Osteoklastogenese durch Osteoprotegerin Induktion gehemmt (Weske et al. 2018). Demzufolge sind S1P<sub>2</sub>-defiziente Mäuse osteopenisch und adipös (Weske et al. 2018).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bereits die Wiederherstellung von ca. 10 % der Lyaseaktivität ausreichend ist, um vor schweren Folgen einer Insuffizienz zu schützen (Vogel et al. 2009). Die Expression der humanen *Sgpl1* auf einem oder zwei Allelen führte in sogenannten Knock-in Mäusen zu weniger als 10 oder 20 % der normalen Lyaseaktivität. Dies bot Schutz vor den seltenen Defekten in Lunge, Herz, Harnwegen und Knochen (Vogel et al. 2009). Hingegen konnte die geringe wiederhergestellte Aktivität die Lymphozyten-migration nicht verhindern, da die Wanderung der Lymphozyten sehr empfindlich auf die Veränderung des chemotaktischen S1P-Gradienten reagiert (Vogel et al. 2009).

### 1.2.3 Murine embryonale Fibroblasten (MEFs) *Sgpl1*-defizienter Mäuse

Embryonale Fibroblasten, der zuvor beschriebenen S1P-Lyase-Knockoutmäuse, dienen als ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung der S1P-Lyase-Defizienz. Die Isolierung dieser Zellen geschieht aus der Haut von 16 Tage alten Mausembryonen (Colié et al. 2009). Die sogenannten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) sind ein gutes Modellsystem, da sie keine Restaktivität der S1P-Lyase aufweisen. Wie zuvor beschrieben ist bereits eine Restaktivität von weniger als 10 % ausreichend, um zahlreiche Effekte der S1P-Lyase-Insuffizienz aufzuheben (Vogel et al. 2009).

Auf Grund der nicht vorhandenen S1P-Lyaseaktivität ist in den knockout MEFs (*Sgpl1*<sup>-/-</sup>) eine starke Akkumulation der Sphingolipide nachweisbar. Besonders stark sind Sphingosin (2-fach) und S1P (6-fach) erhöht (Claas et al. 2010). Die nukleare S1P-Konzentration ist ebenfalls erhöht und geht mit einer verminderten HDAC-Aktivität, sowie einer Dysregulation der Calciumhomöostase einher (Ihlefeld et al. 2012). *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs lassen sich anhand eines signifikant erhöhten zytosolischen Calciumspiegels [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, sowie einer verbesserten Einlagerung und Mobilisierung des Calciums charakterisieren. Dies wurde durch Messungen in Zellsuspensionen mit dem SERCA-Inhibitor Thapsigargin gezeigt (Claas et al. 2010). Die Gesamtfreisetzung des Calciums war in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs um mehr als 50 % erhöht. Somit wurde gezeigt, dass die erhöhten Konzentrationen an S1P und/oder Sphingosin zu einer verstärkten Speicherung des Calciums, sowie zu erhöhtem basalen Calcium führte. Somit spielt der S1P-Stoffwechsel nicht nur bei der akuten Calciummobilisierung, sondern auch bei der langfristigen Regulation der Calciumhomöostase eine Rolle (Claas et al. 2010).

Die S1P-Konzentrationen im Kern von *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs waren ebenfalls überproportional erhöht. Hingegen wurde eine reduzierte HDAC-Aktivität nachgewiesen, welche zu einer erhöhten Acetylierung von Histon 3-Lys9 führte (Ihlefeld et al. 2012). Darüber hinaus wurde eine verminderte HDAC1 und HDAC3 Expression in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs nachgewiesen. Die S1P-Lyase konnte mit Hilfe von 4-Desoxypyridoxin gehemmt werden. In Wildtyp-MEFs induzierte dies eine erhöhte Acetylierung von Histon 3-Lys9 (Ihlefeld et al. 2012). Der unspezifische HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verursachte eine vermehrte basale Calciumkonzentration, sowie eine verstärkte Calciumspeicherung (Ihlefeld et al. 2012). Des Weiteren konnten Ihlefeld et al. zeigen, dass sowohl die ABC-Transporter (ABCA1, ABCB1, ABCC1) als auch der S1P-spezifische Transporter SPNS2 in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs hoch reguliert sind. Eine ausgeprägte Chemoresistenz gegenüber dem Zytostatikum Doxorubicin war feststellbar, während die Inhibition der Transporter ABCB1 und ABCC1 die Chemosensitivität gegenüber Doxorubicin wiederherstellen konnte (Ihlefeld et al. 2015). Somit wurde postuliert, dass in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs die Hochregulation dieser Transporter zur Chemoresistenz beiträgt (Ihlefeld et al. 2015).

Eine weitere Studie an MEFs zeigte, dass *Sgp11<sup>-/-</sup>* MEFs Merkmale eines NPC-Phänotyps (Niemann-Pick-Krankheit Typ C) aufweisen. Hierbei akkumuliert Cholesterin in Endo-/Lysosomen und führt zu einer Aktivierung des Sterol-regulierenden Element Bindeproteins (SREBP2) (Vienken et al. 2017). Eine erhöhte Menge an Gesamtcholesterin auf Grund einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors (LDLR) und einer erhöhten Cholesterinaufnahme konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Vienken et al. 2017).

### 1.3 Sphingolipidosen

Unter Sphingolipidosen werden lysosomale Speicherkrankheiten, die mit dem Sphingolipidmetabolismus verknüpft sind, zusammengefasst. Meistens werden diese durch einen Enzymdefekt, wie zuvor für SPLIS beschrieben, verursacht und rezessiv vererbt (siehe Abbildung 4).

Eine der häufigsten Sphingolipidosen wird als Morbus Gaucher bezeichnet. Brady et al. beschrieben bereits 1965, dass dieser Stoffwechseldefekt und die damit einhergehende Speicherung von Glucosylceramid auf einen Mangel an Glucosidase zurückzuführen ist (Brady et al. 1965). Das Hauptmerkmal dieser Krankheit ist eine stark vergrößerte Milz (Splenomegalie), aber oft auch eine vergrößerte Leber (Hepatomegalie). Des Weiteren kennzeichnet das Auftreten von lipidbeladenen Speicherzellen, den Gaucher-Zellen, im Knochenmark und in Organen Morbus Gaucher (Nilsson et al. 1982).

Knut Krabbe beschrieb mehrere Fälle mit frühkindlichen krankhaften Veränderungen des Gehirns (Krabbe 1916). Heute ist diese Krankheit als Morbus Krabbe bekannt. Hierbei liegt ein Defekt der  $\beta$ -Galactosylceramidase zu Grunde, was zu einem verringerten Abbau des Galactosylceramids führt. (Suzuki und Suzuki 1970) Morbus Krabbe ist durch fortschreitende Demyelinisierung der Nervenzellen charakterisiert (Dunn et al. 1969).

Eine weitere Sphingolipidose wurde von Sidney Farber 1952 beschrieben (Farber 1952). Morbus Farber führt zu stark erhöhten Ceramidkonzentrationen auf Grund eines Defekts der Ceramidase (Prensky et al. 1967; Sugita et al. 1972). Der klinische Verlauf dieser Krankheit ist sehr variabel, aber drei Hauptsymptome konnten bestimmt werden. Diese sind schmerzhafte Gelenkdeformation, subkutane Knoten und Heiserkeit (Moghadam et al. 2019).

Morbus Niemann-Pick ist eine weitere, angeborene lysosomale Speicherkrankheit, welche nach dem deutschen Kinderarzt Albert Niemann und dem Pathologen Ludwig Pick benannt ist. 1914 berichtete Albert Niemann zunächst über eine Patientin mit massiver

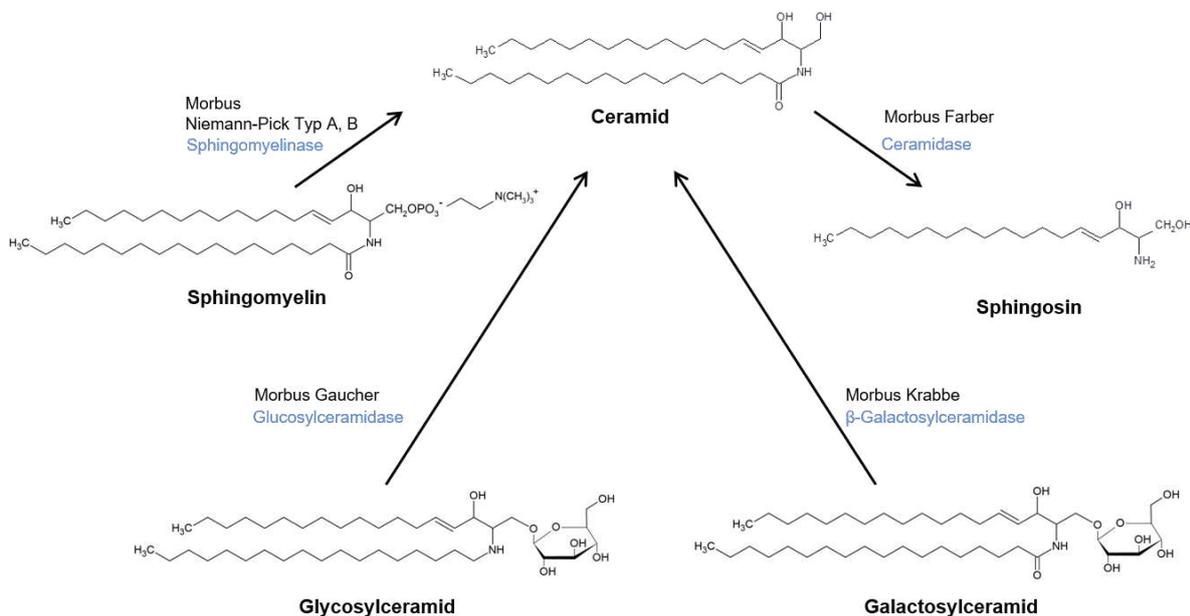
Hepatosplenomegalie und schnell fortschreitender Neurodegeneration, welche bereits im Alter von nur 18 Monaten verstarb (Pick 1927). Im Jahr 1927 untersuchte Ludwig Pick Patienten mit fortschreitender neurodegenerativer Erkrankung und beschrieb die Niemann Krankheit, welche sich von Morbus Gaucher unterscheidet (Pick 1927, 1933).

Heute werden drei Typen der Niemann-Pick Krankheit (A, B und C) unterschieden. Niemann und Pick selbst beschrieben Typ A. Hierbei führen Hepatosplenomegalie und eine Gedeihstörung oftmals zum Tod im Säuglings- beziehungsweise Kleinkindalter auf Grund von Lungenversagen (McGovern et al. 2006). Klenk et al. beschrieben 1934, dass die Lipidakkumulation des Sphingomyelins mit Niemann-Pick zusammenhängt (Klenk 1934). Ein Defekt der sauren Sphingomyelinase konnte 1966 von Brady et al. als Ursache identifiziert und 1967 von Schneider und Kennedy bestätigt werden (Brady et al. 1966; Schneider und Kennedy 1967).

Ungefähr 20 Jahre nach den Entdeckungen von Ludwig Pick wurde über zwei Brüder berichtet, die ebenfalls an massiver Hepatosplenomegalie litten, jedoch keine neurologischen Auffälligkeiten aufwiesen und bereits ca. 30 Jahre alt waren (Dusendschon 1946; Pfändler 1946). Hierbei wurde ein weiterer Typ dieser Erkrankung, heute bekannt als Niemann-Pick Krankheit Typ C (NPC), beschrieben. Typ C lässt sich auf Grund eines Cholesterinveresterungsdefekts deutlich von Typ A und B unterscheiden (Elleder und Jirtsek 1983; Pentchev et al. 1986). Hier liegt kein Defekt der Sphingomyelinase, sondern eines der zwei verschiedenen cholesterinbindenden Proteine (NPC1 und NPC2), vor (Vanier et al. 1996; Carstea et al. 1997). Klinisch, sowie biochemisch ist keine Differenzierung zwischen einem NPC1- und einem NPC2-Defekt möglich (Naureckiene et al. 2000). Allerdings sind zahlreiche Mutationen bekannt, die zu NPC führen und in circa 95 % der Fälle der Krankheit liegt der Funktionsverlust von NPC1 zu Grunde (Park et al. 2003). Das Membranprotein NPC1 ist in späten Endosomen lokalisiert und stellt einen wichtigen Faktor für die Cholesterinverteilung dar, denn NPC1 reguliert in Anwesenheit von NPC2 den Transport cholesterinbeladener Vesikel zur Plasmamembran oder zum ER (Carstea et al. 1997; Higgins et al. 1999; Naureckiene et al. 2000). Da diese zelluläre Verarbeitung des LDL-abgeleiteten Cholesterins in Fibroblasten von NPC-Patienten defekt ist, akkumuliert Cholesterin (Pentchev et al. 1986; Liscum und Faust 1987). Normann et al. zeigten, dass der Farbstoff Filipin direkt mit Cholesterin interagiert (Norman et al. 1972; Kruth et al. 1986). Bis heute ist die Cholesterinfärbung mittels Filipin in Fibroblasten die wichtigste Methode zur NPC-Schnelldiagnose, auch wenn in den letzten Jahren an weiteren NPC-Biomarkern, wie Cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 3 $\beta$ -triol (C-Triol), geforscht wurde (Cooper et al. 2020). Zur Behandlung von NPC wird zurzeit Miglustat (Zavesca<sup>®</sup>, Janssen-Cilag GmbH), ein Inhibitor der Glucosylceramidsynthase, verwendet (Platt et al. 1994). Miglustat führt zu einer Verringerung

der Glycosphingolipide. Die Behandlung kann die endosomale Aufnahme verbessern, die pathologische Lipidspeicherung reduzieren und führt zu einem normalisierten Lipidtransport in NPC-Patienten (Lachmann et al. 2004; Patterson et al. 2007). Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass in Fibroblasten aus NPC-Patienten nicht nur die Cholesterinhomöostase, sondern auch die Calciumhomöostase beeinträchtigt ist. Die Calciumfreisetzung aus Lysosomen war in NPC-Fibroblasten um ca. 65 % vermindert (Lloyd-Evans et al. 2008).

Ein Überblick über die zuvor beschriebenen Sphingolipidosen und die beteiligten Enzyme ist in Abbildung 4 dargestellt. Eine genauere Zusammenfassung der ausgewählten Sphingolipidosen geben Vanier et al., sowie Schuchmann et al. (Vanier 2010; Schuchman und Desnick 2017).



**Abbildung 4: Ausgewählte Sphingolipidosen.** Gezeigt sind die Strukturformeln und Schlüsselenzyme (blau) ausgewählter lysosomaler Sphingolipidosen. Die dazugehörige Krankheit, zu der der entsprechende Enzymdefekt führt, ist ebenfalls aufgeführt.

## 1.4 Die Leber

Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation liegt auf dem hepatozytenspezifischen Knockout der S1P-Lyase in Mäusen. Deshalb werden im Folgenden die Leber, ihr Aufbau und ihre Funktion sowie der Cholesterinstoffwechsel näher betrachtet.

Die Leber ist ein zentraler Knotenpunkt für zahlreiche physiologische Prozesse. Dazu gehören unter anderem der Nährstoffmetabolismus, die Lipid- und Cholesterinhomöostase sowie der Ab- und Umbau von Verbindungen, darunter viele Medikamente (Abdel-Misih und Bloomston 2010; Rui 2014; Trefts et al. 2017).

### 1.4.1 Anatomie

Die rötlich-braun gefärbte Leber (altgriechisch: Hepar) ist im Menschen mit einem Gewicht von circa 1,5 kg (bei Erwachsenen) die größte exokrine Anhangsdrüse des Darms und macht 2 - 3 % des durchschnittlichen Körpergewichts aus. Das keilförmige Organ befindet sich zum größten Teil im rechten oberen Quadranten der Bauchhöhle und grenzt nach oben hin an das Zwerchfell. Die Leber ist durch den Brustkorb geschützt und an sie assoziiert liegt die Gallenblase (*Vesica biliaris*) (Abdel-Misih und Bloomston 2010).

Von außen betrachtet besteht die Leber aus zwei großen Leberlappen, dem rechten (*Lobus dexter*) und dem linken (*Lobus sinister*). Wird die Leber von der Eingeweideseite aus betrachtet, erkennt man zwei weitere kleinere Leberlappen (*Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*). Zwischen den beiden kleinen Leberlappen befindet sich eine quergestellte Nische, die Leberpforte (*porta hepatis*). An der Leberpforte strömt über zwei große Blutgefäße, die Pfortader (*Vena portae*) und die Leberarterie (*Arteria hepatica*), das Blut in die Leber. In umgekehrter Richtung verlaufen der linke und der rechte Gallengang (*ductus hepaticus dexter und sinister*), welche hier die Leber verlassen. Die Leber ist sensibel innerviert und somit schmerzempfindlich. Die *Vena portae* transportiert venöses Blut (70 - 75 % des Leberbluts) aus Magen, Darm, Pankreas und Milz zur Metabolisierung in die Leber. Sie spaltet sich unmittelbar nach Eintritt in die Leber in viele kleine Äste auf. Durch die *Arteria hepatica* hingegen gelangt sauerstoffreiches Blut in die Leber, welches der Versorgung des Leberparenchyms dient. Im Vergleich mit anderen Organen und Drüsen ist diese doppelte Blutversorgung der Leber einzigartig (Menche 2016).

Eine mikroskopische Betrachtung der Leber zeigt eine Aufgliederung zahlreicher in sich gleichender Kompartimente (siehe Abbildung 5). Diese sogenannten Leberläppchen (*Lobuli hepatici*) sind 1 - 2 mm groß und ähneln sechseckigen Bienenwaben. An jedem der Endpunkte des Sechsecks stoßen jeweils ein feiner Ast der Pfortader, der Leberarterie, sowie ein kleiner Gallengang aufeinander. Dieses sogenannte Glisson-Trias (*Trias hepatica*) versorgt jeweils drei Leberläppchen mit Pfortaderblut, sowie sauerstoffreichem arteriellen Blut und enthält zugleich Abflüsse der Gallenkanälchen. In der Mitte jedes Leberläppchens verläuft die Zentralvene (*Vena centralis*). Innerhalb der Leberläppchen ist eine funktionale Unterteilung, welche als „metabolische Zonierung“ bezeichnet wird, vorhanden. Hierbei werden drei verschiedene Zonen unterschieden, welche Hepatozyten mit unterschiedlicher metabolischer Genexpression und Funktionalität besitzen. Der Sauerstoffgehalt nimmt zur Zentralvene hin ab (Zone 1 - 3, siehe Abbildung 5). Typischerweise werden diese Stoffwechselzonen als diskrete Regionen dargestellt, tatsächlich existiert diese hepatische Zonierung jedoch nicht. Vielmehr liegen schwimmende Grenzen vor und die Hepatozyten einer



Neben den bereits erwähnten Hepatozyten (80 %), besteht die Leber aus zahlreichen weiteren Zelltypen. Zu den nicht-hepatischen Zellen (20 %) zählen die sinusoidalen Endothelzellen (44 %), die Kupfferzellen (34 %) und die hepatischen Sternzellen (23 %). Jeder dieser Zelltypen verfügt über einzigartige Funktionen, die die Leberfunktion auf mehreren Ebenen kooperativ regulieren (Blouin et al. 1977).

Die sinusoidalen Endothelzellen, welche gefensterte Siebplatten am sinusoidalen Lumen bilden, kleiden die Blutgefäße aus. So entsteht eine Struktur mit Poren, welche entscheidend für den Austausch von Proteinen und Partikeln zwischen Plasma und den Zelltypen der Leber ist. Ein weiterer Zelltyp sind die Kupffer'schen Sternzellen, die nach ihrem Entdecker Karl Wilhelm von Kupffer benannt sind (Kupffer 1876). Die Kupffer'schen Sternzellen bilden die Makrophagenpopulation der Leber. Sie nehmen körperfremde, sowie körpereigene Substanzen aus dem Pfortaderblut auf und bauen diese ab. Ihnen wird sowohl eine pro-, als auch eine antientzündliche Rolle bei der Wundheilung der Leber zugesprochen. Eine Unterscheidung zwischen den Kupffer'schen Sternzellen und den hepatischen Sternzellen, den sogenannten Ito-Zellen, ist lediglich durch die Elektronenmikroskopie möglich (Ito und Nemoto 1952). Diese Sternzellen enthalten zahlreiche Fetttröpfchen und dienen der Fettspeicherung (Fettspeicherzellen) (Ito und Nemoto 1952). Ein Markenzeichen der Leber ist, dass ihre vielfältigen Zellpopulationen mit ihrer anatomischen Organisation zusammenwirken, um die Leberfunktion zu erhalten (Blouin et al. 1977; Sutherland und Harris 2002; Abdel-Misih und Bloomston 2010; Trefts et al. 2017).

### 1.4.2 Funktion

Jede Minute durchspülen ungefähr 1,5 l Blut die Leber. Als zentrales Stoffwechselorgan und größte Drüse hat sie zahlreiche lebenswichtige Funktionen. Durch den großflächigen Kontakt der Lebersinusoide und des Disse-Raums nimmt die Leber einen Großteil der gelösten Stoffe des nährstoffreichen Bluts auf. Die Leber sorgt durch Aufnahme und Abgabe für eine gleichmäßige Versorgung mit Nährstoffen. Sie hat eine wichtige Pufferfunktion für Nährstoffspitzen und -mangel, beispielsweise kann sie circa 100 g Glukose speichern (Wasserman 2009).

Auf Grund ihrer Fähigkeit des Um- und Abbaus körpereigener und körperfremder Substanzen wird die Leber auch als Entgiftungsorgan bezeichnet. Der Leber wird eine besondere Rolle zugeschrieben, denn alle Stoffe, die im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden, müssen die Leber passieren bevor sie den Körperkreislauf erreichen. Das Lebergewebe agiert hier ähnlich wie ein Filter. Diesem sogenannten „First-Pass-Effekt“ können auch oral verabreichte Arzneistoffe zum Opfer fallen. Die nachfolgende Entsorgung der Abbauprodukte erfolgt

entweder als Urin über die Niere (gut wasserlösliche Substanzen) oder über die Galle (schlecht wasserlösliche Stoffe). Die Substanzen werden über die Lebersinusoide an die gegenüberliegenden Gallenkanälchen abgegeben. Die Leber produziert pro Tag circa 800 ml Galle, die an den Darm abgegeben werden. Sie hat eine emulgierende Wirkung und somit werden schlecht wasserlösliche Stoffe in der Galle gehalten und können anschließend über den Darm ausgeschieden werden. Die sogenannte enterohepatische Rezirkulation beschreibt den Prozess der Resorption im Darm von Stoffen, die die Leber bereits in die Galle sezerniert hat. Anschließend gelangen diese Stoffe erneut in die Leber und werden erneut sezerniert. Dieser wichtige Prozess kann beispielsweise zu einer verlängerten Halbwertszeit von Arzneistoffen führen (Pfeifer et al. 2014; Schulze et al. 2019).

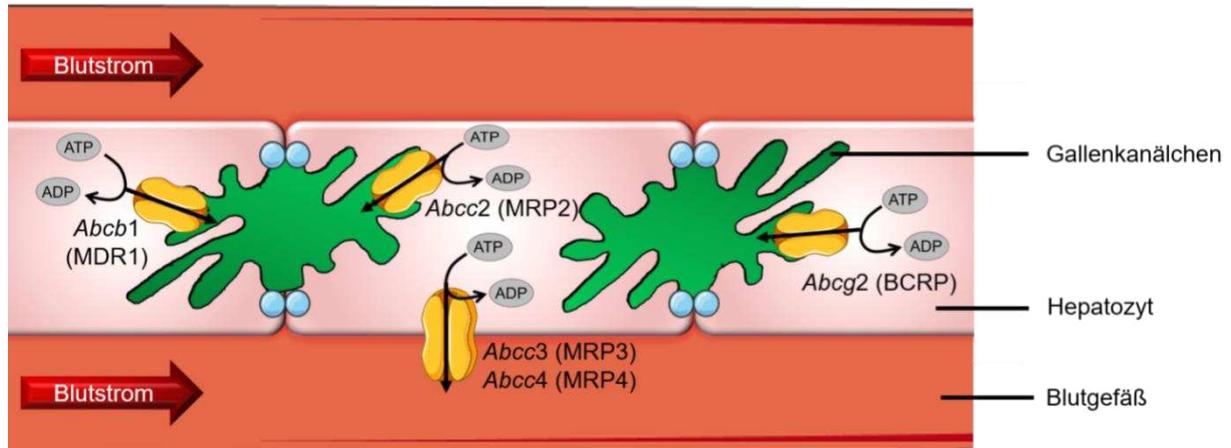
Des Weiteren spielt die Leber eine wichtige Rolle in weiteren Stoffwechselwegen, wie zum Beispiel dem Kohlenhydrat-, Fett- und Eiweißstoffwechsel. Sie ist entscheidend an der Regulation des Blutglukosespiegels und der Koordination der Versorgung des Gehirns, der Muskulatur und des Fettgewebes beteiligt (Duckworth et al. 1988; Sutherland und Harris 2002; Abdel-Misih und Bloomston 2010; Trefts et al. 2017; Schulze et al. 2019). Detailliertere Informationen über die Anatomie und Funktion der Leber sind in folgender Literatur zu finden: Menche 2016.

### **1.4.3 Hepatozyten**

Die Hepatozyten bilden die primäre Epithelzellpopulation der Leber, welche notwendig für die Erfüllung zahlreicher, der Leber zugeschriebener, Funktionen ist (Trefts et al. 2017). Die parenchymalen Leberzellen machen circa 80 % des Lebervolumens aus und haben eine Größe von 20 - 30 µm. Ein besonderes Charakteristikum der Hepatozyten ist die Zweikernigkeit, welche bereits im Jahre 1838 beschrieben wurde (Münzer 1923). Heutzutage ist bekannt, dass die relative Anzahl binuklearer Zellen der Leber je nach Spezies, Alter und physiologischem Zustand variiert, sowie, dass die organellreichen Zellen sogar vier bis acht polyploide Zellkerne enthalten können (Wilson und Leduc 1948; Carriere 1969).

Da die Hepatozyten den größten Teil der Leberzellen ausmachen, sind sie maßgeblich an den zuvor beschriebenen Funktionen der Leber beteiligt. Sie exprimieren eine Vielzahl an Transportern, welche sie für die Sekretion in sinusoidale Blutgefäße sowie in die Gallenkanälchen benötigen. Diese Transporter lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen – die ABC-Transporter, welche eine ATP-Bindekassette enthalten, und die SLC (solute carrier) Transporter. Die ABC-Transporter sind überwiegend für den Efflux aus den Hepatozyten verantwortlich. Die SLC-Transporter hingegen sind meistens bidirektional gerichtete Transporter (siehe Abbildung 6). Als wichtigste und am besten untersuchte Transporter zählen

Abcb1, Abcc2 und Abcg2, welche für die Sekretion von Komponenten der Galle in die Gallenkanälchen zuständig sind. Die Transporter des sinusoidalen Efflux beschränken sich hingegen auf Abcc3 und Abcc4 (Pfeifer et al. 2014; Jetter und Kullak-Ublick 2020). Des Weiteren geben Ben Saad et al. einen sehr detaillierten Überblick über diese und weitere ABC-Transporter in der Leber (Ben Saad et al. 2021).



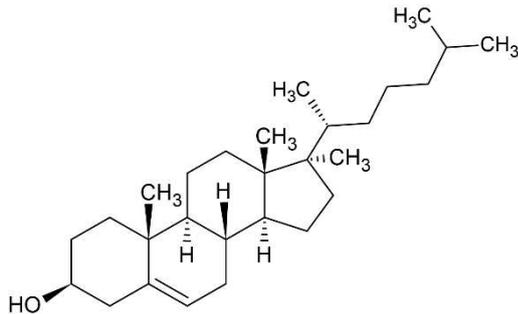
**Abbildung 6: Lokalisation wichtiger ABC-Transporter in Hepatozyten.** Schematische Darstellung der wichtigsten ABC-Transporter, die an der Sekretion aus Hepatozyten in die Galle und in Blutgefäße beteiligt sind. ABC-Transporter, *ATP-binding cassette* Transporter; ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; BCRP, *breast cancer export pump*; MDR, *multidrug resistance gene product*; MRP, *multidrug resistance associated protein*.

Die Leber ist ein flexibles und robustes Entsorgungsorgan. Möglicherweise trägt das sogenannte *zyklische Hepatozyten-Hopping* wesentlich zu dieser Effizienz bei. Hierbei verteilt sich die Belastung auf alle Hepatozyten in einem Leberlappen. Anstelle der effizienten Sekretion in die Gallenkanälchen, absolvieren Hepatozyten mehrere Runden des weniger effektiven basolateralen Efflux in sinusoidale Blutgefäße mit anschließender Wiederholung in nachgeschalteten Hepatozyten (Pfeifer et al. 2014).

## 1.5 Cholesterinhomöostase

Das Lipid Cholesterin (Abbildung 7) ist, neben Phospho- und Sphingolipiden, ein wichtiger Bestandteil beim Aufbau der Plasmamembran und spielt eine essentielle Rolle bei der Synthese von Steroidhormonen und im Gallensäuremetabolismus (Luu et al. 2013). Die Interaktion des Cholesterins mit anderen Lipiden innerhalb der Membran ermöglicht die Festigkeit, Fluidität und Permeabilität dieser zu regulieren. An der Plasmaseite von Membranen kann Cholesterin mit Sphingolipiden und Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen sogenannte dynamische Mikrodomänen bilden, welche eine etablierte

Rolle im Membrantransport, der Signaltransduktion sowie der Wirt-Pathogen Interaktion spielen (Luo et al. 2020).



**Abbildung 7: Strukturformel des Steroids Cholesterin**

Zahlreiche Krankheiten stehen in Verbindung mit der Cholesterinsynthese. Beispielsweise können Fehler im Katabolismus zu Lipidosen führen und Cholesterinablagerungen eine Ursache für die Entstehung von Atherosklerose darstellen. Des Weiteren deuten immer mehr Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen dem Cholesterinstoffwechsel und Krankheiten wie Alzheimer und viele Arten von Krebs hin (Luo et al. 2020).

### 1.5.1 Cholesterinbiosynthese

Im Jahre 1925 beschrieb Harold John Channon zum ersten Mal, dass der tierische Körper in der Lage ist, Cholesterin selbst zu synthetisieren (Channon 1925). 40 Jahre später (1965) wurden Feodor Lynen und Konrad Bloch für ihre Erkenntnisse über den Mechanismus und die Regulation des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Lynen 1965). Inzwischen existieren zahlreiche Zusammenfassungen, welche die Cholesterinbiosynthese und ihre Regulation detailreich beschreiben (Luo et al. 2013; Luo et al. 2017; Luo et al. 2020).

Der zelluläre Cholesterinspiegel wird durch das Zusammenspiel von *de novo* Biosynthese, des Imports, des Exports und der Speicherung bestimmt. Die Biosynthese des Cholesterins findet in allen Säugetierzellen statt, wobei die Leber mit circa 50 % der Cholesterinproduktion den Hauptsyntheseort des Cholesterins darstellt (Repa und Mangelsdorf 2000; Luo et al. 2020). Manche Zellen, wie Fibroblasten, hingegen können das benötigte Cholesterin nicht in ausreichender Menge selbst synthetisieren. Sie decken ihren Bedarf mit Hilfe rezeptorvermittelter Endozytose über LDL-Partikel und den LDL-Rezeptor (Brown et al. 1976).

Die *de novo* Synthese des Cholesterins erfolgt im ER aus dem Substrat Acetyl-CoA. An ihr sind ungefähr 20 Enzyme beteiligt, welche überwiegend in der ER-Membran lokalisiert sind.

Zunächst entsteht aus den Substraten Acetyl-CoA und Acetacetyl-CoA das Zwischenprodukt Mevalonat. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend und wird deshalb als die Schrittmacherreaktion der gesamten Cholesterinsynthese bezeichnet. Der Katalysator dieser Reaktion ist das Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase (HMGCR) (Bucher et al. 1960; Lynen 1965). Anschließend kondensieren über eine mehrstufige Reaktion sechs Moleküle Isopentenylpyrophosphat zu Squalen, welches im letzten Schritt zyklisiert und über die Zwischenprodukte Lanosterol, Desmosterol und zahlreiche weitere Vorläufer zu Cholesterin wird (Luo et al. 2020).

Im Körper wird das Cholesterin über Blut und Lymphe in Form von Lipoproteinpartikeln (kurz: Lipoproteinen) transportiert. Diese Lipoproteine haben eine Hülle aus stärker hydrophilen Lipiden und Proteinen, wohingegen der Kern aus hydrophoben Lipiden besteht. Die Proteinkomponente dieser Partikel sind Apolipoproteine, diese solubilisieren die hydrophoben Lipide und enthalten die nötigen Signale für die Regulation des Transports. Sie werden von Leber und Darm synthetisiert und sezerniert. Die Lipoproteine werden nach ihrer Dichte wie folgt klassifiziert:

Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants, VLDL, LDL und HDL.

Im Blut sind die LDL-Partikel am wichtigsten, denn sie transportieren Cholesterin zu peripherem Gewebe. In ihrem Kern enthalten sie circa 1500 veresterte Cholesterinmoleküle und ihre Hülle enthält das Apolipoprotein APOB-100, welches von Zellen erkannt wird. Sie binden an spezifische LDL-Rezeptoren und werden mittels Endozytose aufgenommen. In der Zelle verschmelzen die Partikel mit Lysosomen. In den so entstandenen Endo-/Lysosomen bindet das Cholesterin zunächst an NPC2. Dieses übergibt das Cholesterin an das membranständige NPC1, welches für den Export aus den Endo-/Lysosomen und die korrekte Verteilung innerhalb der Zelle verantwortlich ist (Li und Pfeffer 2016). Die LDL-Rezeptoren werden anschließend wiederverwendet. Für den Rücktransport des Cholesterins sind HDL-Partikel zuständig, welche Cholesterin, das von absterbenden Zellen oder abgebauten Membranen an das Blutplasma abgegeben wird, aufnehmen. Sie transportieren das überschüssige Cholesterin zurück zur Leber. Dort kann dieses anschließend wiederverwertet oder abgebaut werden (Luo et al. 2013; Luo et al. 2017; Luo et al. 2020).

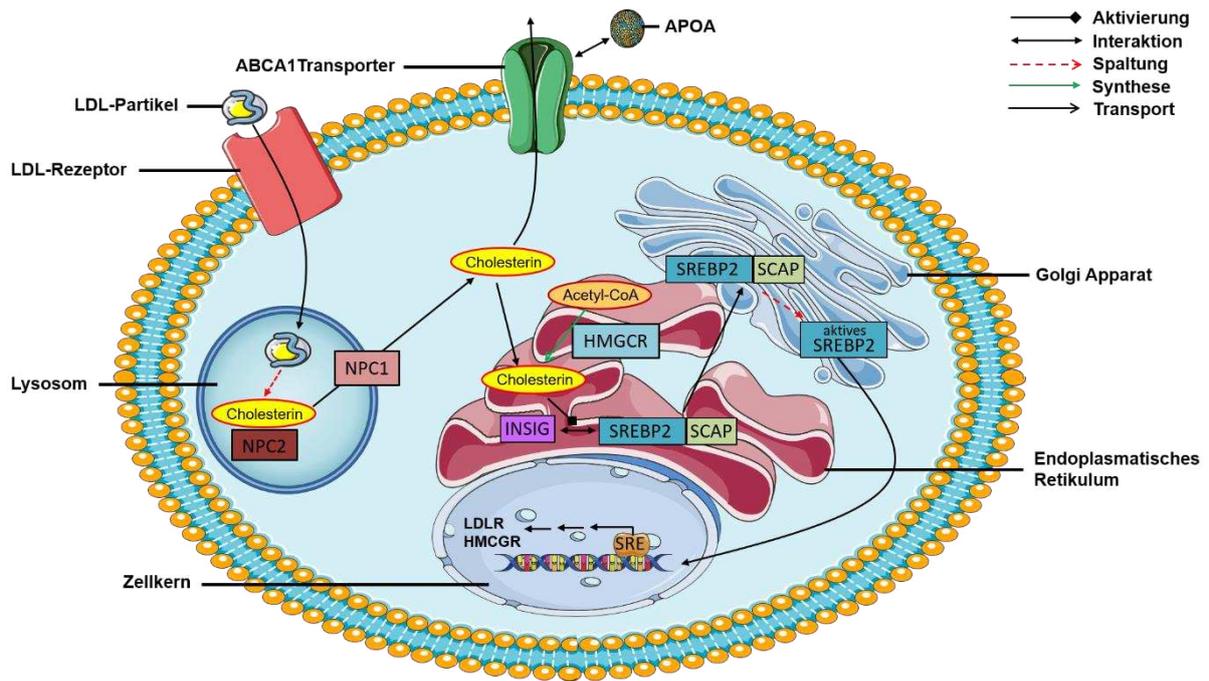
Bereits im Jahr 1913 postulierte Nicolai N. Anitschkow eine kausale Rolle des Cholesterins bei der Entstehung von Atherosklerose (Anitschkow und Chalатов 1913; Steinberg 2013). Im Rahmen der Framingham-Herz-Studie konnten Gordon et al. im Jahr 1977 zeigen, dass erhöhte Werte an LDL-Cholesterin in direktem Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose, der Hauptursache für Herzinfarkte und Schlaganfälle, stehen. Des Weiteren

beschrieben sie eine protektive Wirkung des HDL-Cholesterins gegenüber kardiovaskulären Ereignissen (Gordon et al. 1977; Linton et al. 2000; Mahmood et al. 2014). Akira Endo beschrieb im Jahr 1976, dass das Statin Compactin zur Hemmung der HMGCR führt (Endo et al. 1976). Des Weiteren führt das Statin durch eine Rückkopplung zu einer erhöhten LDLR-Expression und somit einer geringeren Konzentration an LDL-Cholesterin im Blut (Brown et al. 1978). Heutzutage stellt die Behandlung mit Statinen eine gängige Methode zur Behandlung von Hypercholesterinämie und zur Vorbeugung von Atherosklerose dar (Goldstein und Brown 2015).

### 1.5.2 Regulation der Cholesterinsynthese

Die Cholesterinsynthese wird durch zahlreiche transkriptionelle, translationale und posttranslationale Regulierungsmechanismen sichergestellt, welche als integratives System fungieren. Vornehmlich erfolgt die Regulation über das Schlüsselenzym – die HMGCR. Beispielsweise werden Menge und Aktivität mit Hilfe der Cholesterinmenge über eine sogenannte Rückkopplungsreaktion gesteuert. Des Weiteren kann eine signalempfindliche Membrandomäne der HMGCR durch hohe Konzentrationen an Sterin empfindlicher für die Proteolyse werden und führt somit zu einem kontrollierten Abbau des Enzyms. Ebenfalls führen Phosphorylierungen durch AMP-aktivierte Proteinkinase bei wenig ATP zum Erliegen der Cholesterinsynthese (Goldstein und Brown 1990).

Der wohlmöglich wichtigste Regulierungsmechanismus der HMGCR und somit der Cholesterinbiosynthese erfolgt über das Sterinregulationselement-Bindeprotein (SREBP) (siehe Abbildung 8) (Brown et al. 1976). SREBP liegt bei Cholesterinpräsenz inaktiv im ER verankert vor und wird bei Cholesterinmangel aktiviert. SREBP ist an den Cholesterinsensor *SREBP-cleavage activating protein* (SCAP) gebunden und wird bei einem zu niedrigen Cholesterinspiegel von SCAP an den Golgi-Apparat begleitet. Durch zwei spezifische, proteolytische Spaltungen entsteht das aktive SREBP2 Fragment, welches anschließend im Zellkern als Transkriptionsfaktor an das Sterinregulationselement (SRE) bindet. Somit wird unter anderem die Transkriptionsrate der Gene für die Synthese des LDL-Rezeptors und der HMGCR auf mRNA-Ebene reguliert und erhöht. Hohe Cholesterinspiegel hingegen führen zu einer verstärkten Bindung von SCAP an das Membranprotein *Insulin-induced gene 1 protein* (INSIG1), sodass nur ein verminderter Transport des SREBP-SCAP-Komplexes möglich ist. Dies hat eine geringere Transkriptionsrate der Zielgene zur Folge (Brown et al. 1976; Luu et al. 2013).



**Abbildung 8: Regulation der Cholesterinhomöostase.** Cholesterin wird über den LDL-Rezeptor aufgenommen, kann aber auch im ER mit Hilfe der HMG-CoA Reduktase synthetisiert werden. Bei geringen Cholesterinkonzentrationen werden der Transkriptionsfaktor SREBP2 und dessen Zielstrukturen über SRE aktiviert. Niedrige Cholesterinkonzentrationen führen zu einer verstärkten Interaktion zwischen Insig und SREBP2 und somit nicht zu einer Aktivierung der Zielstrukturen. ABCA, *adenosine triphosphate binding cassette* Transporter 1 der ABC-Transport Subfamilie ABCA; ApoA, Apolipoprotein A; CoA, Coenzym A; HMGCR, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A Reduktase; INSIG, Insulin-induziertes Gen 1 Protein; LDL, *low density lipoprotein*; LDLR, LDL-Rezeptor; NPC, NPC intrazellulärer Cholesterintransporter; SCAP, *SREBP-cleavage activating protein*; SERBP2, *sterol regulatory element binding protein 2*; SRE, Sterinregulationselement.

Weitere detaillierte Regulationsmechanismen haben Luo et al. zusammengefasst (Luo et al. 2020).

## 1.6 Calciumhomöostase

Im Körper variiert die Konzentration an Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) stark. Während die zytoplasmatische Konzentration bei 100 nM liegt, weist das Serum eine Calciumkonzentration von 2 - 3 mM auf. Um zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum oder Zellkompartimenten wie dem ER zu wandern, müssen Moleküle eine hydrophobe Barriere überwinden. Polare oder geladene Moleküle, wie zum Beispiel Calciumionen, benötigen hierfür die Hilfe eines Proteins, das einen Kanal durch die Membran bildet.

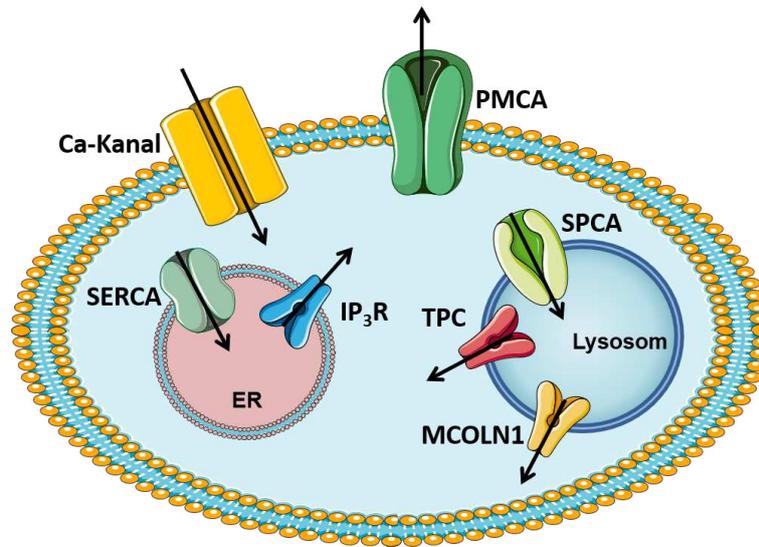
Die Gruppe der Spannungsabhängigen Calciumkanäle ist für den Import von Calciumionen in die Zelle verantwortlich. Diese Kanäle werden durch eine Depolarisation, d.h. eine Änderung des Membranpotentials, aktiviert und auf Grund ihrer Depolarisationseigenschaft in folgende drei Subtypen unterteilt:

L-Typ (langanhaltend), T-Typ (transient) und N-Typ (neutral, weder L- noch T-Typ) (Nowycky et al. 1985; Fox et al. 1987).

Die Spannungsabhängigen Calciumkanäle werden in erregbaren Zellen exprimiert und sind nachweislich für die Erregungs-Kontraktions-Kopplung verantwortlich (Rios und Brum 1987). Die Gruppe der L-Typ Calciumkanäle ist von großer Bedeutung, da sie nicht nur in der Skelettmuskulatur, sondern auch in der Herzmuskulatur und dem Gehirn exprimiert wird (Mikami et al. 1989; Mori et al. 1991). Des Weiteren bietet die Blockade der L-Typ Calciumkanäle einen therapeutischen Ansatzpunkt im Zusammenhang mit Krankheiten, wie beispielsweise Alzheimer und Bluthochdruck (Anekonda et al. 2011; Dolphin 2018; Xu et al. 2021).

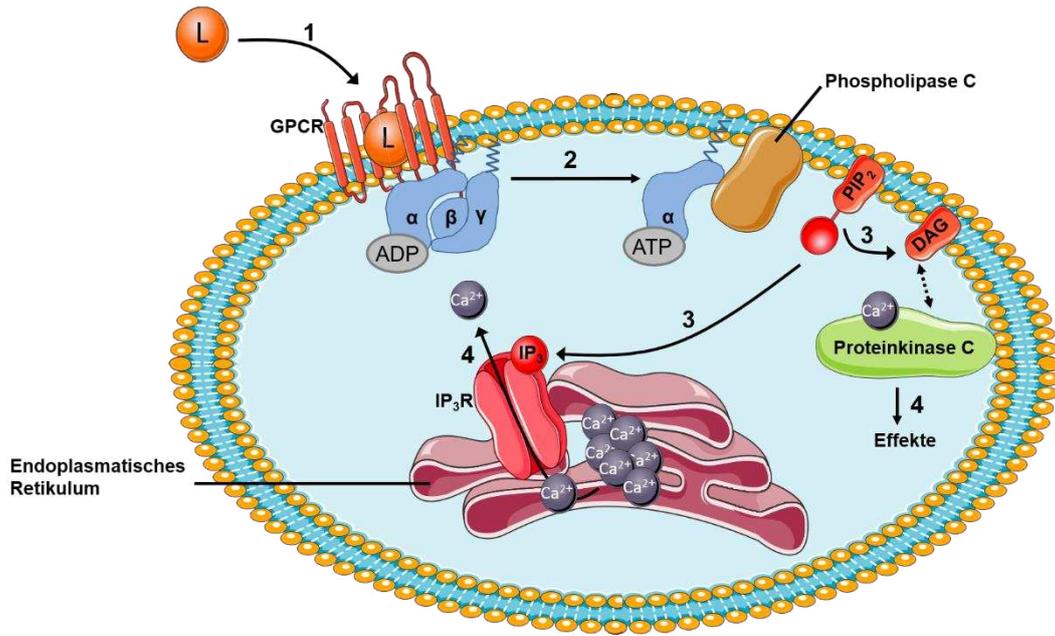
Die Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA), welche zur Gruppe der P-Typ ATPasen gehört, übernimmt in der Plasmamembran hingegen die Aufgabe des Calciumexports (Dunham und Glynn 1961; Pedersen und Carafoli 1987b, 1987a; Schatzmann 1973; Krebs 2017). Auch die Sarko-/endoplasmatische Retikulum ATPase (SERCA), welche Calciumionen aus dem Sarkoplasmatischem Retikulum (SR) in das Zytoplasma pumpt, gehört dieser Gruppe an (Toyoshima 2009; Ebashi und Lipmann 1962). Eine weitere ATPase stellt die *secretory pathway Ca<sup>2+</sup> ATPase* (SPCA) dar. Sie ist im Golgi lokalisiert und transportiert Calciumionen aus dem Zytoplasma in Lysosomen (Antebi und Fink 1992; Wuytack et al. 2002). P-Typ ATPasen können in ihrer Grundform zwei Calciumionen binden. Des Weiteren wird intrazellulär ein ATP-Molekül gebunden, welches eines seiner Phosphate auf ein Arginin (Arg351) der ATPase übertragen kann. Die anschließende Freisetzung des Adenosindiphosphats (ADP) führt zu einer Konformationsänderung. Diese sogenannte Umstülpung ermöglicht die Freisetzung der Calciumionen auf der anderen Membranseite. Durch die Hydrolyse des Phosphorylaspartatrestes wird ein anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>) freigesetzt und die ATPase kehrt in ihren Grundzustand zurück (Kühlbrandt 2004).

Der Transport ist neben den zuvor beschriebenen ATPasen auch über zahlreiche Kanäle, wie unspezifische Kationenkanäle oder Natrium-Calcium-Austauscher, möglich (Krebs et al. 2015). Als zentraler Gegenspieler der SERCA gilt der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Inositoltriphosphatrezeptor (IP3R), welcher Calciumionen aus den Speichern im ER in das Zytosol transportiert (Streb et al. 1983; Mikoshiba 2015). Eine Übersicht der wichtigsten Calciumtransporter und ihrer Lokalisation ist in Abbildung 9 gezeigt.



**Abbildung 9: Lokalisation der wichtigsten Calciumkanäle und -transporter in der Zelle.** Dargestellt ist eine Zelle mit ER und Lysosom sowie die wichtigsten Calciumkanäle und -transporter. Die Calcium-ATPasen (PMCA, SERCA, SPCA) transportieren Calciumionen aus dem Zytoplasma heraus. Die Calciumkanäle und der IP<sub>3</sub>-Rezeptor hingegen transportieren Calciumionen in das Zytoplasma (Spannungsabhängige Calciumkanäle, TPC, MCOLN1, IP<sub>3</sub>R). ER, Endoplasmatisches Retikulum; IP<sub>3</sub>R, Inositoltriphosphatrezeptor; MCOLN1, Mucolipin 1; PMCA, Plasmamembran-Calcium-ATPase; SERCA, Sarko-/endoplasmatisches Retikulum Calcium-ATPase; SPCA, secretory pathway calcium ATP-ase; TPC, two-pore channel.

Calciumionen gehören zu den zentralen sekundären Botenstoffen. Der wichtigste Signalweg zur Freisetzung von Calciumionen in einer Zelle ist die Phosphoinositolkaskade (siehe Abbildung 10). Die Bindung eines Liganden, wie S1P, an einen GPCR (siehe 1.1.4) führt zur Spaltung des membranständigen Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). Hierbei bindet die aktive G<sub>αq</sub>-Untereinheit an die Phospholipase C, welche aktiviert wird und anschließend die Spaltung von PIP<sub>2</sub> zu den sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP<sub>3</sub> ist löslich und bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren. Diese spezifischen Calciumkanalproteine sitzen in der ER-Membran und ermöglichen den Calciumausstrom aus dem ER in das Zytoplasma (Berridge 1984; Nishizuka 1984; Bultynck et al. 2003). DAG hingegen verbleibt in der Plasmamembran und kann in Zusammenarbeit mit freigesetzten Calciumionen die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Des Weiteren können die freigesetzten Calciumionen nun selbst ebenfalls als sekundärer Botenstoff agieren, beispielsweise durch eine Bindung an den Calciumsensor Calmodulin.



**Abbildung 10: Signalweg der Phosphoinositolkaskade.** Durch Bindung eines Liganden an einen GPCR wird das intrazellulär gebundene G-Protein aktiviert. Die G $\alpha$ -Untereinheit löst sich von der  $\beta$ - und der  $\gamma$ -Untereinheit. (1) In der aktiven Form hat die G $\alpha$ -Untereinheit ATP gebunden und kann die Phospholipase C aktivieren. (2) Die aktivierte Phospholipase C katalysiert die Spaltung von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG. Das lösliche IP<sub>3</sub> kann an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor binden und sorgt für einen Calciumausstrom. DAG aktiviert in Kombination mit freigesetztem Calcium die Proteinkinase C. (3) Die aktivierte Proteinkinase C und die freigesetzten Calciumionen haben weitere Effekte zur Folge. (4) ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriphosphat; Ca<sup>2+</sup>, Calciumionen; DAG, Diacylglycerol; IP<sub>3</sub>, Inositoltriphosphat; IP<sub>3</sub>R, IP<sub>3</sub>-Rezeptor; L, Ligand; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; GPCR, G-Protein gekoppelter Rezeptor.

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die S1P-Lyase katalysiert den letzten Schritt des Sphingolipidkatabolismus, weshalb eine *Sgp1*-Defizienz zu schweren Schädigungen führen kann. Patienten mit dem seltenen S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom (SPLIS) leiden insbesondere unter einem steroidresistenten nephrotischen Syndrom, einer Nebennierenrindeninsuffizienz sowie neurologischen Störungen (Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017). Globale *Sgp1* Knockoutmäuse haben einen ausgeprägten Phänotyp mit kurzer Überlebensdauer und multiplen Organdefekten, insbesondere in der Niere und im Nervensystem (Schmahl et al. 2007; Vogel et al. 2009; Bektas et al. 2010; Weske et al. 2018; Hagen-Euteneuer et al. 2020). Die *Sgp1*-defizienten Mäuse weisen neben hohen Konzentrationen verschiedener Sphingolipide im Blut und Gewebe auch erhöhte Cholesterinspiegel im Serum und in der Leber auf (Bektas et al. 2010). Auch bei SPLIS-Patienten wurden Hypercholesterinämien beobachtet (Prasad et al. 2017). Diese Beobachtungen legen eine Kreuzregulation des S1P- und des Cholesterinmetabolismus nahe. Auf zellulärer Ebene war in *Sgp1*-defizienten Mausfibroblasten eine Cholesterinverteilungsstörung beobachtet worden, bei der Cholesterin in Endo-/Lysosomen akkumulierte, ähnlich wie bei NPC (Vienken et al. 2017).

Zur näheren Untersuchung der Hypercholesterinämie bei *Sgp1*-Defizienz in Maus und Mensch, und zum besseren Verständnis der Kreuzregulation des Sphingolipid- und Cholesterinmetabolismus, sollte die Rolle der *Sgp1* in der Leber, dem Hauptort des Lipidmetabolismus, analysiert werden. Hierzu sollte ein Mausmodell mit Hepatozyten-spezifischen *Sgp1*-Knockout generiert und charakterisiert werden.

Weitere Untersuchungen an Fibroblasten von Maus und Mensch sollten dazu beitragen, die Auswirkungen einer *Sgp1*-Defizienz auf zellulärer Ebene zu verstehen. Die *Sgp1*-defizienten Mausfibroblasten weisen einen spezifischen Calciumphänotyp mit erhöhter zytosolischer Calciumkonzentration und vermehrter Calciumspeicherung in Thapsigargin-sensitiven Speichern und Lysosomen auf (Ihlefeld et al. 2012; Vienken et al. 2017). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt. Da die PMCA in Fibroblasten entscheidend zur Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration beiträgt, sollte ihre Rolle näher untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob auch in humanen *Sgp1*-defizienten Fibroblasten Störungen der Calciumhomöostase sowie der intrazellulären Cholesterinverteilung vorliegen könnten. Hierzu standen im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Janecke von der Universität Innsbruck Hautfibroblasten eines SPLIS-Patienten zur Verfügung (Janecke et al. 2017). Diese Untersuchungen sollten die Rolle der *Sgp1* auf zellulärer Ebene adressieren, um zukünftig zum besseren Verständnis der multiplen Symptome in verschiedenen Organen der SPLIS-Patienten beizutragen.

## 2. Material & Methoden

Die nachfolgenden Unterpunkte geben einen Überblick über die während der Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Während dieser Arbeit wurde mit den in Tabelle 3 beschriebenen Zelllinien gearbeitet. In der Tabelle ist ebenfalls angegeben, welches Zellkulturmedium für die Kultivierung dieser Zellen verwendet wurde.

**Tabelle 3: Zellkulturmedium der kultivierten Zellen**

Zelllinie	Medium	Zusatz	Lieferant
MEF	DMEM/F-12	10% FKS 1% PenStrep	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
HTLA	DMEM/F-12	10% FKS 1% PenStrep	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Humane Fibroblasten	DMEM/F-12	10% FKS (Hitze-inaktiviert) 1% PenStrep 15 mM HEPES	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Primäre Hepatozyten	Williams E	10% FKS 1% PenStrep 2 mM L-Glutamin	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

Die humanen Fibroblasten des SPLIS-Patienten (homozygot p.Leu312Phefs\*30) wurden von Herrn Prof. Dr. Janecke (Universitätskliniken Innsbruck, Deutschland) generiert und publiziert (Janecke et al. 2017). Freundlicherweise wurden sie unserem Labor im Rahmen einer Forschungskooperation zur Verfügung gestellt. Die humanen Fibroblasten der NPC-Patienten NPC-07 (#GM18407; c.1211G>A, R404Q/c.3425T>C, M1142T; geringe Restaktivität) und NPC-36 (#GM18436; c.1836A>C, E612D/c.1628delC, F542fsX; keine Restaktivität) wurden käuflich erworben (*Coriell Institute for Medical Research*; Camden, USA). Die embryonalen Mausfibroblasten wurden von Herrn Prof. Dr. Paul van Veldhoven (Katholieke Universiteit Leuven, Niederlande) isoliert und bereitgestellt. Die Isolation der primären Hepatozyten erfolgte aus der eigens etablierten Mauslinie *Sgpl1<sup>fl/fl</sup>/AlbCre* und wurde von Frau Agnes Rudowski übernommen. Die HTLA Zellen stammen ursprünglich von Herrn Prof. Dr. Richard Axel (Howard Hughes Medical Institute, Mortimer B. Zuckerman Mind Brain Behavior Institute, Columbia University, USA) und werden detailliert von Kroeze et al. beschrieben (Kroeze et al. 2015).

### 2.1.2 Antikörper

In Tabelle 4 sind die primären Antikörper der Western Blot Färbung mit der Spezies, in der sie hergestellt wurden, sowie der Größe der detektierten Bande aufgeführt. Alle Antikörper wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die dazugehörigen sekundären Antikörper sind mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP) gekoppelt und in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 4: Primäre Antikörper**

Antikörper	Spezies	Größe	Verdünnung		Hersteller
ACTB	Maus	42 kDa	1:5.000	A5441	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
AKT	Kaninchen	60 kDa	1:1.000	9272	Cell Signaling (Danvers, USA)
APOM	Kaninchen	26 kDa	1:1.000	#PA5-92403	Invitrogen, Thermo Fisher (Pittsburgh, USA)
APP	Kaninchen	95 kDa	1:1.000	ab32136	Abcam (Cambridge, UK)
CD147	Kaninchen	42 kDa	1:1.000	ab212057	Abcam (Cambridge, UK)
FASN	Kaninchen	273 kDa	1:1.000	ab128856	Abcam (Cambridge, UK)
HMGCR	Kaninchen	97 kDa	1:1.000	ab174830	Abcam (Cambridge, UK)
LDLR	Kaninchen	93 kDa	1:1.000	ab30532	Abcam (Cambridge, UK)
LXR	Kaninchen	50 kDa	1:1.000	ab176323	Abcam (Cambridge, UK)
NPC1	Kaninchen	180 kDa	1:1.000	ab134113	Abcam (Cambridge, UK)
pAKT	Maus	60 kDa	1:1.000	4051	Cell Signaling (Danvers, USA)
PMCA1	Kaninchen	130 kDa	1:1.000	ab190355	Abcam (Cambridge, UK)
PPAR $\gamma$	Kaninchen	55 kDa	1:1.000	sc-7196	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
SGPL1 (human)	Ziege	63 kDa	1:1.000	AF5535	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
SGPL1 (murin)	Kaninchen	63 kDa	1:1.000	HPA021125	Atlas Antibodies (Bromma, Schweden)

**Tabelle 5: Sekundäre Antikörper**

Anti	Spezies	Verdünnung		Hersteller
Kaninchen IgG	Esel	1:2.500	NA934V	GE Healthcare UK limited (Amersham; UK)
Maus IgG	Schaf	1:2.500	NXA931V	GE Healthcare UK limited (Amersham; UK)
Ziege IgG	Esel	1:2.500	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)

### 2.1.3 Plasmide

In Tabelle 6 sind die Plasmide aufgelistet, welche für die Transfektion der Zellen verwendet wurden.

**Tabelle 6: Plasmide**

Plasmid	Vektor (Basenpaare)	Promotor		Hersteller
S1PR2-Tango	Empty Tango (6632)	CMV	#66497	Addgene (Watertown, USA)

### 2.1.4 Primer

In Tabelle 7 sind die Primer der Mausgenotypisierung mit ihrer Sequenz aufgelistet. Alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Eurofins Scientific (Luxemburg, Luxemburg) erstanden.

**Tabelle 7: Oligonukleotidsequenzen der Genotypisierung**

Primer	Nukleotid-Sequenz
flox cre 1	5'- GTG GTT CTG GAT GGA GTT TA -3'
flox cre 2	5'- GAA ATT GAG CAT ATC CGT TC -3'
flox cre 3	5'- TTG AGG CTT GTA AGG TTA AGT C -3'
mutant alb cre	5'- GAA GCA GAA GCT TAG GAA GAT GG -3'
Wt alb cre	5'- TGC AAA CAT CAC ATG CAC AC -3'
common alb cre	5'- TTG GCC CCT TAC CAT AAC TG-3'

Die Bestimmung der Expression der Ceramidsynthasen wurde freundlicherweise von Khadija El-Hindi (Institut für Klinische Pharmakologie, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland) übernommen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgelistet und wurden alle von BioSpring (Frankfurt, Deutschland) bezogen (Oertel et al. 2017).

**Tabelle 8: Oligonukleotidsequenzen der Ceramidsynthasen**

Primer	Nukleotid-Sequenz
<i>CerS1</i>	5'- GCC ACC ACA CAC ATC TTT CGG -3' 5'- GGA GCA GGt AAG CGC AGT AG -3'
<i>CerS2</i>	5'- GAA GTG GGA AAC GGA GTA GCG -3' 5'- AGT TCA CAG GCA GCC ATA GTC G -3'
<i>CerS3</i>	5'- CCT GGC TGC TAT TAG TCT GAT G-3' 5'- CTG CTT CCA TCC AGC ATA GG-3'
<i>CerS4</i>	5'- CTG TGG TAC TGT TGT TGC ATG AC-3' 5'- GCG CGT GTA GAA GAC TAA G-3'
<i>CerS5</i>	5'- TGG CCA ATT ATG CCA GAC GTG AG-3' 5'- GGT AGG GCC CAA TAA TCT CCC AGC-3'
<i>CerS6</i>	5'- GCA TTC AAC GCT GGT TTC GAC-3' 5'- TTC AAG AAC CGG ACT CCG TAG-3'
<i>Gapdh</i>	5'- AGG TCG GTG TGA TTT G -3' 5'- TGT AGA CCA TAG GTC -3'

### 2.1.5 TaqMan-Sonden

Die Oligonukleotide für die Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wurden bei Applied Biosystems erworben und sind in Tabelle 9 gelistet.

**Tabelle 9: Oligonukleotidsequenzen der Polymerase Kettenreaktion**

Gen	Identifikationsnummer*
<i>18s</i>	Hs99999901_s1
<i>Abca1</i>	Mm00442646_m1
<i>Abcb1a</i>	Mm00440761_m1
<i>Abcb1b</i>	Mm00440736_m1
<i>Abcc1</i>	Mm00456156_m1
<i>Abcc4</i>	Mm01226381_m1
<i>Abcg1</i>	Mm00437390_m1
<i>ApoM</i>	Mm00444525_m1
<i>APP</i>	Hs00169098_m1
<i>ATP2A1</i>	Hs01092295_m1
<i>ATP2A2</i>	Hs00544877_m1
<i>ATP2A3</i>	Hs01024558_m1
<i>ATP2B1</i>	Hs00155949_m1
<i>ATP2B2</i>	Hs01090453_m1
<i>ATP2B3</i>	Hs05016448_s1

---

<i>ATP2B4</i>	Hs00608066_m1
<i>ATP2C1</i>	Hs00995930_m1
<i>ATP2C2</i>	Hs00939492_m1
<i>BACE1</i>	Hs00201573_m1
<i>Bsg</i>	Mm01144228_g1
<i>Hmgcr</i>	Mm01282499_m1
<i>Ldlr</i>	Mm01177349_m1
<i>ITPR1</i>	Hs00181881_m1
<i>ITPR2</i>	Hs00181916_m1
<i>ITPR3</i>	Hs01573539_m1
<i>MCOLN1</i>	Hs00330542_m1
<i>MCOLN2</i>	Hs01552053_g1
<i>NPC1</i>	Hs00264835_m1
<i>NPC2</i>	Hs00197565_m1
<i>ORAI1</i>	Hs03046013_m1
<i>ORAI2</i>	Hs00259863_m1
<i>ORAI3</i>	Hs00743683_s1
<i>p21</i>	Hs99999142_m1
<i>Pparγ</i>	Mm01184322_m1
<i>PSEN1</i>	Hs00997789_m1
<i>PSEN2</i>	Hs01577197_m1
<i>SGPL1</i>	Hs00187407_m1 Mm00627244_m1
<i>SPHK1</i>	Hs00184211_m1
<i>SPHK2</i>	Hs00219999_m1
<i>SPNS2</i>	Hs01390449_g1 Mm00461932_g1
<i>Sptlc1</i>	Mm00447343_m1
<i>Sptlc2</i>	Mm00448871_m1
<i>Sptlc3</i>	Mm01278138_m1
<i>Sptssa</i>	Mm01267361_g1
<i>Sptssb</i>	Mm01952615_u1
<i>STIM1</i>	Hs00963373_m1
<i>STIM2</i>	Hs00957788_m1
<i>TRPML1</i>	Hs01100653_m1

---

\*Hs = humane Sonde, Mm = murine Sonde

### 2.1.6 Puffer

Die während dieser Arbeit verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Puffer**

Puffer und Lösungen	Komponenten	Konzentration
4% Paraformaldehydlösung	PFA	4%
	NaOH	10 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
	HCl	6 mM
Dulbeccos-Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS-Puffer)	NaCl	138 mM
	KCl	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
Hanks' balanzierte Salzlösung (HBSS-Puffer)	NaCl	118 mM
	KCl	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	Glukose	5 mM
	HEPES	15 mM
		pH 7,4
Hepatozyten-Puffer 1	HBSS ohne CaCl <sub>2</sub> , ohne MgCl <sub>2</sub>	
	HEPES	15 mM
	EGTA	2,5 mM
	Glucose	1 g/l
	NEAA	1-fach
	Pen/Strep	1%
Hepatozyten-Puffer 2	HBSS mit CaCl <sub>2</sub> , mit MgCl <sub>2</sub>	
	HEPES	15 mM
	NEAA	1-fach
	Collagenase	0,13 mg/ml
Krebs-Henseleit-Puffer (KHP, Seahorse)	NaCl	111 mM
	KCl	4,7 mM
	MgSO <sub>4</sub>	2 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 mM
		pH 7,4
	HEPES (pH 7,4) frisch dazu	5 mM
	Glukose	2 g/l
Laemmli-Puffer (Protein Ladepuffer)	Glycerol	10 %
	SDS	2,5 %
	Tris-HCl	31,25 mM
	DTT	12,5 mM
	Bromphenolblau	0,025 ‰
	pH 6,5	

Lysepuffer Western Blot	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	150 mM
	Glycerol	10 %
	EDTA	2 mM
	EGTA	2 mM
	NaF	50 mM
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	20 mM
	DTT	2 mM
	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	200 µM
	Triton X-100	1 %
	β-Glycerolphosphat	40 mM
		pH 7,4
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
Sammelgelpuffer	Tris-HCl	0,5 M
		pH 6,8
SDS-Laufpuffer	Tris-Base	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 %
		pH 8,3
TBE-Puffer	Tris-Base	1 M
	Borsäure	1 M
	EDTA (pH 8,0)	0,02 M
Transferpuffer nach Tobwin	Tris-Base	25 mM
	Glycin	200 mM
	Methanol	20 %
		pH 8,3
Trenngelpuffer	Tris-HCl	1,5 M
		pH 8,8

### 2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Die Chemikalien und Reagenzien, welche während dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalien / Reagenzien	Lieferant
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

---

Absolute Blue qPCR Low Rox Mix	Thermo Fisher (Pittsburgh, USA)
Acrylamid Lösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Agarose	Invitrogen, Thermo Fisher (Pittsburgh, USA)
Alexa Fluor® 488	Invitrogen, Thermo Fisher (Pittsburgh, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Borsäure	MP Biomedicals (Santa Ana, USA)
Bromphenolblau	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform ≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Collagenase IV Clostridium histolyticum Type IA (Artikelnummer C9891)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Diethyldicarbonat (DEPC)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
dNTPs (ROTI-Mix PCR, 10 nM)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Entellan®	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Eosin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol ≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Filipin III aus streptomyces filipinesis	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
FluoForte (GFP-certified)	Enzo Life Science GmbH (Lörach, Deutschland)
Fura-2/Acetoxy-methylester (Fura-2/AM)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

---

---

Glycin	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Gly-Phe- $\beta$ -Naphthylamid (GPN)	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Hämatoxylin	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Hanks' Balazierte Salzlösung HBSS (ohne CaCl <sub>2</sub> , ohne MgCl <sub>2</sub> )	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Hanks' Balazierte Salzlösung HBSS (mit CaCl <sub>2</sub> , mit MgCl <sub>2</sub> )	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hoechst 33342	Invitrogen, Thermo Fisher (Pittsburgh, USA)
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Isofluran-Piramal	Piramal Critical Care (Hallbergmoos, Deutschland)
Isopropanol $\geq$ 99,0 %	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Lipofectamin 2000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH (Bad Segeberg, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldenburg, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumpyrophosphat wasserfrei (Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Alfa Aesar GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Paraffin	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

---

---

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Pro Sieve QuadColor Protein Marker	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldenburg, Deutschland)
Proteaseinhibitor-Mix (PIM)	Hoffmann – La Roche (Mannheim, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA, 2 mg/ml)	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Roti-Quant (Bradford-Reagenz)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Thapsigargin	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B. V. (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
TRI Reagenz®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Tris(hydroxy-methyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Trypsin/EDTA-Lösung	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
Tween-20	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

---

### 2.1.8 Reagenziensets

Die verwendeten Reagenziensets sind in Tabelle 12 aufgelistet. Angegeben ist ebenfalls von welcher Firma sie bezogen wurden.

**Tabelle 12: Reagenziensets**

Sets	Hersteller
Luciferase Assay System	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Washington, USA)
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### 2.1.9 Geräte

Die verwendeten Geräte sind Tabelle 13 aufgelistet. Angegeben ist ebenfalls von welcher Firma sie bezogen wurden.

**Tabelle 13: Geräte**

Instrument	Lieferant
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Heracell 240i)	Thermo Fisher Scientific (Washington, USA)
Dual Monochromator (Spectramax M5e ELISA-Reader)	Molecular Devices, Ismaning
Elektrophorese-Netzgerät (PowerPac HC)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Filmentwicklungsmaschine (CP1000)	Afga (Mortsel, Belgien)
Fluoreszenz-Spektralphotometer (Hitachi F2500)	Hitachi (Chiyoda, Japan=)
Gel-Apparaturen (Mini-PROTEAN Tetra Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Gewebsfiltrationsautomat Leica TP 1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
Hemovet – scil vetabc	Scil animal care company GmbH (Viernheim, Deutschland)
Laser Scanning Mikroskop (LSM 510 META)	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikro-Dismembrator S	B. Braun Biotech International (Melsungen, Deutschland)
Mikrotom Leica RM2235	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)

Paraffin Einbettmaschine Leica EG1150H	Leica Biosystems Nussloch GmbH (Nussloch, Deutschland)
PCR-Thermocycler (7500 Fast Real-Time PCR System)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
PCR-Thermocycler (GeneAmp 9700)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
pH-Meter (PB-11)	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Reflotron® Plus	La Roche (Mannheim, Deutschland)
RVT400 Refrigerated Vapor Trap	Thermo Fisher Scientific (Washington, USA)
SAVANT SC210A	Thermo Fisher Scientific (Washington, USA)
Semidry Blotter (Trans-Blot Turbo)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Spektralphotometer (Nanodrop 1000)	Thermo Fisher Scientific (Washington, USA)
Thermo-Shaker (Univortemp MT)	Universalt Labortechnik GmbH (Leipzig, Deutschland)
XF96 Extracellular Flux Analyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Zeiss Axioskop 2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen, Deutschland)

### 2.1.10 Software

Die während der Erstellung dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 14 aufgelistet.

**Tabelle 14: Verwendete Software**

Software	Verwendung	Hersteller
ACD/ChemSketch 2012	Strukturformeln erstellen	ACD/Labs (Toronto, Kanada)
Excel 2013	Datenauswertung	Microsoft (Redmond, USA)
FL Solutions 2.0	Calciummessung	Hitachi (Chiyoda, Japan)
GraphPad Prism 9.1.2	Graphiken erstellen, Statistik	GraphPad Software, Inc.
ImageJ Version 1.52a	Blot Auswertung	Wayne Rasband (NIH)
PowerPoint 2019	Abbildungsgestaltung	Microsoft (Redmond, USA)
Quantity One 4.6.5	Visualisierung Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Softmax 4.6.5	Datenerfassung Plattenleser	Molecular Devices (Ismaning, Deutschland)
TaqMan - 7500 Fast 1.4.0	qRT-PCR	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Word 2019	Textbearbeitung	Microsoft (Redmond, USA)
Zeiss Zen Imaging Software 2008	Fluoreszenzmikroskopie	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)

## 2.2 Methoden

Einen Überblick über die verwendeten Methoden und die genaue Durchführung wird in den nächsten Unterpunkten gegeben.

### 2.2.1.1 Generierung Hepatozyten-spezifischer *Sgp1* knockout Mäuse

Die *Sgp1*<sup>loxP/loxP</sup>-Mäuse, bei denen die Exons 10-12 der *Sgp1* von loxP-Stellen flankiert sind, wurden bereits beschrieben und freundlicherweise von Dr. Julie Saba zur Verfügung gestellt (Degagné et al. 2014). Diese Mäuse wurden mit Mäusen gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Albumin-Promotors exprimieren (B6.Cg-Speer6-ps1Tg(Alb-cre)21Mgn/J; Jax stock #003574 von Jackson Laboratory; (Postic et al. 1999)). Die Nachkommen wurden über mehrere Generationen rückgekreuzt, um *Sgp1*<sup>fl/fl</sup>/*AlbCre*<sup>-/-</sup> (*Sgp1*<sup>Kontrolle</sup>) und *Sgp1*<sup>fl/fl</sup>/*AlbCre*<sup>+/-</sup> (*Sgp1*<sup>HepKO</sup>) Mäuse zu erhalten.

### 2.2.1.2 Genotypisierung

Der Genotyp der Mäuse wurde mit Hilfe des *REExtract-N-Amp*<sup>TM</sup> *Tissue PCR Kits* von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bestimmt. Die DNS der Proben wurde in einem einfachen Schritt herausgelöst und anschließend mittels einer PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

Phase 1:	03:00 min	94 °C	
Phase 2:	00:30 sec	57 °C	40 Zyklen
	00:30 sec	72 °C	
	01:00 min	72 °C	
Phase 3:	10:00 min	72 °C	

Die PCR-Proben wurden zur Auswertung auf ein Agarose-Gel (1 % Agarose in Tris-Borat EDTA (TBE) Puffer) aufgetragen und mittels Elektrophorese bei 100 V aufgetrennt. Das Anlegen eines elektrischen Feldes führt zur Auftrennung der Nukleinsäurestränge

entsprechend ihrer Länge. Für die spätere Visualisierung wurde eine 0,8 - 3,0 %-ige Midori Green Advance-Lösung in das Agarosegel mit eingegossen.

### **2.2.1.3 Präparation der Versuchstiere**

Zunächst wurde die Maus, gemäß den Empfehlungen der *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals*, mit Hilfe von Isoflurangas betäubt und anschließend durch eine zervikale Dislokation getötet. Zu Beginn der Präparation wurde der Bauchraum geöffnet und für klinische Untersuchungen Blut entnommen. Dies geschah durch eine Herzpunktion (rechte Herzkammer). Vor Entnahme der Organe wurde die Maus mit einer DPBS-Heparin-Lösung perfundiert. Hierfür wurde eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt und anschließend der rechte Ventrikel geöffnet. Somit wurde die Lösung durch den großen Blutkreislauf gespült und konnte anschließend ablaufen. Nach Verlust der roten Färbung wurden die Organe präpariert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das entnommene Blut wurde in heparinbeschichtete Blutröhrchen überführt und am selben Tag gemessen. Ein Teil des Blutes wurde zur Plasmagewinnung in EDTA-beschichteten Blutröhrchen umgehend zentrifugiert (10 min, 2.000 x g, 4 °C) und das Plasma anschließend für Messungen verwendet bzw. bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Für histologische Untersuchungen wurden einzelne Leberlappen in Paraffin eingegossen (siehe 2.2.1.6). Für die Proteinlyse und die mRNA-Extraktion wurde das Gewebe mit Hilfe des Mikro-Dismembrators S pulverisiert. Hierzu wurden alle zugehörigen metallischen Schüttelgefäße und Metallkugeln mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Das Organ wurde zusammen mit einer kalten Metallkugel in ein gekühltes Schüttelgefäß gegeben und anschließend in den Mikro-Dismembrator S eingespannt. Anschließend wurde das Gewebe für 30 Sekunden bei 3 000 rpm pulverisiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.4 Hepatozytenisolierung**

Zur Isolierung der Hepatozyten wurde die Maus zunächst mit Isoflurangas betäubt und durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Leber wurde frei präpariert und mit Hepatozyten-Puffer 1 und anschließend mit Hepatozyten-Puffer 2 für jeweils ca. zehn Minuten mit ungefähr 100 ml gespült. Hierzu wurde die Pfortader kannuliert und die Leberarterie aufgeschnitten. Die perfundierte Leber wurde frei präpariert und in Medium geschwenkt, um die gelösten Hepatozyten aus der Leber heraus zu spülen. Abschließend wurde die Suspension mit Hilfe eines Zellfilters (Porengröße von 100 µm, Thermo Fisher, Pittsburgh, USA) filtriert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 50 x g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

### 2.2.1.5 Analyse verschiedener Parameter im Blut

Das Blut der Mäuse wurde mit Hilfe des Reflotron Plus' (La Roche, Mannheim, Deutschland) analysiert. Mit Hilfe verschiedener Teststreifen konnten die leberspezifischen Enzyme Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), sowie Triglyceride und Cholesterin im Vollblut gemessen werden. Das HDL-Cholesterin hingegen wurde im Plasma bestimmt.

Die Bestimmung der Blutzellzahlen erfolgte mit dem Hemovet (Scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland).

Weitere HDL- und LDL-Cholesterinmessungen wurden mit einem Cobas 8000 c701 auto analyser von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) von LABOKLIN GmbH & Co. KG (Bad Kissingen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.1.6 Herstellung Paraffinblöcke

Zur Herstellung von Paraffinblöcken wurde ein präparierter Leberlappen zunächst über Nacht in 4 %-iger Paraformaldehydlösung fixiert und am nächsten Tag dreimal für eine Stunde mit Wasser gewaschen. Da das Einbettmedium nicht wasserlöslich ist, wurde das Gewebe mit Hilfe einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Die Entwässerung erfolgte in dem Gewebeeinfiltrationsautomaten TP1020 der Firma Leica Leica über Nacht mit dem nachfolgendem Programm:

**Tabelle 15: Programm zur Entwässerung der Paraffinblöcke**

Reagenz	Vakuum	Bewegung (auf/ab)	Zeit [min]
80 % Ethanol		ja	0:30
70 % Ethanol		ja	1:30
90 % Ethanol		ja	1:30
96 % Ethanol		ja	1:30
100 % Ethanol		ja	1:30
100 % Ethanol		ja	1:30
Isopropanol		ja	1:30
Isopropanol		ja	1:30
Xylol	ja	ja	1:30
Xylol	ja	ja	1:30
Paraffin	ja	ja	1:30
Paraffin	ja	ja	1:30

Im nächsten Schritt wurde der Leberlappen mittels Leica EG1150H System in Paraffin eingebettet. Die Probe wurde in einem Einbettkasten mit heißem Paraffin überschichtet, wobei der Einbettkasten den Blockträger bildete. Nach dem Erkalten konnte der fertige Paraffinblock herausgelöst werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur gelagert. Mit Hilfe des Leica RM2235 Mikrotoms wurden 3 µm dicke Schichten des Paraffinblocks abgetrennt. Der Schnitt wurde zunächst in ein Streckbad überführt, worin er sich durch die Oberflächenspannung plan zog. Anschließend wurde der Schnitt auf einen Objektträger übertragen und über Nacht auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte getrocknet. Das Präparat wurde bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

## **2.2.2 Zellkultur**

### **2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinien**

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre in Zellkulturflaschen kultiviert. Das verwendeten Zellkulturmedien und die Zusätze sind in Tabelle 3 gelistet.

### **2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und -vitalität**

Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde eine „*Neubauer-improved*“-Zählkammer verwendet. Die jeweilige Zellsuspension wurde mit einer 0,2 %-igen Trypanblaulösung versetzt, um zusätzlich eine Aussage über die Zellvitalität treffen zu können. Somit war eine Unterscheidung zwischen toten und intakten Zellen möglich, da lediglich tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und blau gefärbt waren.

### **2.2.2.3 Transiente Transfektion mittels Lipofectamin 2000**

Die Zellen wurden bei circa 80 % Konfluenz transfiziert. Dazu wurden sowohl das Lipofectamin als auch die DNS zunächst in serumfreien Medium angesetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit der Transfektionslösung behandelt. Nach weiteren vier Stunden wurde die Transfektionslösung gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurde nach circa 36 Stunden unter einem Mikroskop analysiert. Diese Transfektionsmethode wurde für die Transfektion von HTLA-Zellen mit dem S1P2-Tango-Konstrukt verwendet.

## **2.2.3 Proteinanalytik**

### **2.2.3.1 Proteinlyse**

Zur Proteinlyse aus Zellen wurde das Zellkulturmedium verworfen, die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen und in Lysepuffer aufgenommen. Dem Lysepuffer wurde vor Verwendung ein Proteaseinhibitor-Mix (PiM, 1x) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) frisch hinzugefügt. Nach dem Überführen in ein Reaktionsgefäß wurden die Zellen eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 14 800 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das Lysat (Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nachfolgend bei -20 °C gelagert.

Für die Proteinlyse aus Gewebe wurde eine kleine Menge des pulverisierten Organs (siehe 2.2.1.3) in Lysepuffer aufgenommen, eine Stunde auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 14 800 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das Lysat (Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Proteinkonzentration des Lysats wurde photometrisch mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt (Bradford 1976). Diese Konzentrationsbestimmung basiert auf der Komplexbildung zwischen dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blue und den kationischen und unpolaren Seitenketten des Proteins in saurer Lösung, sowie einer damit einhergehenden Verschiebung des Absorptionsmaximums. Eine Rinderserumalbumin Verdünnungsreihe (BSA: 0,01 – 0,1 µg/µl) wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden und zur anschließenden Konzentrationsbestimmung verwendet. Jede Probe wurde als 1:100 Verdünnung des Lysats eingesetzt und als Duplikat vermessen. In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte wurde das verdünnte Lysats im Verhältnis 1:5 mit der Bradfordreagenz (Roti-Quant, nach Herstellerangaben) versetzt. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Plattenleser Spectramax.

### **2.2.3.3 Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die denaturierende Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) diente der Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld entsprechend der apparenten Molekülmasse. Die Lysate wurden mit Tris-Glycin-Puffer (Laemmli-Puffer, siehe Tabelle 10) versetzt und anschließend zur Denaturierung für fünf Minuten bei 96°C inkubiert. Für die semiquantitative Proteinanalytik wurden pro Probe 40-50 µg Protein und zur Größenbestimmung ProSieve QuadColor Protein Marker auf das Gel aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit 8-12 %-igen Polyacrylamidgelen in Laufpuffer

(siehe Tabelle 10) durchgeführt. Die Konzentration der Polyacrylamidgele wurde der Größe der nachzuweisenden Proteine angepasst (geringere Konzentration bei größeren Proteinen). Die Proteinlysate wurden bei 100 V entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

#### 2.2.3.4 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines *Semidry Blotters* (Biorad) bei 0,2 A für 85 Minuten elektrophoretisch auf eine Polycylnylenfluoridmembran (PVDF) transferiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor mit Isopropanol aktiviert.

Nach dem Transferieren auf die Membran wurde diese für zehn Minuten mit PBS + 1 % Tween (PBS-T) Puffer gewaschen. Die anschließende Inkubation mit 5 %-iger Milch in PBS-T (1h, RT) bewirkte eine Sättigung der unspezifischen Bindungen.

Der jeweilige primäre Antikörper wurde entsprechend der angegebenen Verdünnung (siehe Tabelle 4) angesetzt und die Membran über Nacht bei 4 °C mit der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für 15 Minuten mit PBS-T Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde mit der Sekundärantikörperlösung (Tabelle 5) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBS-T Puffer gewaschen. Für die Entwicklung der Membranen wurde ein Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter Sekundärantikörper und Immobilon Western HRP Substrat verwendet. Die Membran wurde in der Entwicklermaschine CP1000 auf einem Lumi-Film sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung wurde  $\beta$ -Aktin (Tabelle 4) als Referenz verwendet.

#### 2.2.4 Untersuchungen auf mRNA-Ebene

##### 2.2.4.1 mRNA-Isolierung – TRI Reagenz®

Die Zellen und das pulverisierte Gewebe wurden in TRI Reagenz® gelöst und anschließend die mRNA mit Hilfe einer standardisierten phenolbasierten Methode, der „*single-step*“ Methode nach Chomczynski und Sacchi, extrahiert (Chomczynski und Sacchi 1987).

Hierbei wurden die Zellen geerntet, das Medium verworfen und die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen. Die Zellen wurden in TRI Reagenz® lysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Isolierung aus Gewebe wurde eine kleine Menge des pulverisierten Organs in TRI Reagenz® aufgenommen und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die mRNA-Isolierung wurde die Probe zunächst auf Eis aufgetaut und zur Bildung des Nukleo-Protein-Komplexes für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde mit Chloroform versetzt und ca. 20-Mal invertiert. Nach weiteren zehn Minuten Inkubation (RT) wurde die Probe bei 13 000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Drei

Phasen bildeten sich, wobei die obere wässrige Phase die RNS enthielt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Zu dem Überstand wurde 100 %-iges Isopropanol zur Fällung der RNS hinzugegeben. Die Probe wurde erneut ca. 20-Mal invertiert und nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten (RT) erneut zentrifugiert (13 000 x g, 10 min, 4 °C). Die sedimentierte RNS wurde mit 75 %-igem Ethanol gewaschen (schütteln, Zentrifugation 13 000 x g, 5 min, 4 °C) und anschließend das Sediment für fünf bis zehn Minuten luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst und für zehn Minuten bei 55 °C und 300 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die gereinigte mRNS-Lösung wurde bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.4.2 mRNS-Isolierung – Säulen-basiert (Qiagen)**

Die RNS wurde mit Hilfe des *RNeasy® Plus Mini Kit* aus ca.  $1 \cdot 10^7$  Zellen isoliert. Die Proben wurden zunächst in RLT Plus Puffer lysiert und mit Hilfe einer mitgelieferten *gDNA Eliminator spin column* die störende DNS entfernt. Der Durchfluss wurde anschließend mit 70 %-igem Ethanol versetzt und auf die *RNeasy spin column* gegeben. In mehreren Waschschrritten wurde die, an die Säule gebundene, RNS gewaschen und anschließend mit Nuclease-freiem Wasser eluiert. Diese Methode zur RNS-Isolierung wurde für die humanen Fibroblasten verwendet. Die aufgereinigte RNS wurde anschließend für die Genexpression mittels TaqMan Array (siehe 2.2.4.7) verwendet.

#### **2.2.4.3 RNS-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der isolierten RNS wurde spektroskopisch mittels UV/vis-Spektroskopie bestimmt. Hierbei wurde die Transmission von Molekülen gemessen und daraus ihre Absorption und über das Lambert-Beer-Gesetz anschließend die Konzentration berechnet. Die Messung erfolgte am Nano Drop 1000 Spektrophotometer und die Berechnung der Konzentration erfolgte automatisch.

#### **2.2.4.4 RNS-Integrität**

Die Integrität der gereinigten mRNS wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde 1,0 µg der mRNS mit Ladepuffer versetzt und für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Ein Agarosegel (1 % Agarose in TBE-Puffer) wurde mit der Probe beladen und für 45 Minuten bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde ein 0,8 - 3,0 %-ige Midori Green Advance-Lösung in das Gel mit eingegossen und mit einer Fluoreszenzkamera detektiert.

### 2.2.4.5 Reverse Transkription

Die mRNA wurde mit Hilfe des „*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ Applied Biosystems in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden 1,2 µg mRNA eingesetzt und mit 10 µM Random Hexamer Primer versetzt. Dieser Ansatz wurde bei 70 °C für fünf Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurde der Mastermix, bestehend aus Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), Ribolock (20 U), dNTPmix (2 mM) und reverser Transkriptase (40 U) pro Probe, vorbereitet. Zu jeder Probe wurde der Mastermix im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und das Ganze für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Proben für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt. Die Lagerung geschah bei -20 °C.

### 2.2.4.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde mit dem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Für das Zielgen wurden pro Probe 1 µl Primermix, 9 µl *Absolute Blue qPCR Low Rox Mix* und 5 µl Wasser mit 5 µl cDNA verwendet - für das Referenzgen 18s hingegen 0,3 µl Primermix, 9 µl *Absolute Blue qPCR Low Rox Mix* und 9,7 µl Wasser mit 1 µl cDNA. Die Reaktionsansätze wurden in 0,2-ml-Reaktionsgefäße pipettiert und pro Probe 9 µl pro Doppelwert in eine 96-Wellplatte pipettiert.

Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

Phase 1:	00:15 min	50 °C	
Phase 2:	15:00 min	95 °C	
Phase 3:	00:15 min	95 °C	40 Zyklen
Phase 4:	01:00 min	60 °C	

Die mRNA-Expression wurde mit der  $\Delta$ Ct-Methode ausgewertet. Das Haushaltsgen 18s diente hierbei als Referenz. Die verwendeten Oligonukleotide und die jeweilige Identifikationsnummer sind in 2.1.5 aufgeführt.

Die mRNA-Expressionsniveaus der Ceramidsynthasen (*CerS1-6*) und Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (*Gapdh*) wurden mit dem *Syber Select MasterMix* mit dem QuantStudioTM5 Real Time PCR-Gerät gemessen. Diese Messung wurde freundlicherweise von Khadija El-Hindi (Universitätsklinikum der Goethe Universität in Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Alle PCR-Materialien wurden von Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

### 2.2.4.7 TaqMan Genexpressionsanalyse (TaqMan Array)

Um eine große Anzahl spezifischer Gene analysieren zu können, wurden sogenannte *TaqMan Array* Platten verwendet. Hierbei wurden mit spezifischen TaqMan-Sonden vorbeschichtete Mikrotiterplatten bei der Firma AppliedBiosystems (Foster City, USA) erworben. Für jede Zelllinie wurde eine Platte verwendet, welche mit 32 verschiedenen Sonden jeweils als Triplikat vorbeschichtet war. Als Referenzgen enthielten die Platten eine 18s spezifische Sonde. Das Schema der Platten ist in Tabelle 16 aufgelistet, das Schema wiederholt sich jeweils in den Spalten 5 bis 8 und 9 bis 12. Die verwendeten Oligonukleotide und die jeweilige Identifikationsnummer sind in 2.1.5 aufgeführt.

**Tabelle 16: Schema der Sondenbeschichtung der *TaqMan Array* Platten**

	1	2	3	4
<b>A</b>	<i>18s rRNA</i>	<i>SGPL1</i>	<i>BACE1</i>	<i>APP</i>
<b>B</b>	<i>PSEN2</i>	<i>PSEN1</i>	<i>ATP2A1</i>	<i>ATP2A2</i>
<b>C</b>	<i>ATP2A3</i>	<i>ATP2B1</i>	<i>ATP2B2</i>	<i>ATP2B3</i>
<b>D</b>	<i>ATP2B4</i>	<i>ATP2C1</i>	<i>ATP2C2</i>	<i>MCOLN1</i>
<b>E</b>	<i>TPCN2</i>	<i>TPCN1</i>	<i>NPC1</i>	<i>NPC2</i>
<b>F</b>	<i>STIM1</i>	<i>STIM2</i>	<i>ORAI1</i>	<i>ORAI2</i>
<b>G</b>	<i>ORAI3</i>	<i>SPHK1</i>	<i>SPHK2</i>	<i>ITPR1</i>
<b>H</b>	<i>ITPR2</i>	<i>ITPR3</i>	<i>SPNS2</i>	<i>CDKN1A</i>

Für jede Reaktion wurden 40 ng cDNS eingesetzt und im Verhältnis 1:1 mit dem *TaqMan*<sup>®</sup> *Gene Expression Master Mix* vermengt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 10 µl des Reaktionsansatzes pipettiert.

Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

Phase 1:	02:00 min	50 °C	40 Zyklen
Phase 2:	10:00 min	95 °C	
Phase 3:	00:15 min	95 °C	
Phase 4:	01:00 min	60 °C	

Die mRNA-Expression wurde mit der  $\Delta$ Ct-Methode ausgewertet. Das Haushaltsgen 18s diente hierbei als Referenz.

## 2.2.5 Analyse der Calciumhomöostase

### 2.2.5.1 Calciummessung an Einzelzellen

Die Zellen wurden zuvor auf 8-Kammer Objektträgern ( $\mu$ -Slide 8 Well von Ibidi, 20.000 Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und am Tag des Experimentes bei Raumtemperatur mit 4  $\mu$ M GFP-zertifiziertem FluoForte in HBSS für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM) mikroskopiert. Hierfür wurde ein Plan-Apochromat 63 x/1.4 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die verwendeten Exzitationslinien und Emissionsfilter sind in Unterpunkt 2.2.7 aufgelistet.

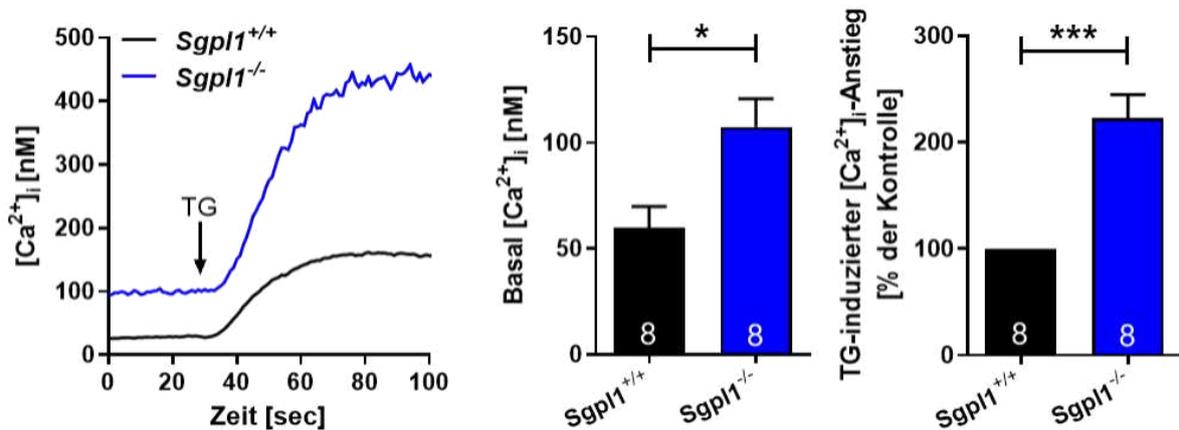
Die Zellen wurden stimuliert und eine Zeitserie mit einem Bild pro Sekunde angefertigt. Eine Stimulation mit 1  $\mu$ M Thapsigargin wurde verwendet, um die Calciumspeicherung im ER zu bestimmen. Für die Messung des lysosomalen Calciums wurden die Zellen mit 200  $\mu$ M GPN stimuliert. GPN wird in den Lysosomen hydrolysiert und führt somit auf Grund einer osmotischen Lyse der Lysosomen zu einem Ausstrom des Calciums aus den Lysosomen.

### 2.2.5.2 Calciummessung in Zellsuspension

Zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden die Zellen zunächst über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in HBSS-Puffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 1 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in HBSS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1  $\mu$ M Fura-2-AM für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (5 min, 1 000 x g) und einmal mit HBSS-Puffer gewaschen. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit HBSS gemischt und am Fluoreszenz-Spektralphotometer Hitachi F-2500 gemessen. Mit Hilfe von 1,5 %-igem Digitonin wurden die Zellen lysiert, um die Calcium-Gesamtkonzentration zu bestimmen. Im Anschluss wurde durch Zugabe von EGTA (500 mM, pH 7,4) das gesamte Calcium in einem Chelatkomplex gebunden. Die detektierte Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 + 380$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm) wurde anschließend nach Grynkiewicz ausgewertet und somit die Calciumkonzentration bestimmt (Grynkiewicz et al. 1985).

### 2.2.5.3 Verifizierung des Calciumphänotyps von *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs

Die basale Calciumkonzentration sowie die Calciumspeicherung im ER von *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs wurde, wie unter Punkt 2.2.5.2 beschrieben, überprüft (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Verifizierung des Calciumphänotyps *Sgpl1*-defizienter Mausfibroblasten.** Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde in Zellsuspension gemessen. Die Zellen wurden zuvor mit dem Farbstoff Fura-2 (1  $\mu$ M, 60 min) beladen. Gezeigt ist eine repräsentative Messung für *Sgpl1*<sup>+/+</sup> und *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs. Die Zellen wurden mit 1  $\mu$ M Thapsigargin stimuliert um die Calciumspeicherung im ER zu bestimmen. Die basale intrazelluläre Calciumkonzentration sowie der maximal induzierte Calciumanstieg wurden ausgewertet. Die unabhängigen Versuche sind als Mittelwerte + SEM gezeigt. \* < 0,05, \*\*\* < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle ermittelt im Zweistichproben-t-Test.  $[Ca^{2+}]_i$ , intrazelluläre Calciumkonzentration; TG, Thapsigargin. Diese Ergebnisse bestätigten den bereits zuvor publizierten Calciumphänotyp (Claas et al. 2010; Ihlefeld et al. 2012).

*Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs zeigen im Vergleich zu *Sgpl1*<sup>+/+</sup> MEFs eine stark erhöhte basale Calciumkonzentration sowie einen signifikant erhöhten Anstieg der Thapsigargin-induzierten intrazellulären Calciumkonzentration. Thapsigargin ist ein Inhibitor der SERCA und somit entspricht der gemessene Calciumanstieg der Calciumspeicherung im ER. Diese Ergebnisse bestätigen den bereits zuvor publizierten Calciumphänotyp der MEFs (Claas et al. 2010; Ihlefeld et al. 2012).

## 2.2.6 Färbungen

### 2.2.6.1 Kernfärbung mit Hoechst 33342

Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen und für mindestens 20 Minuten mit 10  $\mu$ M Hoechst 333542 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit HBSS gewaschen. Die Inkubation und die Lagerung bis zur Auswertung am Mikroskop geschahen bei Raumtemperatur und in Dunkelheit.

### 2.2.6.2 Kernfärbung mit DAPI

Die Kernfärbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wird bei fixierten Zellen oder Präparaten angewendet. Hierfür wurde das Präparat für 90 Sekunden mit 10  $\mu$ g/ml DAPI inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit DPBS gewaschen.

### 2.2.6.3 Cholesterinfärbung mit Filipin

Das Cholesterin wurde mit Hilfe des Farbstoffs Filipin in Zellen gefärbt. Hierzu wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 8-Kammer Objektträgern ( $\mu$ -Slide 8 Well von Ibidi) ausgesät. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend zur Fixierung mit 10 %-iger Paraformaldehydlösung auf Eis für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit DPBS gewaschen und für eine Stunde mit der Filipinlösung gefärbt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Zum Abschluss wurde erneut dreimal gewaschen. Die Färbung konnte bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Dunklen gelagert werden.

### 2.2.6.4 Färbung von Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff LD540

Für die Färbung der Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff LD540 wurden die Zellen zunächst einmal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 0,1  $\mu$ g/ml Farbstoff für zehn Minuten inkubiert. Abschließend wurde erneut mit HBSS gewaschen. Die Inkubation und die Lagerung bis zur Auswertung am Mikroskop geschahen bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Die Färbung der Lipidtröpfchen wurde zur besseren Auswertung mit einer Kernfärbung (Hoechst 33452; 2.2.6.2) kombiniert. Die beiden Färbungen können zeitgleich durchgeführt werden. Hierfür wird mit der Hoechst 33452-Färbung begonnen und zehn Minuten vor Ende der Inkubation der Farbstoff LD540 hinzugegeben.

Die quantitative Auswertung wurde mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt. Zunächst wurde die Skalierung mit Hilfe des Maßstabalkens (10  $\mu$ m) angepasst. Anschließend wurde der Bildtyp auf 8-bit gesetzt und der Schwellenwert angepasst. Die Bestimmung der Anzahl erfolgte mit jeweils nach Augenmaß eigens angepasstem Schwellenwert, die Bestimmung der Fläche der Lipidtröpfchen erfolgte mit einem automatisch angepassten Schwellenwert. Die Anzahl und Fläche wurde anschließend mittels der Funktion *analyze particles* bestimmt. Für acht Individuen pro Gruppe wurden jeweils fünf Aufnahmen mit unterschiedlicher Hepatozytenanzahl verwendet. Durchschnittlich wurden pro Maus somit circa 15 Hepatozyten ausgewertet.

Der Farbstoff LD540 zur Färbung von Lipidtröpfchen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Christoph Thiele (Life & Medical Science Institute, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.6.5 Hämatoxylin und Eosin (H & E) Färbung

Um einen morphologischen Überblick über die Gewebsstruktur der Mausleber zu erhalten, wurde eine Hämatoxylin und Eosin Färbung durchgeführt.

Vor der eigentlichen Färbung ist eine Entparaffinierung notwendig. Dies geschieht mit einer Rehydrierung durch eine in der Konzentration absteigende Ethanolreihe. Das Rehydrieren erfolgte nach folgendem Protokoll:

**Tabelle 17: Entparaffinierung der Parraffinschnitte**

Lösung	Anzahl	Zeit [min]
Xylol	3x	5 min
100 % Ethanol	2x	5 min
95 % Ethanol	2x	5 min
80 % Ethanol	1x	5 min
50 % Ethanol	1x	5 min
H <sub>2</sub> O	1x	5 min

Anschließend wurde der Leberschnitt mit Hämatoxylin und Eosin nach folgendem Schema gefärbt:

- 8 min Hämatoxylin
- 10 min Leitungswasser
- mit destilliertem Wasser spülen
- 3 min 0,2 % Eosin
- 2x in destilliertem Wasser spülen
- 1x in 70 % Ethanol spülen
- 2x in 95 % Ethanol je 5 min dehydrieren
- 2x in 100 % Ethanol je 5 min dehydrieren
- 2x in Xylol je 5 min dehydrieren

Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan® überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die gefärbten Leberschnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioskop 2 (Zeiss, Göttingen, Deutschland) analysiert.

#### **2.2.6.6 Immunfärbung**

Das Präparat wurde zunächst zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen und anschließend für vier Minuten mit eiskaltem Methanol bei -20 °C fixiert. Anschließend wurde erneut zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Der erste Antikörper wurde in 5 % Milchpulver angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überreste des Primerantikörpers wurden durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem DPBS entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488, 1:1.000) in 0,1 % BSA erfolgte abgedunkelt für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Wiederum wurde zweimal mit eiskaltem DPBS

gewaschen. Gegebenenfalls wurde eine Kernfärbung mit DAPI angeschlossen (siehe 2.2.6.2). Bis zum Mikroskopieren konnte das Präparat im Dunkeln bei 4 °C aufgehoben werden.

### 2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde ein Zeiss LSM510 Meta Mikroskop mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Folgende Exzitationswellenlängen (Ex) und Emissionsfilter (Em) wurden eingesetzt:

**Tabelle 18: Verwendete Exzitationswellenlängen und Emissionsfilter**

	Exzitationswellenlänge	Emissionsfilter	
Alexa 488, GFP	488 nm	Langpass	505 nm
Calciummessung	543 nm	Bandpass	570-615 nm
DAPI, Hoechst 33342	405 nm	Bandpass	420-480 nm
Filipin	405 nm	Langpass	420 nm
LD540	543 nm	Bandpass	560-615 nm

### 2.2.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Tandemmassenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS/MS)

Alle Messungen zur Bestimmung der Sphingoidbasen sowie Ceramide in der Leber, im Plasma und in der Galle mittels HPLC-MS/MS wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger (Universitätsklinikum der Goethe Universität in Frankfurt am Main, Deutschland) von Dr. Dominique Thomas und Sandra Trautmann durchgeführt.

Die Quantifizierung von Sphingolipiden in Lebergewebe, Plasma und Galle wurde mittels HPLC-MS/MS durchgeführt. Die Analyten wurden durch Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert und mit zwei verschiedenen HPLC-MS/MS Methoden (Sphingoidbasen und Ceramide) analysiert. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode ist in der Veröffentlichung von Spohner et al. zu finden (Spohner et al. 2021).

### 2.2.9 Bestimmung des Sphingomyelins mittels LC-MS/MS

Die LC-MS/MS-Quantifizierung zur Bestimmung des Sphingomyelingehalts wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fabian Schumacher und Herrn Prof. Dr. Burghart Kleuser (Institut für Pharmazie, Pharmakologie und Toxikologie, Freie Universität Berlin, Deutschland) übernommen. Eine detaillierte Beschreibung ist in der Veröffentlichungen von Spohner et al. zu finden (Spohner et al. 2021).

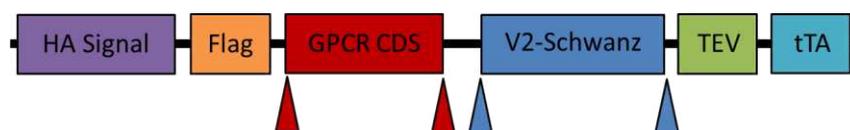
### 2.2.10 Bestimmung von Cholesterin, Nicht-Cholesterin-Sterolen und Oxysterolen mittels Gaschromatographie

In der Leber und im Plasma wurde das Cholesterin mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion unter Verwendung von 5-Cholestan als internem Standard bestimmt. Eine genaue Beschreibung ist in der Veröffentlichung von Spohner et al. zu finden (Spohner et al. 2021).

Diese Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dieter Lütjohann übernommen (Institut für Klinische Chemie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn, Deutschland).

### 2.2.11 Lumineszenz-Untersuchung mit Hilfe des Tango-Systems

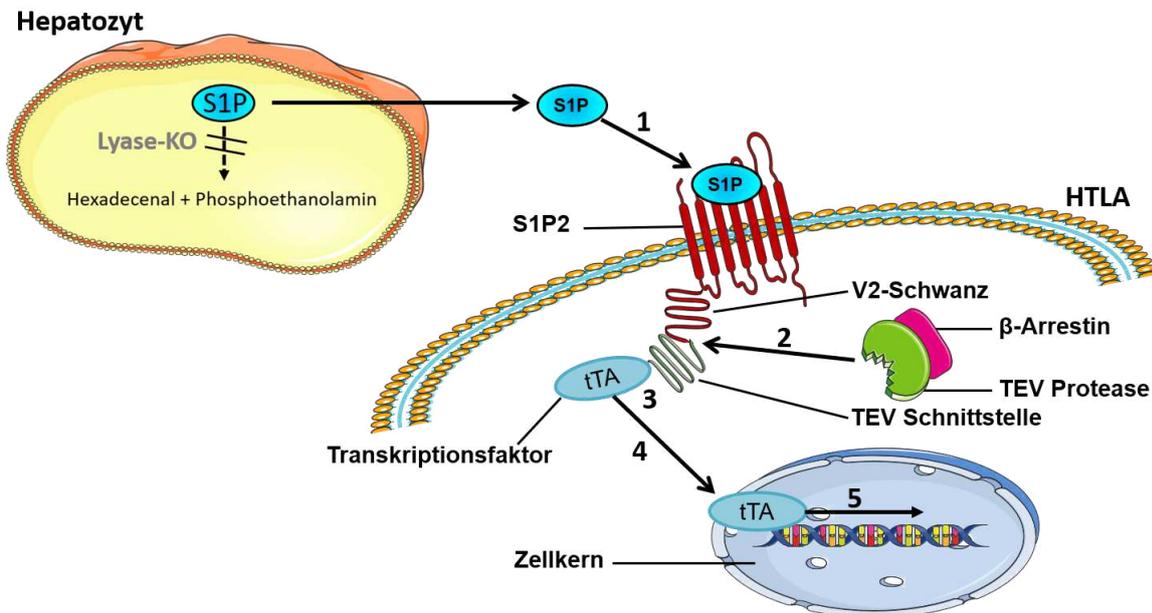
Die Lumineszenz-Untersuchung mit Hilfe des PRESTO-Tango Systems basiert auf der Verknüpfung der GPCR-Aktivierung mit einem Reporter gen. Kroeze et al. stellten im Jahr 2015 diese Methode vor. Hierbei steht PRESTO für *parallel receptorome expression and screening via transcriptional output, with transcriptional activation following arrestin recruitment*. Die Voraussetzung hierfür ist eine HEK293-Zelllinie, die einen tTA-abhängigen Luziferase-Reporter und ein  $\beta$ -Arrestin 2-TEV-Fusionsgen (HTLA-Zellen) stabil exprimiert. Ferner wird ein sogenanntes Tango-Plasmid, das die GPCR-Kodierungssequenz (CDS) enthält, benötigt. Das Tango-Plasmid ermöglicht die Expression eines GPCRs, welcher einen C-Terminus des 2-Vasopressin-Rezeptors (V2-Schwanz), eine Tobacco-Etch Virus-Spaltungsstelle (TEV) und einen Tetracyclin-Transaktivator (tTA) aufweist. Darüber hinaus kann der GPCR entweder durch einen HA- oder einen FLAG-Markierung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12) (Kroeze et al. 2015).



**Abbildung 12: Schematische Übersicht eines Tango-Plasmids.** Das Tango-Plasmid benötigt neben der GPCR-Kodierungssequenz (CDS) auch den C-Terminus des 2-Vasopressin-Rezeptors (V2-Schwanz), eine Tobacco Etch Virus-Spaltungsstelle (TEV), sowie einen Tetracyclin-Transaktivator (tTA). Eine Markierung ist mit Hilfe eines HA- oder eines FLAG-Signals möglich (Kroeze et al. 2015).

Im Prinzip erlaubt diese Untersuchung den Nachweis einer GPCR-Aktivierung durch Expression eines nicht-systemischen Reporter gens (z.B. Luziferase). Somit wird das Problem der Kreuzaktivierung zwischen verschiedenen Signalwegen überwunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HTLA-Zellen mit dem S1P2-Tango Plasmid transfiziert und über Nacht in Co-Kultur mit primären Hepatozyten kultiviert, um die S1P-Sekretion der Hepatozyten zu

untersuchen (siehe Abbildung 13). Durch die Stimulation des S1P2-Rezeptors durch S1P wird die  $\beta$ -Arrestin-gekoppelte TEV Protease aktiviert, welche die TEV-Spaltstelle neben dem V2-Schwanz spalten kann, wenn diese sich in unmittelbarer Nähe befindet. Somit kommt es zur Freisetzung des tTA-Transkriptionsfaktors, welcher in den Zellkern transloziert und dort die Expression des Reportergens Luziferase induziert.



**Abbildung 13: Signalweg im PRESTO-Tango-Versuch.** Das von primären Hepatozyten sekretierte S1P stimuliert das S1P2-Tango-Konstrukt (1). Dies führt zur Rekrutierung einer  $\beta$ -Arrestin-gekoppelten TEV-Protease (2). Befindet sich diese in unmittelbarer Nähe zum Rezeptorkonstrukt, ist die TEV-Protease in der Lage die TEV-Spaltstelle neben dem V2-Schwanz zu spalten (3). Dies führt zur Freisetzung des tTA-Transkriptionsfaktors (4), welcher in den Zellkern transloziert und induziert somit die Expression des Reportergens Luziferase (5). TEV, Tobacco Etch Virus-Spaltungsstelle; tTa, Tetracyclin-Transaktivator; V2-Schwanz, 2-Vasopressin-Rezeptors.

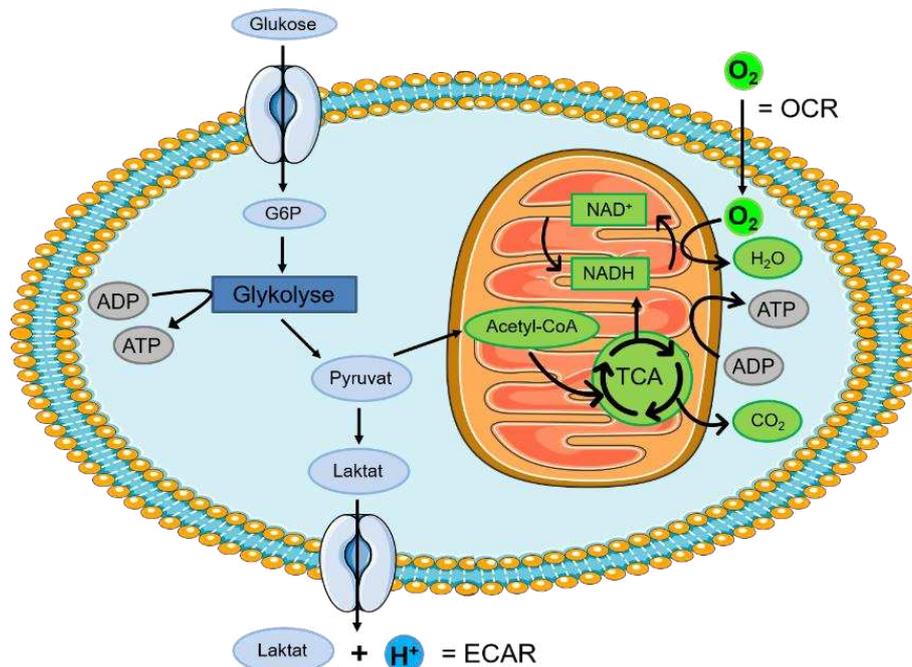
Die Zellen wurden in normalem, sowie serumfreiem Medium über Nacht kultiviert. Die passive Lyse wurde mit Hilfe des Lysepuffers aus dem Promega-Luziferase-Assay-System durchgeführt, nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellysate von der Platte abgekratzt und für zehn Minuten bei 13 500 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden zusammen mit der Luziferase-Assay-Lösung aus dem Reagenzienset auf eine Mikrotiterplatte gegeben. Die S1P-Sekretion beziehungsweise Luziferase-Aktivität wurde mit dem Photomultiplier Spectramax gemessen (Lumineszenz 500 nm).

### 2.2.12 Seahorse

Bei der sogenannten *Seahorse* Methode handelt es sich um eine nicht zellschädigende und nicht invasive Methode. Hierbei können die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, *oxygen consumption rate*) und die Azidifizierungsrate (ECAR, *extracellular acidification rate*) simultan

und repetitiv bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Methode sind Aussagen über die glykolytische Aktivität der Zellen möglich (Wu et al. 2007; Pitzko und Loesgen 2018).

Die Ausschleusung der Protonen im Symport mit Laktat (oder auch Pyruvat) und anderer Monocarbonsäuren stellt die Hauptquelle freier Protonen im Medium dar. Im Wesentlichen führt hierbei die Dissoziation des Glykolyseprodukts zu Laktat und  $H^+$  zu einem Anstieg des Protonengehalts in der Messkammer und ist somit ein Indikator für die glykolytische Aktivität der Zelle. Des Weiteren können anhand einer Abnahme des Sauerstoffgehaltes Rückschlüsse auf die Atmungskettenphosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Atmung (OCR) geschlossen werden (siehe Abbildung 14) (Schmidt et al. 2021).



**Abbildung 14: Schematischer Zellstoffwechsel.** Gezeigt ist eine Übersicht über die Glykolyse und die mitochondriale Respiration, welche die Hauptenergiegewinnungswege einer Zelle darstellen. Über aerobe Glykolyse sind Zellen in der Lage in Abwesenheit von Sauerstoff ATP zu generieren. Hierbei entsteht Laktat, welches im Symport mit Protonen ( $H^+$ , blau) aus der Zelle transportiert wird. Der Protonenexport führt zur extrazellulären Azidifizierung (ECAR). Im Medium gelöster Sauerstoff ( $O_2$ , grün) kann im Zuge der mitochondrialen Respiration zur Gewinnung von ATP verwendet werden. Sowohl ECAR, als auch die Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) können mittels der Seahorse-Methode bestimmt werden. (Schmidt et al. 2021) ADP, Adenosindiphosphat; ATP, Adenosintriophosphat; G6P, Glukose-6-Phosphat; ECAR, Azidifizierungsrate (*extracellular acidification rate*);  $NAD^+/NADH$ , Nicotinamidadeninucleotid; OCR, Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*); TCA, Tricarbonsäurezyklus.

Die Analyse dieser Parameter ( $O_2$  und  $H^+$ ) erfolgt über einen bestimmten Zeitraum im Medienüberstand adhärenter Zellen. Im Prinzip werden diese Aussagen über die Änderung des Fluoreszenzsignals Analyt-spezifischer Fluorophore, welche durch die Anwesenheit des entsprechenden Analyts beeinflusst werden, getroffen.

Der Versuchsaufbau besteht aus einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen (XF96 V3PS, Agilent Technologies), sowie einer XF Sensorenplatte (Agilent Technologies). Die Sensorenplatte ist mit Analyt-spezifischen, fluoreszierenden Biosensoren bestückt. Die Fluoreszenzsignale dieser Biosensoren werden durch ein optisches Fiberglas-Lichtwellenleitersystem an einen Photodetektor weitergeleitet und anschließend computergestützt ausgewertet. Der Abstand zwischen den Platten lässt eine weniger als 3  $\mu\text{l}$  große Messkammer entstehen. Innerhalb weniger Minuten können metabolisch bedingte Konzentrationsänderungen der Analyte ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}^+$ ) innerhalb dieser Kammer detektiert werden. Für die Seahorse-Messung wurden 20 000 Zellen pro Vertiefung in 100  $\mu\text{l}$  Medium auf eine spezielle Zellkulturplatten ausgesät und anschließend bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Die Platte wurde zuvor für 20 min mit Collagen G beschichtet, um das Anhaften der Zellen zu verbessern. Die Sensorenplatte (Seahorse Bioscience) wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit XF24 Calibrant Solution pH 7,4 (SeahorseBioscience) hydriert und bei 37 °C ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert.

Am Versuchstag wurde das Medium zunächst gegen Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer) ausgetauscht. Dieser Puffer hat eine schwache Pufferkapazität und ihm wurden Glukose (2 g/l), sowie Vitamine hinzugesetzt. Anschließend wurde die Zellkulturplatte bis zur Messung bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ -Begasung inkubiert. Dies ist wichtig, um Störungen der Messung des pH-Wertes, aufgrund der Pufferkapazität von  $\text{CO}_2$ , zu vermeiden.

In der Zwischenzeit erfolgt die Beladung der Injektionsports mit den zu injizierenden Substanzen für Port A, B, C bzw. D beladen. Anschließend wird zunächst die Sensorenplatte in den XFe-Analyzer transferiert, woraufhin dieser selbstständig eine Kalibrierung der Sensoren durchführt, um deren Funktion zu gewährleisten. Nun kann die Zellplatte in das Gerät transferiert werden. Im Anschluss findet zunächst eine zwanzigminütige Äquilibrierungsphase statt, die der Reduktion von Temperaturschwankungen innerhalb des Systems dient. Nun werden die Sensoren- und die Zellkulturplatte zusammengesetzt und die Messzyklen begonnen. Jeder Messzyklus besteht aus einem Mischvorgang von zwei Minuten und einem Messvorgang von weiteren zwei Minuten. Die Messvorgänge werden entsprechend der benutzerspezifischen Fragestellung durchgeführt. Nach typischerweise fünf basalen Messvorgängen kann mit der Injektion von Substanzen begonnen werden, die zur Charakterisierung des metabolischen Phänotyps eingesetzt werden. Diese Schritte wiederholten sich automatisch über einen Messzeitraum von circa zwei Stunden. Zwei unabhängige Fluorophore detektieren den  $\text{O}_2$ -Partialdruck bzw. den pH-Wert im Medienüberstand adhärenter Zellen. Im Anschluss an eine Messung wird die Sensorenplatte auf und ab bewegt, um das Medium der Reaktionskammer mit dem gesamten Medium zu mischen, wodurch die Ausgangssituation wiederhergestellt wird.

Zusätzlich wurden während der Messung zu definierten Zeitpunkten verschiedene Stoffwechsellinhibitoren (OCCP, Oligomycin A, Rotenon und Antimycin A, 2-Deoxyglucose) mit Hilfe der Injektionsports in den Medienüberstand injiziert. Diese Substanzen wirken spezifisch auf Bestandteile der Elektronen-Transportkette (ETC).

Standardmäßig wird zunächst die basale Respiration, also der Energiebedarf einer Zelle unter normalen Bedingungen, bestimmt. Oligomycin A inhibiert die ATP-Synthase der Atmungskette und somit wird nach der Injektion die ATP-gekoppelte Respiration bestimmt. Die maximale Respiration wird nach Injektion des Ionophors Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) gemessen. CCCP setzt das Membranpotential der Mitochondrien herab und zerstört somit die ATP-Synthase der Atmungskette, die Respiration ist somit vom Ionenaustausch entkoppelt. Nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A, die Komplex 1 und 3 der Atmungskette inhibieren, wird die nicht-mitochondriale Respiration bestimmt, da die oxidative Phosphorylierung abgeschaltet wurde. Außerdem können das Protonenleck und die respiratorische Reserve aus der basalen Respiration und der Verwendung der weiteren Parameter berechnet werden. Die Endkonzentrationen betragen 2,5  $\mu\text{M}$  für Oligomycin A, 1  $\mu\text{M}$  für CCCP, 1  $\mu\text{M}$  für Rotenon und 1  $\mu\text{g/ml}$  für Antimycin A.

Diese Messungen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Dmitry Namgaladze (Institut für Biochemie I: Pathobiochemie, Goethe Universität Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.13 Datenanalyse und Darstellung

Die gemittelten Daten zeigen den Median beziehungsweise den Mittelwert + SEM aus der angegebenen Anzahl (n). Die grafischen Präsentationen sowie die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Dabei wurden der *Student's t-Test*, der *Student's t-Test* mit Welch's Korrektur und ein nichtparametrischer Mann Whitney-Test verwendet. Der jeweilige Test ist in den Legenden der Abbildungen angegeben. Die Sternchen weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hin (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $< 0,001$ ).

Die mikroskopischen Bilder wurden mit der ZEN-Software analysiert und präsentiert. Zur quantitativen Auswertung der Western Blots wurden die Banden in Image J analysiert, auf  $\beta$ -Aktin normalisiert und anschließend auf Prozent der *Sgp1*-Kontrollmäuse gesetzt. Die CT-Werte wurden mit Softmax V.5.4.6 Molecular Devices von Applied Biosystems und QuantStudio™ Design & Analysis Software V1.4.3 für die CerS-Expression analysiert. Die Daten wurden mit der  $\Delta\text{Ct}$  Methode analysiert, auf 18s oder GAPDH als Haushaltsgen normalisiert und als Vielfaches der *Sgp1*-Kontrollmäusen dargestellt.

Für die Erstellung folgender Abbildungen (Abb. 3, 5, 6, 8-10, 13, 14 und 46) wurden Elemente von Servier Medical Art ([https://smart.servier.com/smart\\_image](https://smart.servier.com/smart_image), Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0>) verwendet, kombiniert und zur Hilfe genommen.

### 3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die erhaltenen Ergebnisse präsentiert. Gezeigt sind sowohl die basale Charakterisierung der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse, als auch umfangreiche Lipiduntersuchungen. Des Weiteren wird auf die Untersuchung der S1P-Lyase-Defizienz in MEFs und humanen Fibroblasten eingegangen.

#### 3.1 Hepatozytenspezifischer *Sgpl1*-Knockout in der Maus (*Sgpl1*<sup>HepKO</sup>)

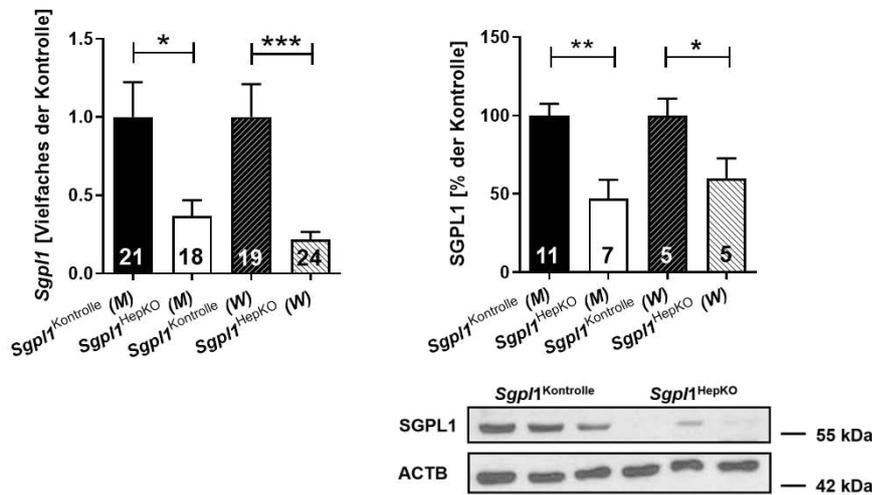
##### 3.1.1 Generierung von Mäusen mit hepatozytenspezifischem *Sgpl1*-Knockout (*Sgpl1*<sup>HepKO</sup>)

Mäuse mit globalem *Sgpl1*-Knockout zeigen einen sehr ausgeprägten Phänotyp. Bektas et al. beschrieben in diesen Mäusen signifikant verringertes Fettgewebe, sowie deutlich erhöhte Spiegel an Sphingolipiden in Serum und Leber (Bektas et al. 2010). Darüber hinaus wiesen sie erhöhte Spiegel an Gesamt-, freiem und verestertem Cholesterin im Serum der globalen *Sgpl1*-Knockoutmäuse nach. Aufgrund der Veränderungen des Cholesterins und zahlreicher Leberlipide sollte die Leber, der Hauptort des Lipidmetabolismus, weiter analysiert werden (Bektas et al. 2010). Deshalb stellte sich die Frage, welche Auswirkungen ein hepatozytenspezifischer *Sgpl1*-Knockout verursachen könnte. Diese Fragestellung sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

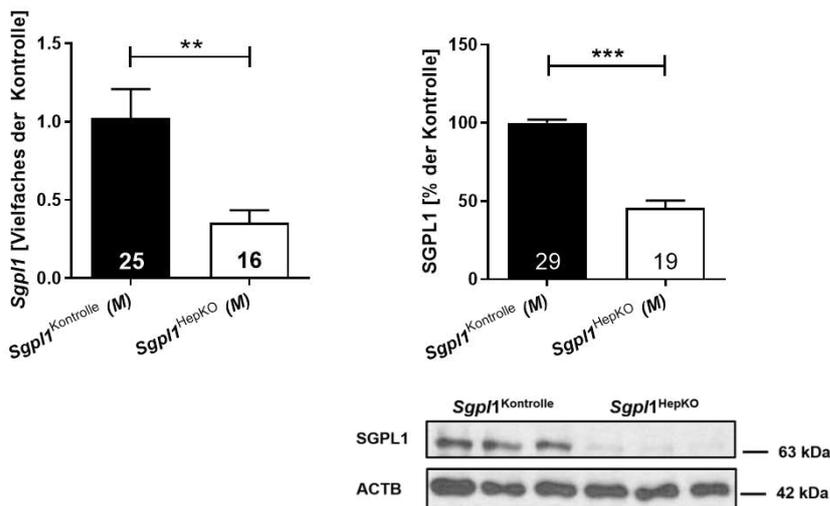
Um das verwendete hepatozytenspezifische *Sgpl1*-Knockoutsystem zu verifizieren, wurde zunächst die *Sgpl1*-Expression in der Leber von *Sgpl1*-Kontrollmäusen (*Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup>) im Vergleich zu *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen analysiert. Die Expression wurde sowohl mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf RNS-Ebene, als auch mittels Western Blotting auf Proteinebene untersucht (siehe Abbildung 15). Die Versuchstiere wurden im Alter von acht Wochen sowie im Alter von acht Monaten analysiert. Neben einer statistischen Auswertung der Genexpression in Leberhomogenaten ist jeweils ein repräsentativer Western Blot ausgewählter männlicher Mäuse gezeigt. Im Alter von acht Wochen war die Expression auf mRNS-Ebene in den Lebern der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen um  $\approx 60\%$  in männlichen und um  $\approx 75\%$  in weiblichen Mäusen reduziert. Die SGPL1-Proteinexpression war ebenfalls um  $\approx 50\%$  in den Männchen und um  $\approx 40\%$  in den Weibchen verringert. In acht Monate alten männlichen *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen war die *Sgpl1*-Expression in ähnlicher Weise reduziert:  $\approx 60\%$  auf mRNS- und  $\approx 50\%$  auf Proteinebene. Somit konnte eine signifikante Unterdrückung der S1P-Lyase in den Lebern von *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen, welche während der Alterung stabil war, gezeigt werden. Die verbleibende mRNS- und Proteinexpression könnte auf die Expression von SGPL1 durch andere Zellen als Hepatozyten zurückzuführen sein.

In globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen konnte in verschiedenen Geweben eine verminderte *Sgp1*-Expression detektiert werden (Bektas et al. 2010).

### 8-Wochen



### 8-Monate



**Abbildung 15: Expression der S1P-Lyase in Leberhomogenaten.** Die Expression der S1P-Lyase wurde auf mRNA- und Proteinebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Western Blotting in Leberhomogenaten von *Sgp1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Blots von ausgewählten männlichen Mäusen sowie die densitometrische Quantifizierung der Blots mit der jeweils angegebenen Anzahl an Mäusen. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ermittelt im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test (mRNS) oder im Zweistichproben-t-Test (Protein). ACTB,  $\beta$ -Aktin; M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

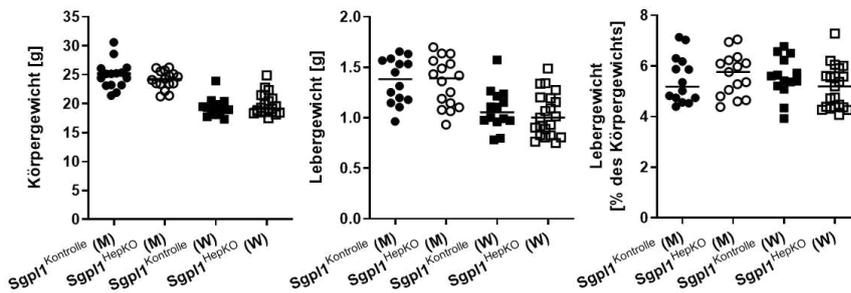
Mit Hilfe dieser ersten Experimente konnte gezeigt werden, dass das verwendete System zur Generierung eines hepatozytenspezifischen *Sgp1*-Knockouts geeignet und die S1P Lyase Expression in der Leber der *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäuse signifikant erniedrigt ist. Somit konnte mit der Charakterisierung der Mäuse begonnen werden.

### 3.1.2 Basale Charakterisierung der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse

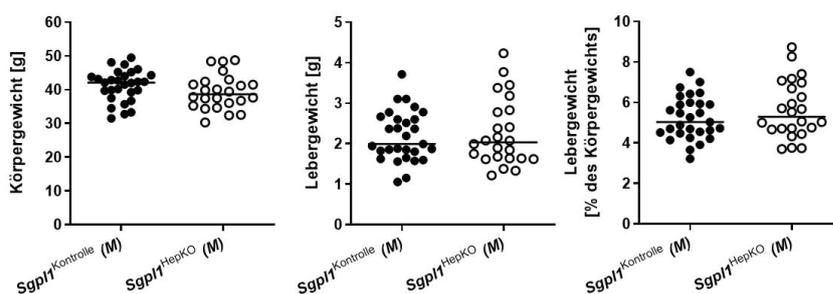
Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie stark der hepatozytenspezifische Knockout den Phänotyp dieser Mäuse beeinflusst, wurde zunächst eine grundlegende Charakterisierung durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde hierbei das äußerliche Erscheinungsbild sowie das Gewicht der Mäuse betrachtet. In Abbildung 16 sind jeweils das Körpergewicht, Lebergewicht, sowie das Lebergewicht ausgedrückt als Prozent des Körpergewichts der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen dargestellt. Im Alter von acht Wochen wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere analysiert. Die weiblichen Mäuse wiesen im Vergleich zu den männlichen Versuchstieren ein geringeres Körper- und Lebergewicht auf. Jedoch war kein Unterschied in Bezug auf das Lebergewicht in Prozent des Körpergewichts feststellbar. Um hormonbedingte Einflüsse auszuschließen und auf Grund der stabileren *Sgp11*-Deletion, wurden im Alter von acht Monaten lediglich männliche Mäuse der beiden Gruppen analysiert. In keiner der beiden Altersgruppen - acht Wochen und acht Monate - unterschieden sich die *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse von den Kontrollmäusen hinsichtlich der äußeren Parameter.

#### 8-Wochen



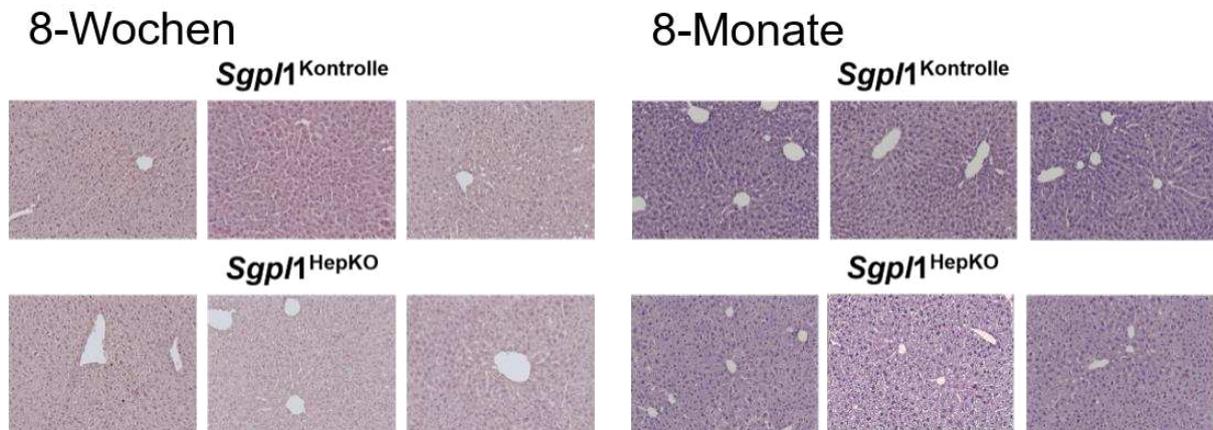
#### 8-Monate



**Abbildung 16: Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere.** Das Körper- und Lebergewicht von Kontrollmäusen im Vergleich zu Mäusen mit hepatozytspezifischem *Sgp11*-Knockout wurde im Alter von acht Wochen sowie acht Monaten bestimmt. Gezeigt ist ebenfalls das Lebergewicht als Prozent des Körpergewichts der jeweiligen Maus. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen und deren Median. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

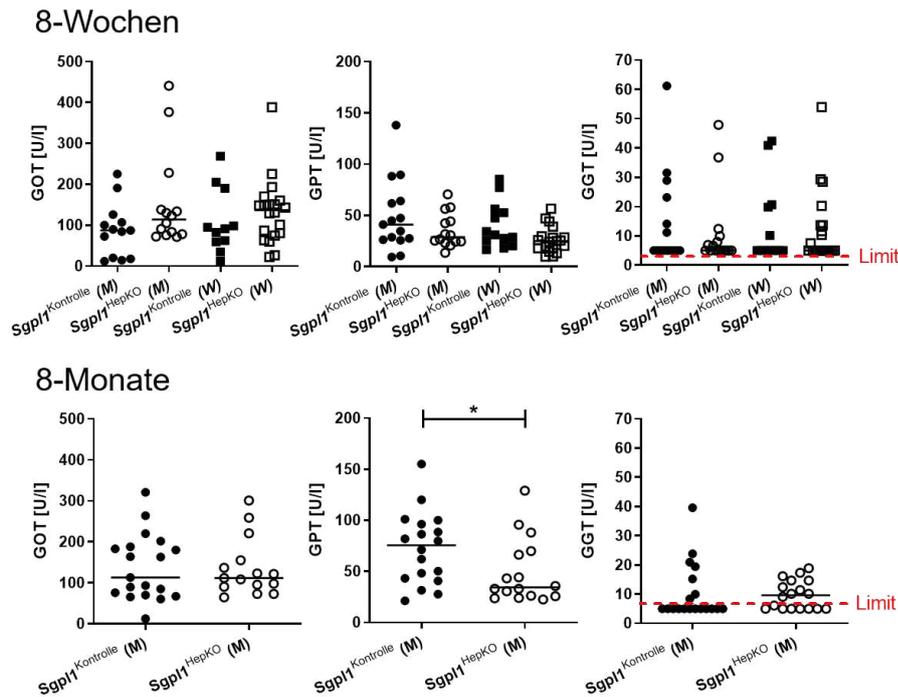
Eine Färbung von Leberschnitten mit Hämatoxylin und Eosin (H & E Färbung) diente als Indikator für Leberschädigungen (siehe Abbildung 17). Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbung war

eine morphologische Untersuchung möglich und pathologische Veränderungen konnten analysiert werden. Die H & E Färbung der Leberschnitte aus *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen zeigte, sowohl im Alter von acht Wochen als auch von acht Monaten, eine normale Leberstruktur.



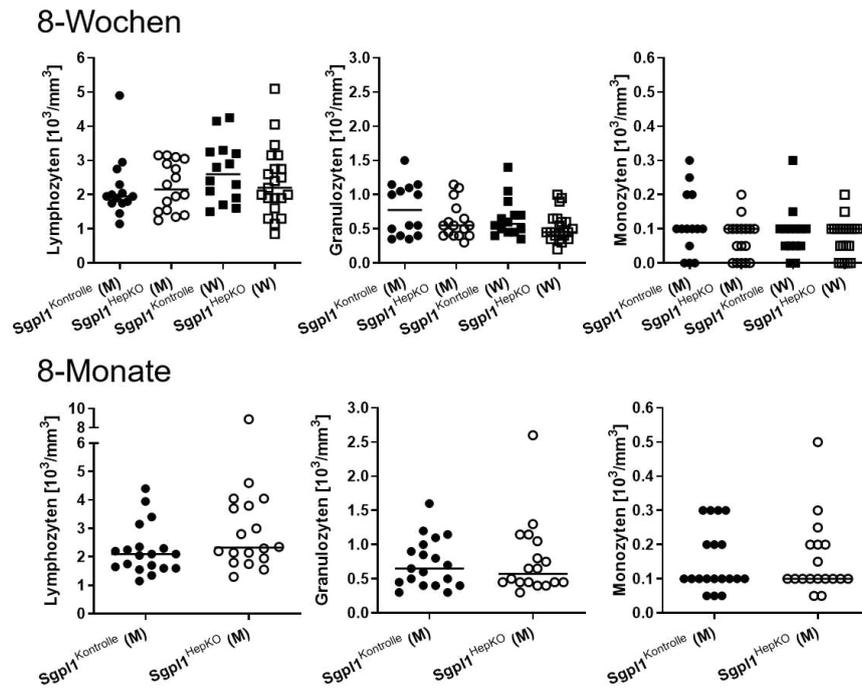
**Abbildung 17: Leberschnitte gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin.** Hämatoxylin und Eosin Färbung von Leberschnitten aus Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten. Abgebildet sind repräsentative Schnitte von männlichen Mäusen (3 aus jeder Gruppe) (Spohner et al. 2021).

Die Leberenzyme Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) sind ein weiterer Indikator zur Überprüfung der Lebergesundheit. Wie in Abbildung 18 gezeigt, war keines dieser Leberenzyme bei *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen im Vergleich zu *Sgp1<sup>Kontrolle</sup>* Mäusen signifikant erhöht, weder im Alter von acht Wochen, noch bei acht Monate alten Mäusen. Einige Werte für GGT lagen unter der Nachweisgrenze und konnten daher nicht nachgewiesen werden. Allerdings wiesen *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäuse im Alter von acht Monaten sogar eine Erniedrigung des Leberenzym GPT auf.



**Abbildung 18: Leberenzyme bestimmt im Blut von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen.** Die Leberenzyme GOT, GPT und GGT wurden im Alter von acht Wochen und acht Monaten in Blutproben von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen bestimmt. Dargestellt sind die Werte einzelner Mäuse sowie deren Median. \*  $p < 0,05$  statistische Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test ermittelt. GGT, Gamma-Glutamyltransferase; GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase; M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Mäuse mit globalem *Sgpl1*-Knockout leiden unter Lymphopenie, Neutrophilie sowie einer allgemeinen Entzündung (Allende et al. 2011). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Blutzellzahlen von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten in den Versuchstieren überprüft (siehe Abbildung 19). Im Gegensatz zu den von Allende et al. beschriebenen Mäusen zeigten die *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse keine Auffälligkeiten. Des Weiteren waren im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine veränderten Zellzahlen hinsichtlich Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten in den Blutproben der Mäuse mit hepatozytenspezifischem *Sgpl1*-Knockout feststellbar.



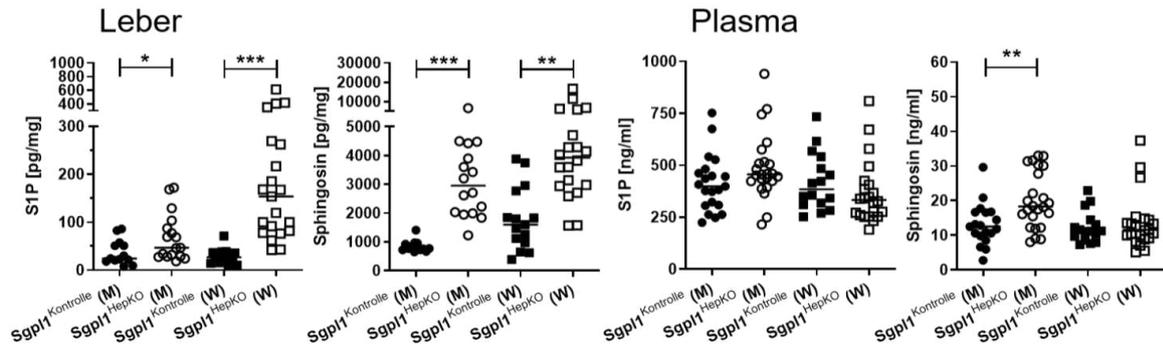
**Abbildung 19: Blutzellzahlen der *Sgp11*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse.** Die Blutzellzahlen von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten wurden in Blutproben von acht Wochen und acht Monate alten Mäusen bestimmt. Dargestellt sind die Werte einzelner Mäuse sowie ihr Median. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Die Parameter der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse waren unauffällig. Unterschiede in Bezug auf Körpergewicht, Lebergewicht, -struktur, -enzyme (GGT, GOT, GPT) und das Blutbild von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollmäusen konnten nicht diagnostiziert werden.

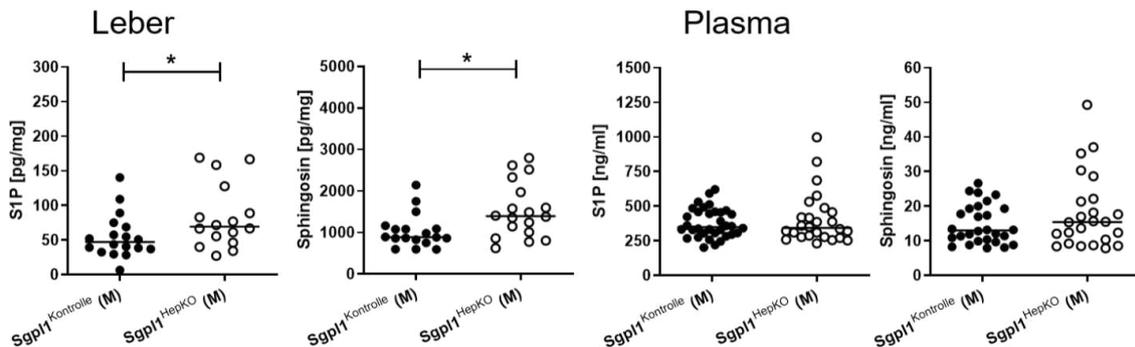
### 3.1.3 Sphingolipidspiegel in *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen

Mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen (siehe 2.2.8) konnten zahlreiche Informationen über die Sphingolipidspiegel in Leber und Plasma der Mäuse gewonnen werden. Zunächst wurde die Konzentration an S1P und Sphingosin für Mäuse im Alter von acht Wochen und acht Monaten ermittelt (siehe Abbildung 20). Hierbei wurde ersichtlich, dass in der Leber von Tieren mit hepatozytenspezifischem *Sgp11*-Knockout sowohl S1P als auch Sphingosin akkumulieren. Die Plasmaproben wiesen lediglich bei männlichen Versuchstieren im Alter von acht Wochen eine Anreicherung von Sphingosin auf, jedoch nicht bei weiblichen oder älteren Tieren.

## 8-Wochen

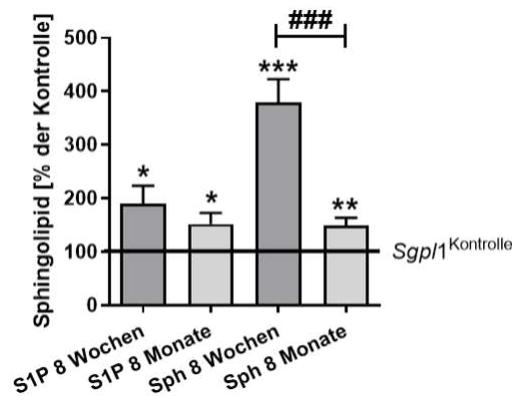


## 8-Monate



**Abbildung 20: S1P- und Sphingosinkonzentration in Leber und Plasma.** Die Konzentration an S1P und Sphingosin wurde mittels HPLC-MS/MS in Leber- und Plasmaproben aus *Sgp11*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Eine genauere Betrachtung dieser Lipidakkumulation (siehe Abbildung 21) zeigte, dass in der Leber der jüngeren Mäuse im Vergleich zu älteren Mäusen ein stärkerer Anstieg der Sphingolipidspiegel erkennbar ist. Beispielsweise ist das Sphingosin bei acht Wochen alten Mäusen um Faktor vier erhöht, nach acht Monaten jedoch lediglich zweifach erhöht.

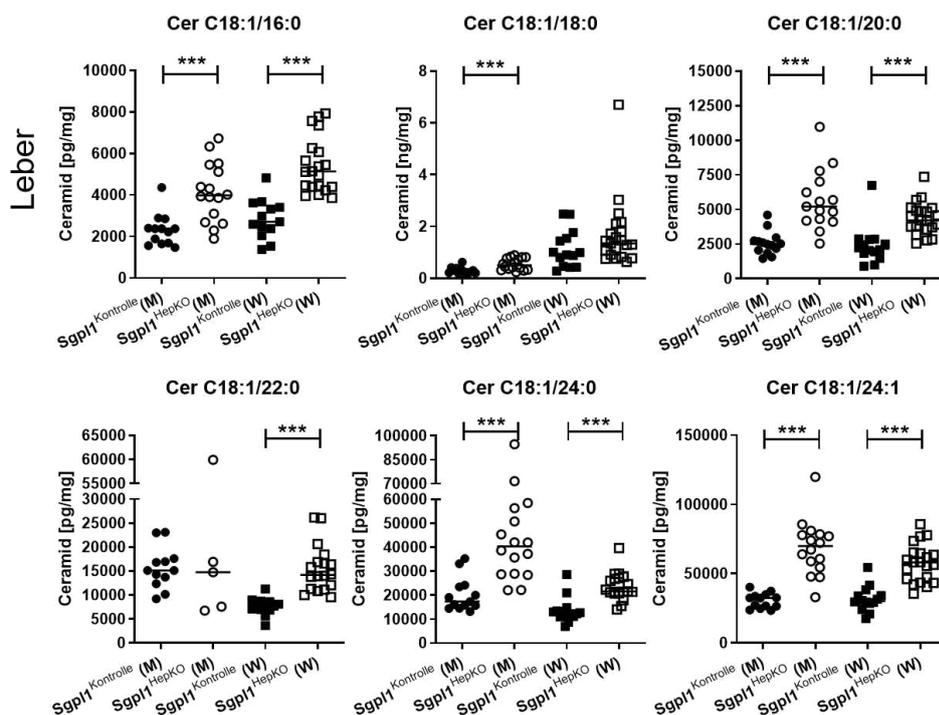


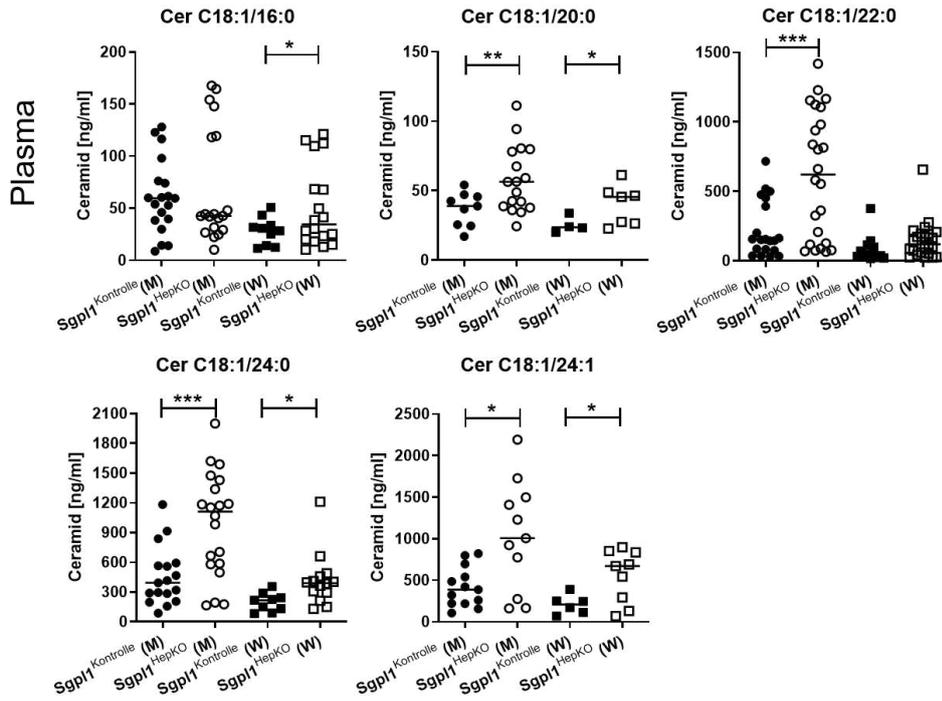
**Abbildung 21: Altersvergleich der S1P- und Sphingosinakkumulation.** Dargestellt sind die S1P- und Sphingosinlevel der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse im Alter von acht Wochen und acht Monaten als Vielfaches der *Sgp11*<sup>Kontrolle</sup> Mäuse (Messwerte aus Abbildung 20). Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle ermittelt im t-Test für eine Stichprobe für die Abweichung von 100; ###  $p < 0,001$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur.

Die Stoffgruppe der Ceramide vereint weitere Zwischenprodukte des Sphingolipidstoffwechsels. Ceramide können mit Hilfe der Ceramidase in Sphingosin umgewandelt werden (siehe 1.1.2). Im Rahmen der ausführlichen massenspektrometrischen Messungen wurden ebenfalls zahlreiche Konzentrationen an Ceramiden in der Leber und im Plasma der Versuchstiere bestimmt (siehe Abbildung 22). Die untersuchten Ceramide bestehen aus einem C18-Sphingosin-Rückgrat und unterscheiden sich lediglich in der Kettenlänge des zugesetzten Carboxyls.

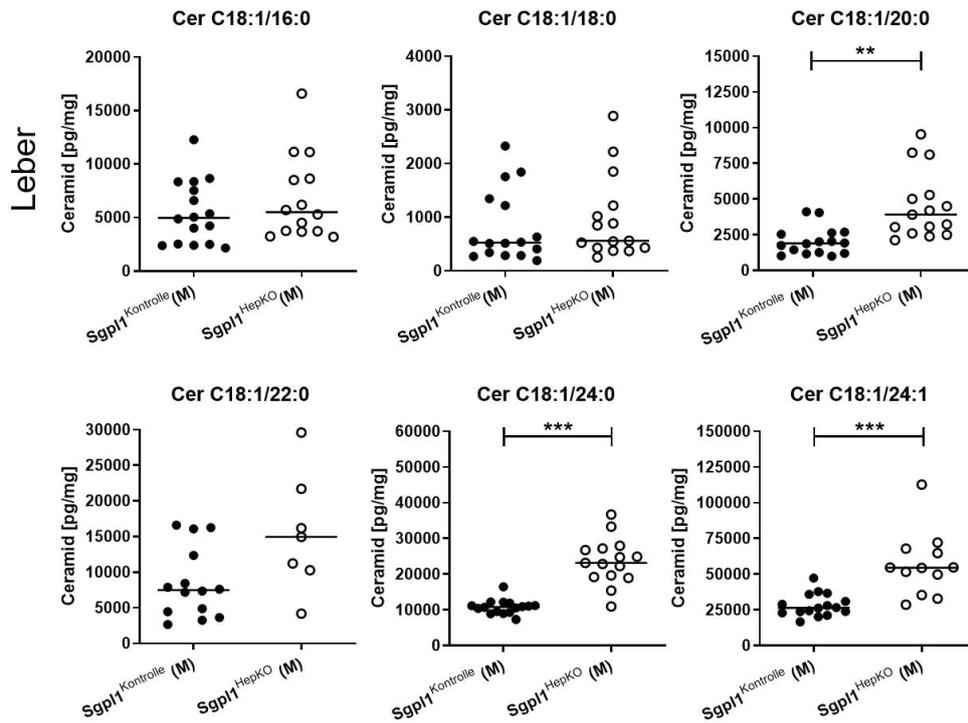
Im Alter von acht Wochen zeigten die *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse bereits stark erhöhte Spiegel fast aller langkettigen Ceramide in der Leber. Diese Ceramide akkumulierten ebenfalls im Plasma dieser Mäuse. Im Alter von acht Monaten manifestierte sich ein ähnliches Lipidprofil. Überwiegend akkumulierten hier die sehr langkettigen Ceramide (C18:1/20:0, C18:1/24:0 und C18:1/24:1) in der Leber sowie im Plasma (C18:1/22:0, C18:1/24:0 und C18:1/24:1) der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse.

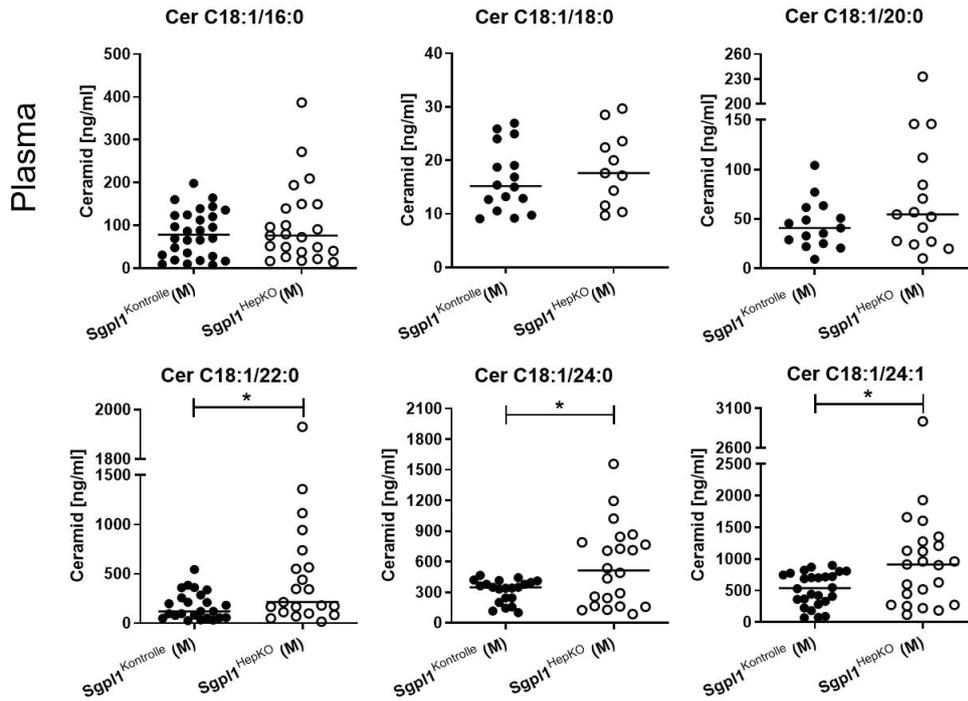
## 8-Wochen





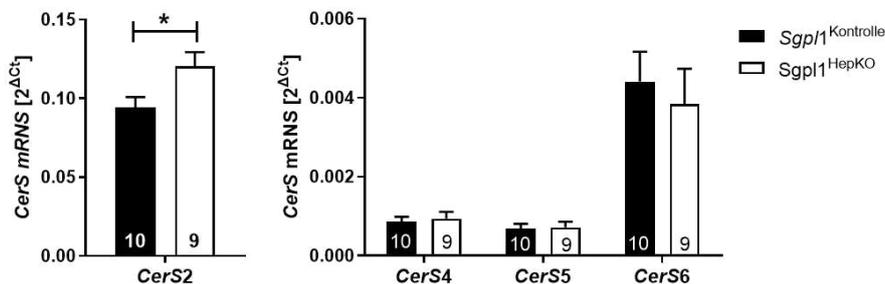
**8-Monate**





**Abbildung 22: Ceramidspiegel in Leber und Plasma.** Die Ceramidspiegel wurden mittels HPLC-MS/MS in Leber und Plasma von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Im nächsten Schritt wurde die Expression der verschiedenen Ceramidsynthasen (CERS1-6, siehe 1.1.2) überprüft (siehe Abbildung 23). In *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen war die Expression der CERS2 signifikant erhöht. In der Mausleber stellt die CERS2, welche vornehmlich sehr langkettige Ceramide mit einer Kettenlänge von 20-26 Kohlenstoffatomen synthetisiert, die dominanteste Isoform dar. Die Ceramidsynthasen CERS1 und CERS3 waren lediglich minimal exprimiert und werden deshalb nicht gezeigt.

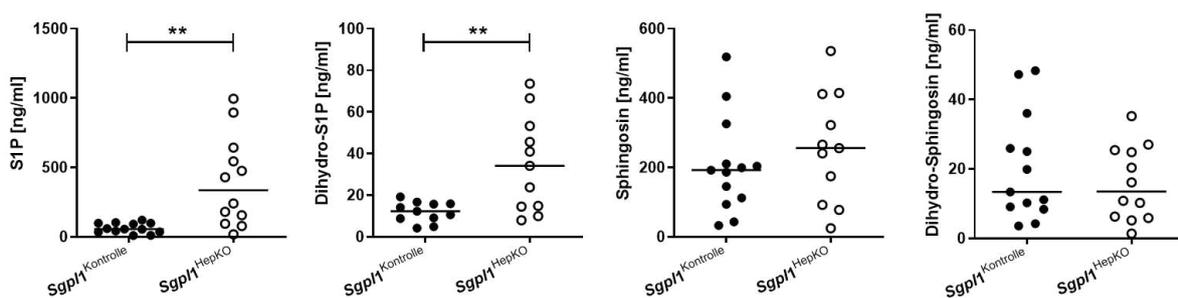


**Abbildung 23: Expression der Ceramidsynthasen in der Leber.** Die Expression der sechs verschiedenen Ceramidsynthasen (*Cers1-6*) wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Leberhomogenaten aus *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Monaten bestimmt. Die Daten zeigen jeweils die Mittelwerte + SEM,  $n = 10$ . \*  $p < 0,05$  im Zweistichproben-t-Test (Spohner et al. 2021).

Auf Grund der Vielzahl der Daten wird auf die Darstellung der Dihydro- und Glucosylsphingolipide sowie Sphingomyelinspiegel an dieser Stelle verzichtet. Der Vollständigkeit halber sind diese Daten jedoch im Anhang beigefügt (siehe Anhang 1-4).

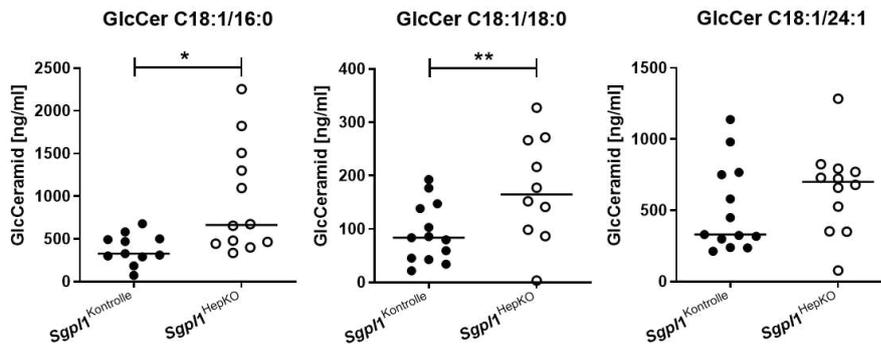
Die Daten der Dihydroformen zeigten keine gravierenden Unterschiede der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Ebenso war anhand dieser Ergebnisse kein Unterschied zwischen den acht Wochen und den acht Monate alten Mäusen feststellbar. Die Messung der Glucosylceramide sowie des Sphingomyelins waren ebenfalls unauffällig. Lediglich der Spiegel des Sphingomyelins SM 18:1/24:1 war im Plasma von acht Monate alten *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen verglichen mit den *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> Mäusen deutlich erhöht.

Da schlecht wasserlösliche Stoffe über die Galle aus der Leber abtransportiert und anschließend über den Darm ausgeschieden werden können, wurden die Sphingolipide ebenfalls in der Galle überprüft. Die Konzentration an Sphingosin sowie des Dihydro-Sphingosins waren unverändert. Jedoch wies die Galle von *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen eine signifikant erhöhte Konzentration an S1P und Dihydro-S1P auf (siehe Abbildung 24).



**Abbildung 24: Sphingolipidkonzentration in der Galle.** Die Konzentration an S1P und Sphingosin sowie ihrer Dihydroformen wurde mittels HPLC-MS/MS in der Galle von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen bestimmt. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen und deren Median. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur (Spohner et al. 2021).

Des Weiteren wurden in der Galle zahlreiche Ceramide mittels HPLC-MS/MS gemessen, wiesen jedoch keine Auffälligkeiten auf (siehe Anhang 5). Allerdings zeigte die Galle von *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Vergleich zu *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> Mäusen deutlich erhöhte Spiegel an Glucosylceramiden (siehe Abbildung 25).

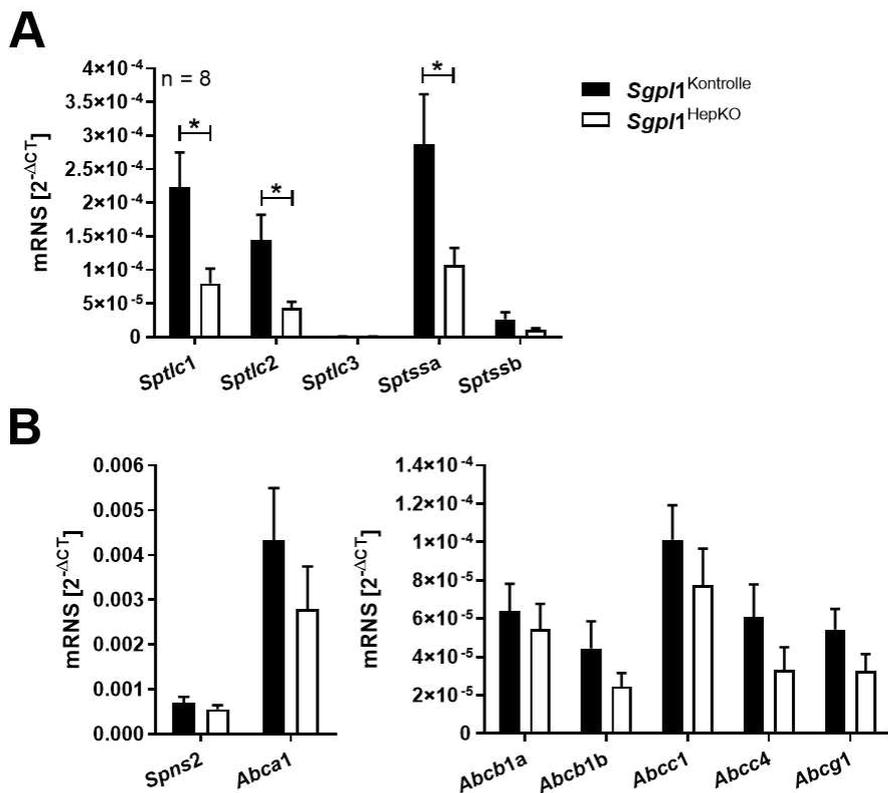


**Abbildung 25: Glucosylceramidspiegel in der Galle.** Die Konzentration verschiedener Glucosylceramide wurde mittels HPLC-MS/MS in der Galle von *Sgp11*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur. GlcCeramid, Glucosylceramid (Spohner et al. 2021).

Der initiale Schritt der *de novo* Sphingolipidsynthese wird durch die Serin-Palmitoyltransferase (SPL kodiert durch das Gen *Spltc*) katalysiert (vgl. 1.1.1). Um den Einfluss der hepatozytenspezifischen *Sgp11*-Deletion auf die *de novo* Synthese der Sphingolipide zu überprüfen, wurde die Expression der fünf SPL-Untereinheiten in der Mausleber bestimmt (Abbildung 26A). Des Weiteren wurde in Leberhomogenaten ebenfalls die Expression zahlreicher Lipidtransporter überprüft (Abbildung 26B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Leber von *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen die Expression der Untereinheiten *Spltc1*, *Spltc2* und *Sptssa* signifikant erniedrigt ist. Die Untereinheiten *Spltc3* und *Sptssb* werden hingegen in diesen Mäusen weniger stark exprimiert.

Die Überprüfung der Transporterexpression zeigte eine leicht verringerte Expression der ABC-Transporter in den Leberhomogenaten der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse, jedoch war diese nicht signifikant. Ein Unterschied in der Expression des S1P-spezifischen Transporters *Spns2* konnte nicht festgestellt werden.



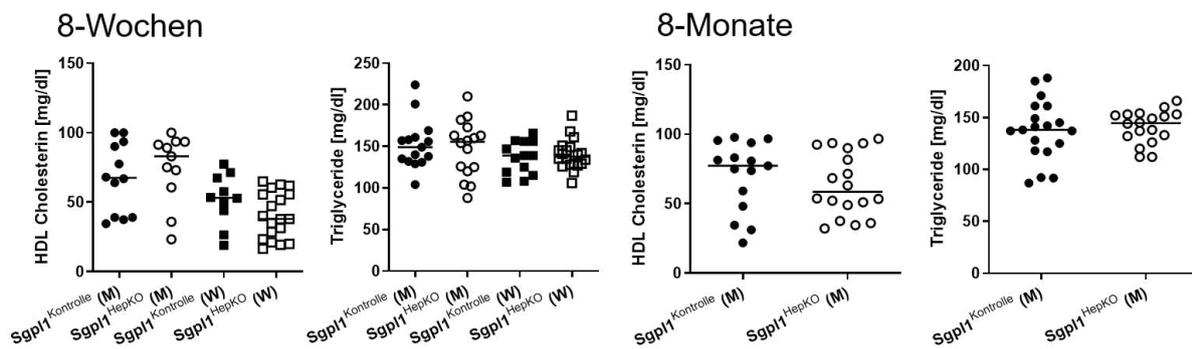
**Abbildung 26: Expression der *Sptlc* und zahlreicher Transporter in der Leber.** Die Expression der SPL-Untereinheiten (A) sowie zahlreicher Transporter (B) wurde auf mRNS-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Leberhomogenaten aus *Sgp1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Monaten bestimmt. Die Daten zeigen jeweils die Mittelwerte + SEM, n = 8. \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle ermittelt im t Test für eine Stichprobe für die Abweichung von 1 (Spohner et al. 2021).

Die Ergebnisse der HPLC-MS/MS Messungen verdeutlichen, dass eine Deletion der S1P-Lyase zu einer Vielzahl akkumulierender Sphingolipide führt. Neben S1P, dem direkten Edukt der S1P-Lyase, sind ebenfalls zahlreiche Vorläufer, wie Ceramide, in der Leber und teilweise auch in anderen Kompartimenten, wie dem Plasma und der Galle, erhöht.

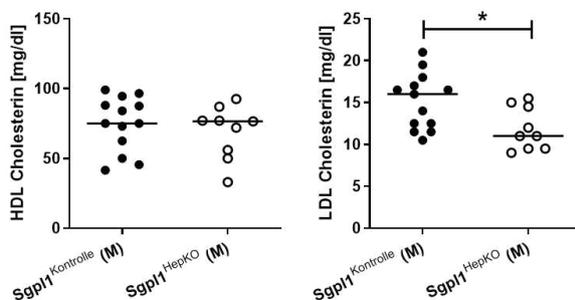
### 3.1.4 Cholesterinhomöostase in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen

In globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen reicherten sich nicht nur Sphingolipide, sondern auch Cholesterin in Leber und Serum an (Bektas et al. 2010). Des Weiteren zeigten Vorarbeiten mit embryonalen Mausfibroblasten aus *Sgp1*-Knockoutmäusen, dass diese Zellen Merkmale eines NPC-Phänotyps aufweisen: Akkumulation von Cholesterin in Endo-/Lysosomen (Vienken et al. 2017). In Anbetracht dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die Leber der Hauptort des Cholesterinmetabolismus' ist, wurde der Einfluss des hepatozytenspezifischen *Sgp1*-Knockouts auf die Cholesterinhomöostase untersucht.

Zunächst wurde die Menge an HDL-Cholesterin im Plasma beziehungsweise der Triglyceride im Blut bestimmt (siehe Abbildung 27). Beides war sowohl im Alter von acht Wochen als auch acht Monaten unverändert. Das HDL-Cholesterin wurde mit einer zweiten Methode erneut gemessen (siehe Abbildung 28). Diese Ergebnisse ergaben ähnliche Werte, denn auch hier war kein Unterschied zwischen den *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> und den Kontrollmäusen erkennbar. Jedoch zeigte diese Messung, dass das LDL-Cholesterin, welches bei Mäusen weniger häufig vorkommt als das HDL-Cholesterin, in acht Monate alten *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen signifikant verringert ist (Lee-Rueckert et al. 2016).



**Abbildung 27: Konzentration an HDL-Cholesterin und Triglyceriden.** Der HDL-Cholesteringehalt wurde im Plasma, die Konzentration an Triglyceriden im Vollblut mit Hilfe einer Reflotron®-Messung bestimmt. Die Daten zeigen die Werte einzelner Mäusen sowie deren Median. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse.

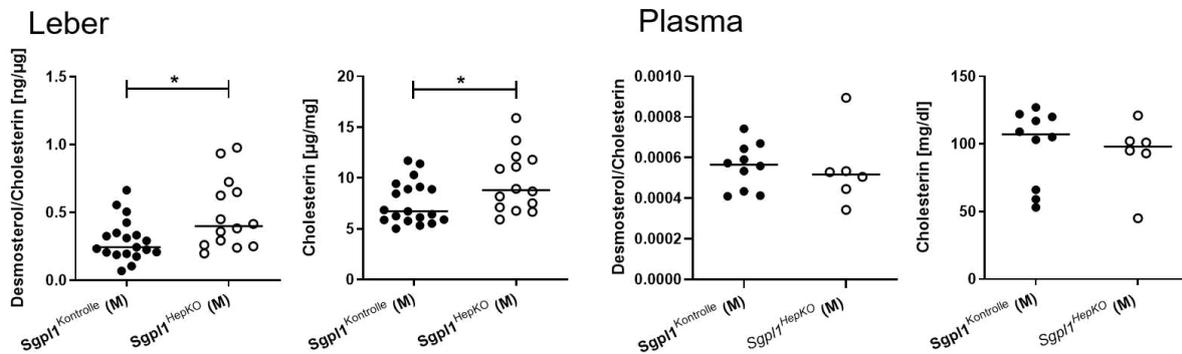


**Abbildung 28: Plasmakonzentration an HDL- und LDL-Cholesterin.** Der HDL- und LDL-Cholesteringehalt wurde photometrisch im Plasma von acht Monate alten Mäusen bestimmt. Die Daten zeigen den Median. \*  $p < 0,05$  im Zweistichproben-t-Test. M, männliche Mäuse. Diese Auftragsmessungen wurden bei LABOKLIN GmbH & Co. KG (Bad Kissingen, Deutschland) durchgeführt (Spohner et al. 2021).

Des Weiteren wurde mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion eine umfassende Analyse zahlreicher Sterole durchgeführt. Hierbei wurden das Gesamtcholesterin sowie mehrere Cholesterinvorläufer in Leber- und Plasmaproben acht Monate alter Mäuse analysiert (siehe Abbildung 29, Anhang 6 und 7).

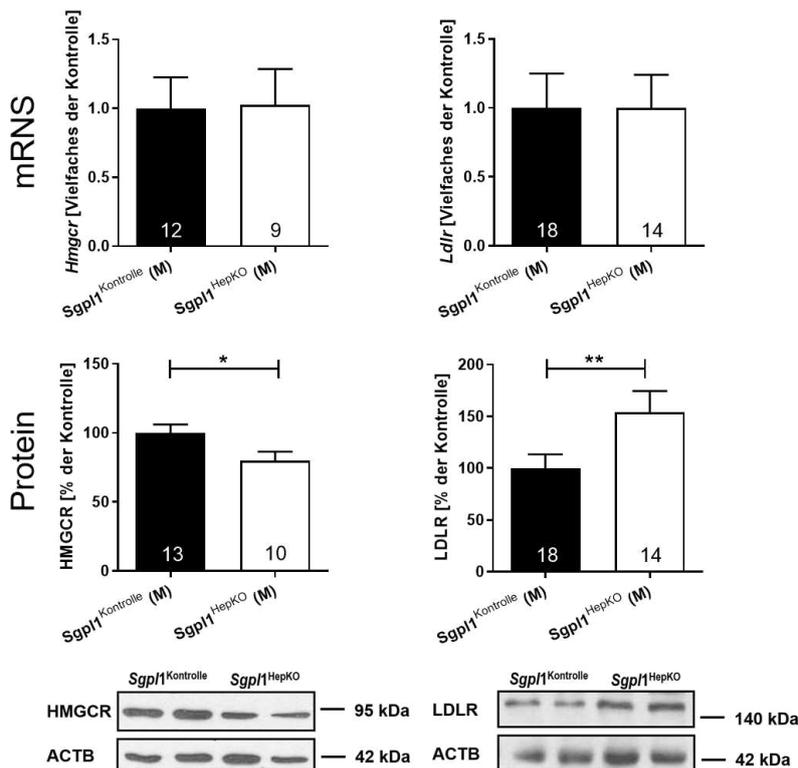
Sowohl das Cholesterin als auch sein unmittelbarer Vorläufer, Desmosterol, waren in der Leber von *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu waren die

Konzentrationen an Cholesterin und anderer Sterole im Plasma gleich. Diese Beobachtung stimmt mit den unveränderten Werten des HDL-Cholesterins, welches das LDL-Cholesterin um ca. das Vier- bis Fünffache übertraf, überein.



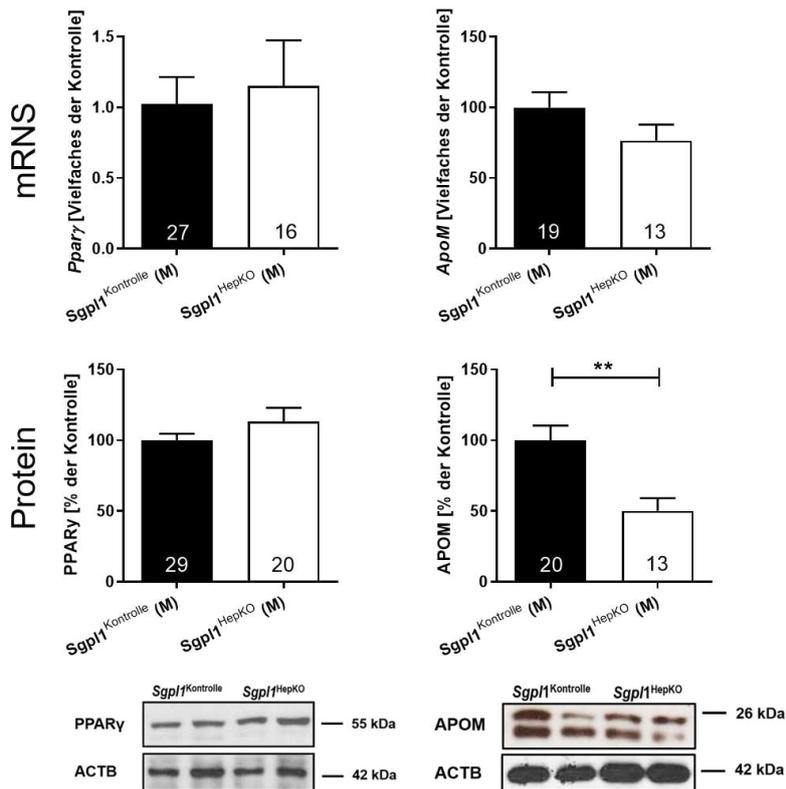
**Abbildung 29: Gesamtcholesterin und Desmosterol in Leber und Plasma.** Die Menge an Cholesterin und seiner Vorläufer wurde in der Leber und im Plasma acht Monate alter Mäuse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion gemessen. Gezeigt sind die Werte für das Gesamtcholesterin und die Vorstufe Desmosterol bezogen auf das Gesamtcholesterin der jeweiligen Maus. Dargestellt sind Werte von einzelnen Mäusen und deren Median. \*  $p < 0,05$  im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. M, männliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Weiterführend wurde die Expression von Schlüsselenzymen der Cholesterin- und Lipidhomöostase in Leberhomogenaten analysiert. Neben der HMGCR, welche die Schrittmacherreaktion der Cholesterinsynthese katalysiert (vgl. 1.5.2), wurde auch die Expression des LDL-Rezeptors überprüft (siehe Abbildung 30). Die Analyse der Western Blots zeigte auf Proteinebene eine leichte Abnahme der HMGCR und eine Hochregulierung des LDLRs in Leberhomogenaten aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen. Die Expression auf mRNS-Ebene unterschied sich nicht zwischen *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> und *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> Mäusen.



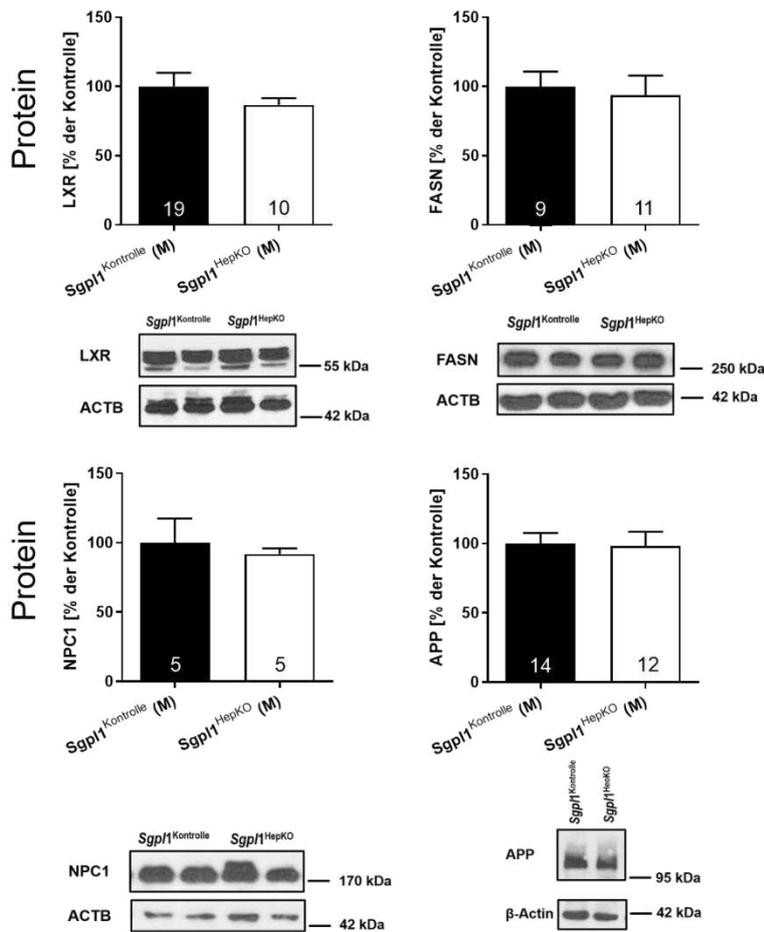
**Abbildung 30: Expression der HMGCR und des LDLRs in Leberhomogenaten.** Die Expressionen der HMGCR und des LDLRs wurden auf mRNA- und Proteingehalte mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Western Blotting bestimmt. Hierbei wurden Leberhomogenate von *Sgp1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen verwendet. Dargestellt sind repräsentative Blots von ausgewählten männlichen Mäusen und die densitometrische Quantifizierung der Blots mit der jeweils angegebenen Anzahl an Mäusen. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  ermittelt im Zweistichproben-t-Test. ACTB,  $\beta$ -Aktin; M, männliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

In der Leber globaler *Sgp1*-Knockoutmäuse wurde eine ~ 3,5-fache Hochregulierung von *Ppar $\gamma$*  nachgewiesen (Bektas et al. 2010). Deshalb wurde die Expression von PPAR $\gamma$  sowie des APOM, ein S1P-bindendes Chaperon, analysiert (siehe Abbildung 31) (Christoffersen et al. 2011). Die Leberproben zeigten keine Veränderung der PPAR $\gamma$  Expression, weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene. Hingegen konnte eine Verminderung der glykosylierten Form des APOMs (obere Bande) auf Proteinebene in der Leber von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen festgestellt werden. Jedoch waren die mRNA-Spiegel beider Gruppen ähnlich. Der Zusammenhang zwischen den erhöhten S1P-Spiegeln und der erniedrigten APOM-Expression ist zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.



**Abbildung 31: Expression von PPAR $\gamma$  und APOM in Leberhomogenaten.** Die Expressionen von PPAR $\gamma$  und der glykosylierten Form des APOMs (obere Bande) wurden auf mRNA- und Proteinebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Western Blotting bestimmt. Hierbei wurden Leberhomogenate von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen verwendet. Dargestellt sind repräsentative Blots von ausgewählten männlichen Mäusen sowie die densitometrische Quantifizierung des Proteingehalts mit der jeweils angegebenen Anzahl an Mäusen. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. \*\*  $p < 0,01$  ermittelt im Zweistichproben-t-Test. ACTB,  $\beta$ -Aktin; M, männliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

Weitere Untersuchungen (siehe Abbildung 32) zeigten, dass die Proteinexpression des Leber X Rezeptors (LXR) sowie der Fettsäuresynthase (FASN), ein Zielgen des LXRs, unauffällig waren. Auf Grund der Dysregulation von NPC in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs (vgl. 1.2.3) wurde im nächsten Schritt die Expression von NPC1 sowie des Amyloid-Vorläuferproteins (APP), welches in NPC-Patienten vermehrt exprimiert ist, analysiert. Beide Gene waren auf Proteinebene ebenfalls unverändert (siehe Abbildung 32).

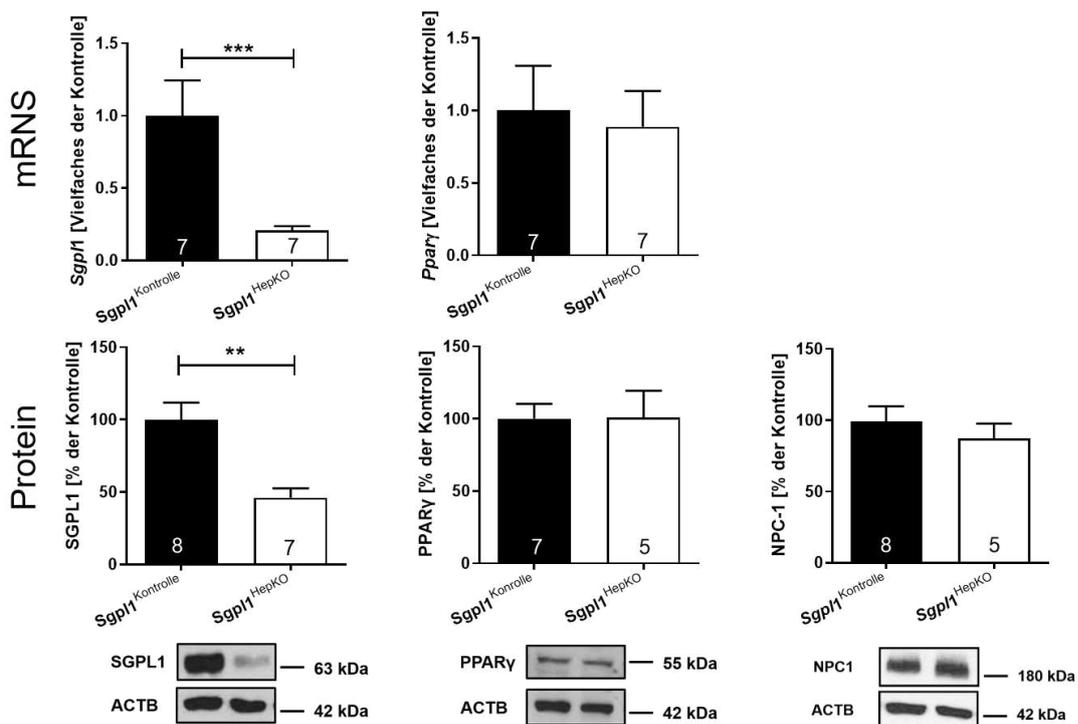


**Abbildung 32: Expression zentraler Gene des Lipidstoffwechsels in Leberhomogenaten.** Die Expressionen des LXR, der FASN sowie von NPC1 und APP wurden auf Proteinebene mittels Western Blotting bestimmt. Hierbei wurden Leberhomogenate von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen verwendet. Dargestellt sind repräsentative Blots von ausgewählten männlichen Mäusen sowie die densitometrische Quantifizierung des Proteingehalts mit der jeweils angegebenen Anzahl an Mäusen. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. ACTB,  $\beta$ -Aktin; M, männliche Mäuse (Spohner et al. 2021).

### 3.1.5 Charakterisierung primärer Hepatozyten isoliert aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen

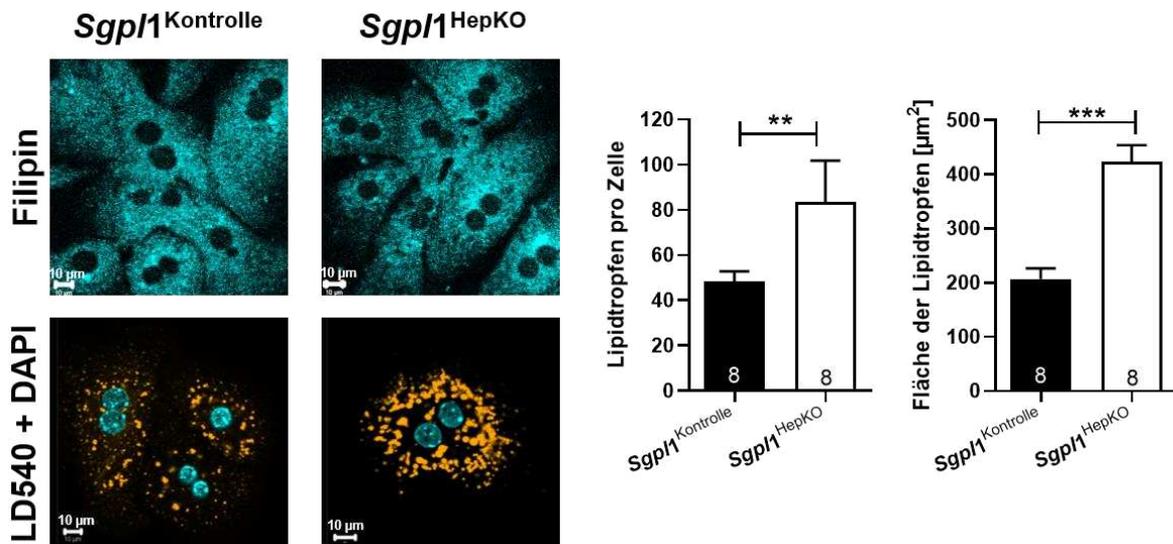
Für weitere funktionelle Analysen wurden primäre Hepatozyten aus *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert und charakterisiert. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Western Blotting wurden die SGPL1-Expression auf mRNA- und Proteinebene analysiert (siehe Abbildung 33). Hepatozyten aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen wiesen eine stark reduzierte Expression der S1P-Lyase sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene auf.

Des Weiteren wurde die Expression von PPAR $\gamma$  analysiert. Diese zeigte, wie zuvor für die Leberhomogenate (3.1.4) beschrieben, keine durch die hepatozytenspezifische Deletion der S1P-Lyase verursachte Regulation.



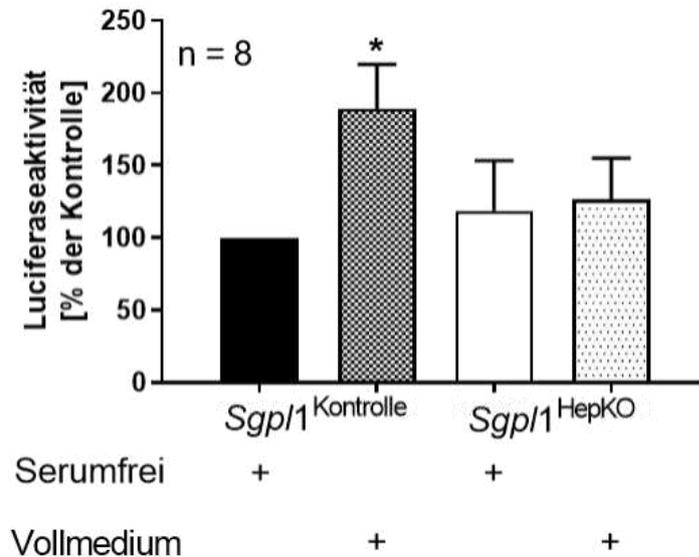
**Abbildung 33: SGPL1- und PPAR $\gamma$ -Expression primärer Hepatozyten.** Die Expression von SGPL1, PPAR $\gamma$  und NPC1 wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR sowie Western Blotting in primären Hepatozyten, welche aus *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert wurden, untersucht. Dargestellt sind repräsentative Blots und die densitometrische Quantifizierung der Blots mit der jeweils angegebenen Anzahl an Mäusen. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ermittelt im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. ACTB,  $\beta$ -Aktin (Spohner et al. 2021).

*Sgpl1*-defiziente embryonale Mausfibroblasten (*Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs) weisen eine Cholesterinakkumulation in Endo-/Lysosomen auf und manifestieren einen NPC-ähnlichen Phänotyp (Vienken et al. 2017). Daher wurden zur Überprüfung des Cholesterinphänotyps der primären Hepatozyten Cholesterin, sowie neutrale Lipide gefärbt (siehe Abbildung 34). Die Cholesterinfärbung mit Hilfe des Farbstoffs Filipin III war unauffällig, denn keine Cholesterinsequestrierung konnte festgestellt werden. Hingegen zeigte die Färbung der neutralen Lipide und Lipidtröpfchen mit dem Farbstoff LD540 eine starke Anreicherung in primären Hepatozyten, wenn diese aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert worden waren. Diese Tropfen waren zum Teil konfluent. Eine quantitative Auswertung der Lipidtröpfchen zeigte eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Lipidtröpfchen pro Zelle in Hepatozyten isoliert aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Vergleich zu den Hepatozyten der Kontrollmäuse.



**Abbildung 34: Färbung des Cholesterins und neutraler Lipide in primären Hepatozyten.** Das Cholesterin wurde in primären Hepatozyten mit Hilfe des Farbstoffs Filipin III (45  $\mu\text{M}$ ) gefärbt. Der Farbstoff LD540 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , orange) wurde zur Färbung der neutralen Lipide sowie Lipidtröpfchen in Kombination mit einer Kernfärbung (DAPI, 1  $\mu\text{g/ml}$ , türkis) verwendet. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild der Färbung. Ebenfalls gezeigt ist eine quantitative Auswertung der Lipidtröpfchen in den Hepatozyten. Hierbei wurden mit Hilfe von ImageJ durchschnittlich 15 Hepatozyten für jeweils 8 Individuen pro Gruppe ausgewertet. Hierbei wurde sowohl die Anzahl als auch die Fläche der Lipidtröpfchen bestimmt. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  ermittelt im Zweistichproben-t-Test (Spohner et al. 2021).

Zur Analyse der S1P-Sekretion wurden der PRESTO Tango Versuch und die somit gemessene Luciferaseaktivität verwendet (siehe Abbildung 35). Die S1P-Sekretion der Hepatozyten, die aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen und Kontrollmäusen isoliert wurden, war in serumfreiem Medium identisch. Die Inkubation der Kontrollhepatozyten in Vollmedium führte jedoch zu einer signifikant erhöhten Luciferaseaktivität. Im Gegensatz dazu bewirkte die Inkubation der Hepatozyten, welche aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert wurden, mit Vollmedium nicht zu einer erhöhten Luciferaseaktivität. Da die Luciferaseaktivität im PRESTO Tango Versuch durch S1P induziert wird, kann dieses Ergebnis zweierlei bedeuten: 1. Einfluss des Serums oder 2. Unterschied bei der Sekretion.



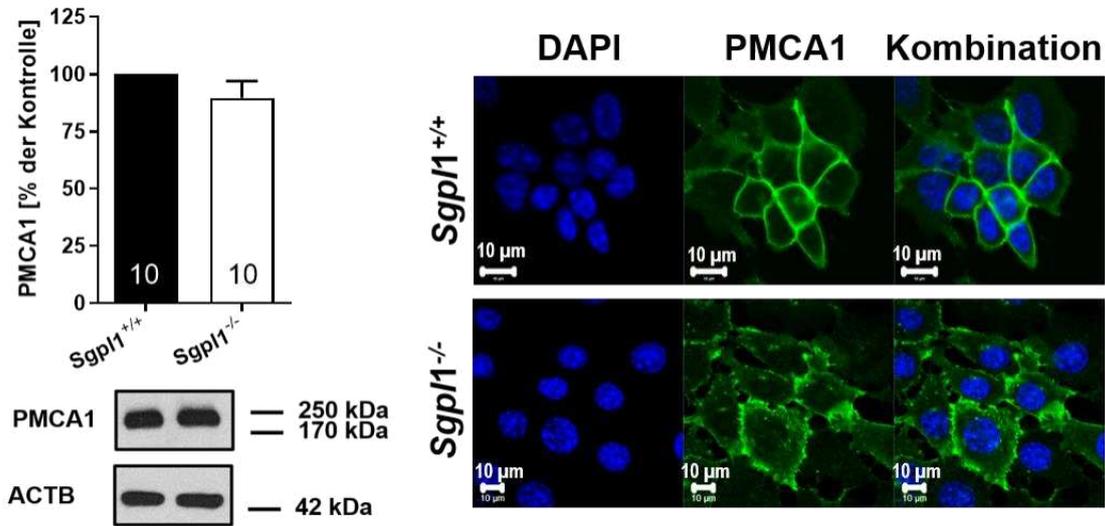
**Abbildung 35: S1P-Sekretion primärer Hepatozyten.** Die S1P-Sekretion wurde mit Hilfe des PRESTO TANGO Versuchs analysiert. Hierbei wurde die Luciferaseaktivität der Hepatozyten in serumfreien Medium, sowie Vollmedium bestimmt. Gezeigt ist der Mittelwert + SEM, n = 8. \* p < 0,05 im Vergleich zur serumfreien Kontrolle ermittelt im t-Test für eine Stichprobe für die Abweichung von 100.

### 3.2 Ergebnisse an *Sgpl1*-defizienten murinen Fibroblasten (*Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs)

#### 3.2.1 Untersuchungen zur PMCA in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs

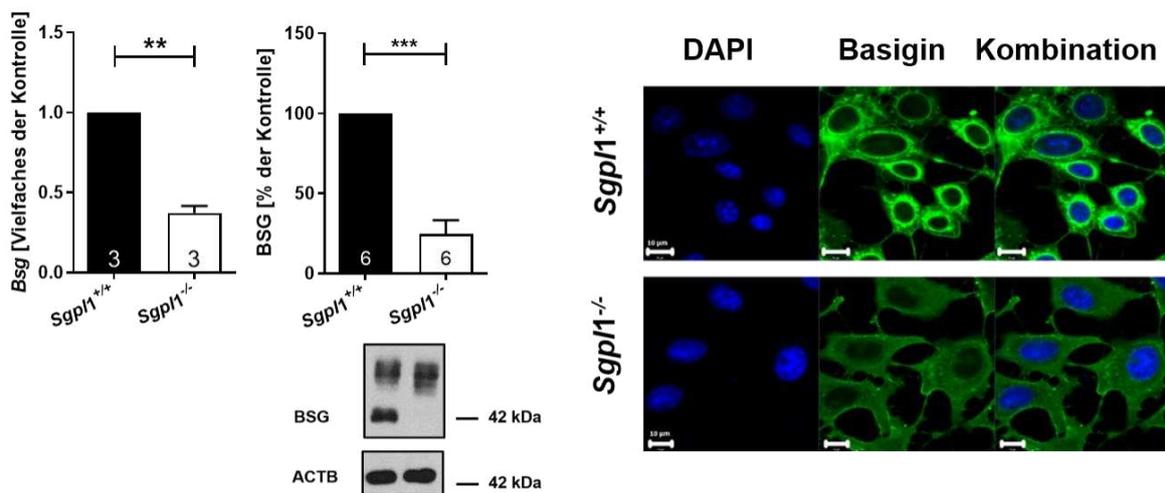
Claas et al. sowie Ihlefeld et al. beschrieben für *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs eine gestörte Calciumhomöostase (Claas et al. 2010; Ihlefeld et al. 2012). Da die PMCA für den Export von Calciumionen aus dem Zytoplasma zuständig ist, sollte im Folgenden ihre Rolle in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs weiter analysiert werden. Die Vorarbeit von Katja Ihlefeld zeigte, dass *Sgpl1*<sup>+/+</sup> und *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs vier verschiedene Isoformen der PMCA exprimieren. Hierbei war die Isoform PMCA1 auf mRNA-Ebene am stärksten exprimiert (Ihlefeld 2013). Jedoch konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene kein Unterschied der PMCA1-Expression zwischen *Sgpl1*<sup>+/+</sup> und *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs festgestellt werden (Ihlefeld 2013). Die Aktivität der PMCA ist allerdings nicht allein von ihrer Expression abhängig, sondern auch von posttranslationalen Modifikationen sowie ihrer Lokalisation an der Plasmamembran (Brini und Carafoli 2011).

Deshalb wurde zunächst bestätigt, dass die PMCA1-Expression in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs auf Proteinebene unverändert ist. Allerdings zeigte eine Immunfärbung der PMCA1 eine veränderte Lokalisation. Im Gegensatz zur Kontrolle ist die PMCA1 in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs nur zum Teil an der Plasmamembran lokalisiert.



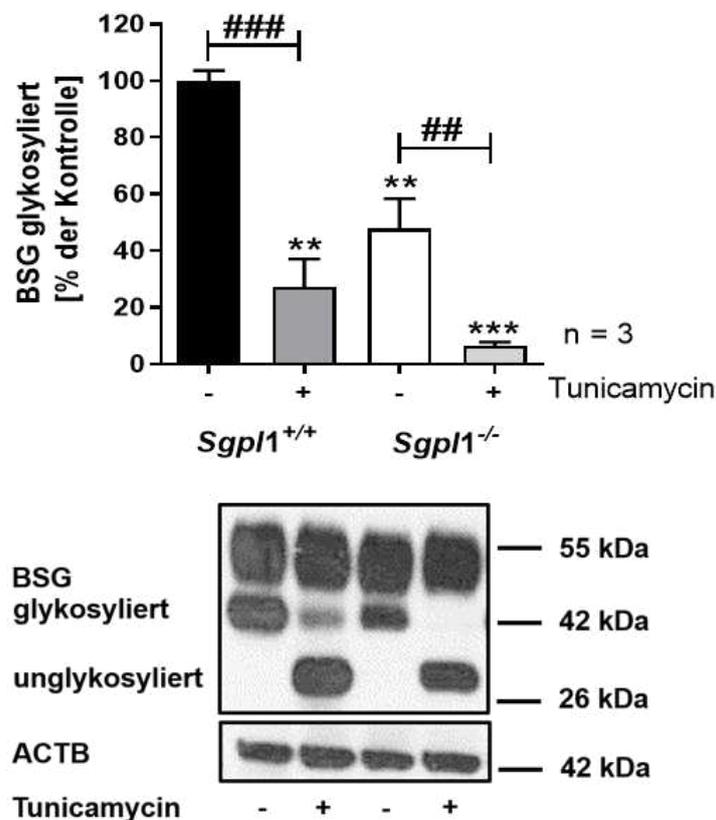
**Abbildung 36: Expression und Lokalisation der PMCA1 in MEFs.** Die Expression der PMCA1 wurde auf Proteinebene mittels Western Blotting bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot und die densitometrische Quantifizierung der Blots mit der jeweils angegebenen Anzahl an Replikaten. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM, n = 10. Diese Ergebnisse bestätigten die bereits zuvor beschriebene unveränderte PMCA1 Expression in MEFs (Ihlefeld 2013). Die Lokalisation der PMCA1 wurde mittels Immunfärbung analysiert. Die PMCA1 (Alexa Fluor® 488, grün) wurde mit einer Kernfärbung (DAPI, blau) kombiniert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild der Färbung. ACTB,  $\beta$ -Aktin.

Das Protein Basigin, auch unter dem Namen CD147 bekannt, ist ein membranständiges Glykoprotein, das als Untereinheit der PMCA zu ihrer Stabilität und Lokalisation an der Plasmamembran beiträgt (Schmidt et al. 2017). Die Expression von Basigin ist in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs signifikant verringert. Dies konnte auf mRNA- und Proteinebene, sowie durch eine Immunfärbung gezeigt werden (siehe Abbildung 37).



**Abbildung 37: Basigin Expression und Lokalisation in MEFs.** Die Expression des Basigins wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR sowie Western Blotting bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot und die densitometrische Quantifizierung mit der jeweils angegebenen Anzahl an Replikaten. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM, n = 3, mRNA; n = 6, Protein. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 ermittelt im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test (mRNA) oder im Zweistichproben-t-Test (Protein). Die Lokalisation des Basigins (Alexa Fluor® 488, grün) wurde mittels Immunfärbung analysiert und mit einer Kernfärbung (DAPI, blau) kombiniert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild der Färbung. ACTB,  $\beta$ -Aktin; BSG, Basigin.

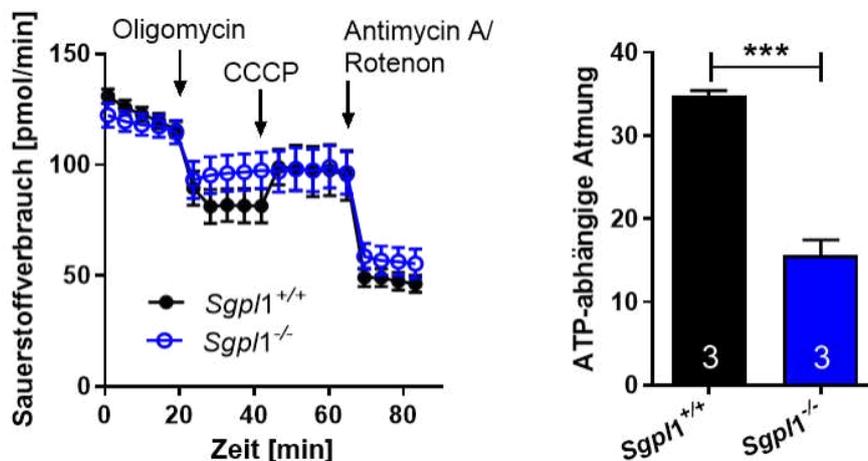
Da Basigin ein Glykoprotein mit unterschiedlichen Glykolysierungsstufen ist, sollte untersucht werden, welche Banden dem Basigin zugeordnet werden können. Dafür wurden die Zellen mit Tunicamycin behandelt und erneut die Expression mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 38). Tunicamycin inhibiert die Proteinglykosylierung und führt somit zu einer signifikant verminderten Expression der glykosylierten Form des Basigins bei 42 kDa. Die unglykosylierte Form des Basigins hatte ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Die Bande bei ungefähr 52 kDa wurde durch die Behandlung mit Tunicamycin nicht beeinflusst und stellt daher eine unspezifische Bande dar. Die unvollständige Lokalisation der PMCA1 an der Plasmamembran in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs ging folglich mit einer verminderten Basigin-Expression einher.



**Abbildung 38: Expression der glykosylierten Basiginformen in MEFs.** Die Expressionen des Basigins wurde mittels Western Blotting bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot und die densitometrische Quantifizierung. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM, n = 3. \*\* < 0,01; \*\*\* p < 0,001 im Vergleich zur *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> Kontrolle ohne Behandlung mit Tunicamycin (6h, 1 µg/ml) ermittelt im t-Test für eine Stichprobe für die Abweichung von 100. ## < 0,01, ### < 0,001 im Zweistichproben-t-Test. ACTB, β-Aktin; BSG, Basigin.

### 3.2.2 Zellmetabolismus in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs

Mit Hilfe der sogenannten Seahorse Methode wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (*oxygen consumption rate*, OCR) in MEFs bestimmt (siehe Abbildung 39). Somit konnten weitere Rückschlüsse auf die Atmungskettenphosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Atmung geschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Zugabe von 2,5  $\mu$ M Oligomycin, welche die ATP-Synthase der Atmungskette inhibiert, der Sauerstoffverbrauch in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs weniger stark sinkt. Die Zugabe von 1  $\mu$ M Rotenon und 1  $\mu$ g/ml Antimycin A, welche zur Bestimmung der nicht-mitochondrialen Respiration dient, führte ebenfalls zu einer geringeren Änderung in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs. Hingegen sind die basale sowie die maximale Respiration unverändert. Die Subtraktion aus basaler und ATP-unabhängiger Respiration zeigt eine signifikant erniedrigte ATP-abhängige Atmung in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs.



**Abbildung 39: Sauerstoffverbrauchsrate und ATP-abhängige Atmung in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs.** Der Sauerstoffverbrauch wurde mittels Seahorse Methode bestimmt. Hierzu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Stimulanzien Oligomycin (2,5  $\mu$ M), CCCP (1  $\mu$ M) sowie Antimycin A (1  $\mu$ g/ml) in Kombination mit Rotenon (1  $\mu$ M) hinzugegeben. Die ATP-abhängige Atmung wurde durch Subtraktion aus der basalen Respiration und der nach Zugabe von Oligomycin ermittelten entkoppelten ATP-Atmung berechnet. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM unabhängiger Versuche, n = 3. \*\*\* p < 0,001 ermittelt im Zweistichproben-t-Test. ATP, Adenosintriphosphat; CCCP, Carbonylcyanid-M-Chlorphenylhydrazon.

## 3.3 Ergebnisse an *Sgpl1*-defizienten humanen Fibroblasten (SPLIS-Patient)

### 3.3.1 Verifizierung der SGPL1-Defizienz

Zur Untersuchung des S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndroms (SPLIS) im Menschen wurden humane Fibroblasten eines Patienten (homozygot p.Leu312Phefs\*30 von Herrn Prof. Dr. Janecke, Innsbruck, siehe 2.1.1, (Janecke et al. 2017)) verwendet. Auf Grund des NPC Phänotyps der MEFs wurden die Fibroblasten des SPLIS-Patienten mit Fibroblasten von

NPC-Patienten verglichen. Hierzu wurden Fibroblasten von zwei unterschiedlichen Patienten mit NPC: NPC-07 (#GM18407; c.1211G>A, R404Q/c.3425T>C, M1142T; geringe Restaktivität) und NPC-36 (#GM18436; c.1836A>C, E612D/c.1628delC, F542fsX; keine Restaktivität) vom *Coriell Institute for Medical Research* (Camden, USA) erworben.

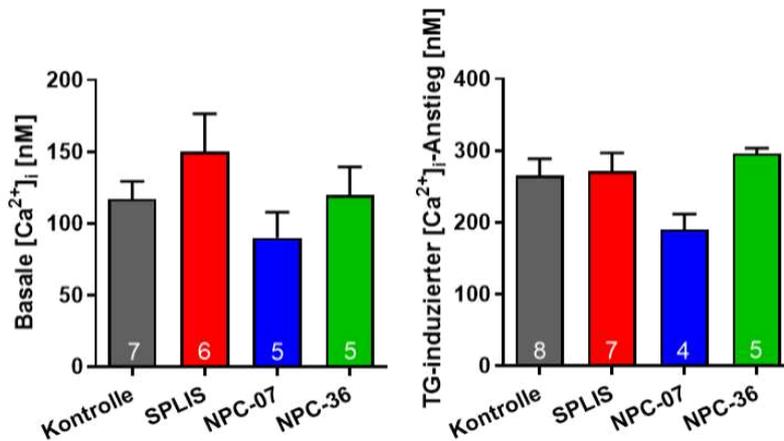
Zunächst wurde die Expression der S1P-Lyase und des NPC1 Proteins überprüft (siehe Abbildung 40). Die SGPL1-Expression ist in Fibroblasten des SPLIS-Patienten komplett herunter reguliert, hingegen in den Fibroblasten der NPC-Patienten gleich zu den Kontrollfibroblasten. Die Expression des NPC1 Proteins ist in den Fibroblasten der Kontrolle und den Fibroblasten des SPLIS Patienten nahezu gleich. Die Fibroblasten des Patienten NPC-07 zeigen eine deutlich verminderte Expression. In den Fibroblasten des NPC-36-Patienten ist die NPC1-Expression nahezu nicht mehr vorhanden.



**Abbildung 40: SGPL1- und NPC1-Expression in Patientenfibroblasten.** Die Expression von SGPL1 und NPC1 wurde mittels Western Blotting in Fibroblasten aus SPLIS sowie NPC-Patienten untersucht. Dargestellt sind repräsentative Blots. ACTB,  $\beta$ -Aktin.

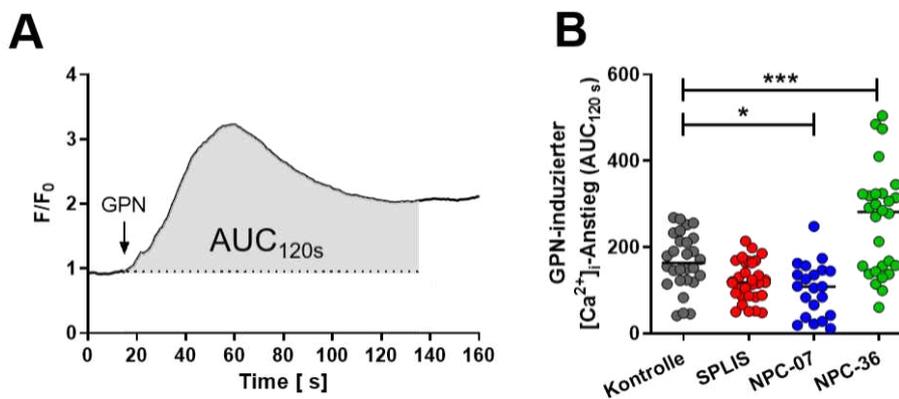
### 3.3.2 Calciumhomöostase

In Fibroblasten *Sgp1*-defizienter Mäuse liegt eine Dysregulation der Calciumhomöostase vor (vgl. 1.2.2). Deshalb sollte in den humanen Fibroblasten zunächst die Calciumhomöostase überprüft werden (siehe Abbildung 41). Die intrazelluläre Calciumkonzentration sowie die Calciumspeicherung im ER wurden in einer Zellsuspension bestimmt. Diese Messungen zeigten, dass weder die Fibroblasten des SPLIS-Patienten, noch die der NPC-Patienten eine veränderte basale Calciumkonzentration aufweisen. Des Weiteren konnte auch kein Unterschied der Calciumspeicherung im ER durch Stimulation mit 1  $\mu$ M Thapsigargin gezeigt werden.



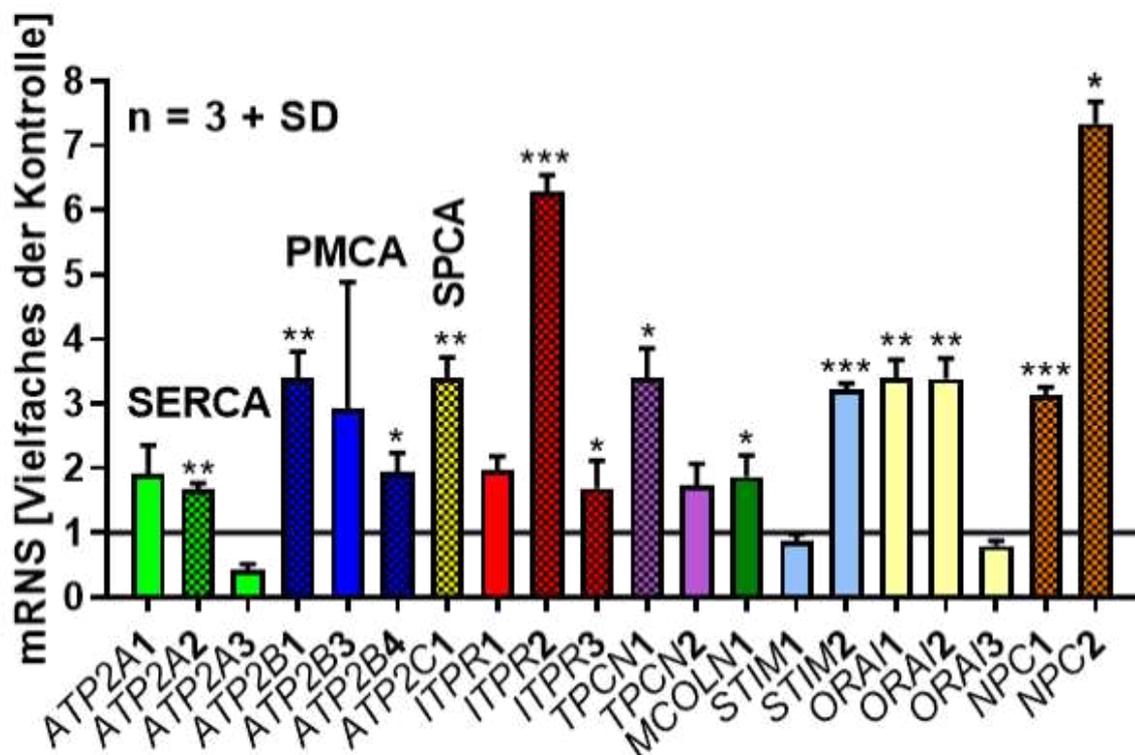
**Abbildung 41: Intrazelluläre Calciumkonzentration in Patientenfibroblasten (Suspension).** Die intrazelluläre Calciumkonzentration sowie die Calciumspeicherung im ER wurden in einer Zellsuspension bestimmt. Die Zellen wurden mit  $1 \mu\text{M}$  Fura-2 beladen und mit  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin stimuliert. Die basale intrazelluläre Calciumkonzentration sowie der maximal induzierte Calciumanstieg aus dem ER wurden ausgewertet. Die angegebene Anzahl an unabhängiger Versuche ist als Mittelwert + SEM gezeigt. TG, Thapsigargin.

Nachfolgend wurde die lysosomale Calciumfreisetzung an Einzelzellen durchgeführt (siehe Abbildung 42). Hierfür wurden die Zellen mit  $4 \mu\text{M}$  GFP-zertifiziertem FluoForte beladen und mit  $200 \mu\text{M}$  GPN stimuliert. GPN führt auf Grund von osmotischer Lyse zu einem Calciumausstrom aus den Lysosomen. Eine Beispielmessung der Kontrollfibroblasten ist in Abbildung 42A gezeigt. Diese Einzelzellmessung zeigte eine veränderte lysosomale Speicherung des Calciums in Fibroblasten aus NPC-Patienten. Die Fibroblasten der NPC-Patienten verhielten sich jedoch konträr. Während die Fibroblasten des Patienten NPC-07 eine verminderte lysosomale Speicherung aufwiesen, war diese in den Fibroblasten des Patienten NPC-36 signifikant erhöht. Die lysosomale Calciumspeicherung der Fibroblasten des SPLIS-Patienten nicht signifikant verändert.



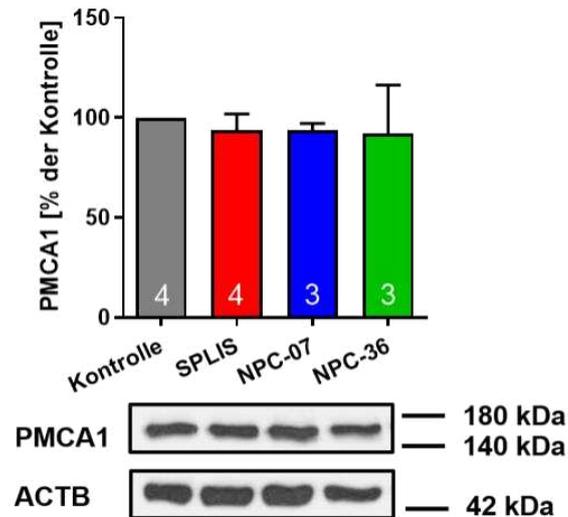
**Abbildung 42: Intrazelluläre Calciumkonzentration in Patientenfibroblasten (Einzelzellen).** Die lysosomale Speicherung des Calciums wurde an Einzelzellen gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit  $4 \mu\text{M}$  GFP zertifiziertem FluoForte beladen und mit  $200 \mu\text{M}$  GPN stimuliert. Ausgewertet wurde die Fläche unter der Kurve für einen Zeitraum von 120 s ( $AUC_{120s}$ ). Dargestellt ist ein Beispielmessung der Kontrollfibroblasten (A). Gezeigt sind ebenfalls die Werte für einzelne Zellen sowie deren Median (B). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  statistische Werte wurden mittels Varianzanalyse in einem einseitigen ANOVA-Test ermittelt. AUC, area under the curve; GPN, Glycyl-L-Phenylalanin- $\beta$ -Naphthylamid.

Im Rahmen der Untersuchung der Calciumhomöostase wurden eine Reihe für die Calciumhomöostase relevanter Gene mit Hilfe einer ausführlichen TaqMan Genexpressionsanalyse (TaqMan Array, 2.2.4.7) überprüft (siehe Abbildung 43). Die Genexpression der Fibroblasten des SPLIS-Patienten ist als Vielfaches der Fibroblasten der Kontrolle dargestellt. Die jeweils vorherrschenden Isoformen der Gene sind mit einem Muster versehen. Die Daten zeigen, dass in den Fibroblasten des SPLIS-Patienten einige für den Calciumtransport relevante Gene, wie *SERCA*, *PMCA*, *SPCA* und *ITPR* signifikant erhöht sind. Die Gene, welche die Calcium ATPasen kodierenden, weisen eine signifikant erhöhte Expression der jeweils am stärksten exprimierten Isoform auf.



**Abbildung 43: Genexpressionsanalyse des SPLIS-Patienten im Vergleich zur Kontrolle.** Die Genexpression zahlreicher für den Calciumhomöostase relevanter Gene wurde mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR ermittelt. Die hier verwendete RNS wurde mit Hilfe der Säulenbasierten RNS-Isolierungsmethode isoliert (siehe 2.2.4.2). Die am stärksten exprimierten Isoformen der Gene sind jeweils schraffiert. In einer ausführlichen TaqMan Genexpressionsanalyse (TaqMan Array) wurden drei unabhängige Replikate untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte + SD. \* < 0,05, \*\* < 0,01, \*\*\* < 0,001 ermittelt für die Abweichung von 1 (Kontrolle) im Zweistichproben-t-Test.

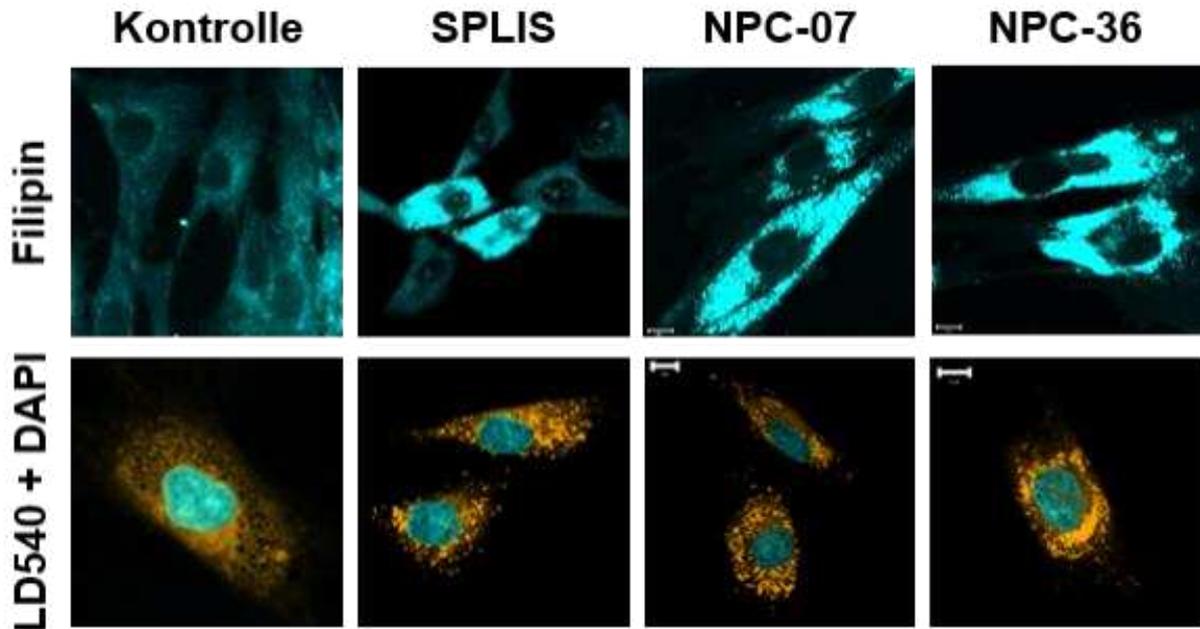
Die Expression der PMCA1 wurde auch auf Proteinebene überprüft (siehe Abbildung 44). Die Expression der PMCA1 auf Proteinebene war nicht verändert, weder in den Fibroblasten des SPLIS-Patienten, noch in den Fibroblasten der NPC-Patienten.



**Abbildung 44: Expression der PMCA1 in Patientenfibroblasten.** Die Expression der PMCA1 wurde auf Proteinebene mittels Western Blotting bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot und die densitometrische Quantifizierung der Blots mit der jeweils angegebenen Anzahl an Replikaten. Alle Werte zeigen den Mittelwert + SEM. ACTB,  $\beta$ -Aktin.

### 3.3.3 Cholesterinhomöostase

Wie bereits zuvor beschrieben, liegt in Mausfibroblasten ein NPC-ähnlicher Phänotyp vor. Deshalb wurde in den untersuchten Patientenfibroblasten zunächst das Cholesterin mittels Filipin sowie die neutralen Lipide mittels LD540 gefärbt (siehe Abbildung 45). Die Fibroblasten des SPLIS-Patienten wiesen in etwa der Hälfte der Zellen eine massive Cholesterinakkumulation in intrazellulären Vesikeln auf. Mittels LD540-Färbung konnte ebenfalls eine Akkumulation neutraler Lipide festgestellt werden. Auf Grund der NPC1 oder NPC2 Defizienz weisen NPC-Patienten eine gestörte Cholesterinverteilung auf, diese äußert sich in einer starken Cholesterinakkumulation. Daher wurden Fibroblasten von NPC-Patienten als Positivkontrolle verwendet. Die Färbung mit dem Farbstoff LD540 zeigte ebenfalls eine Akkumulation neutraler Lipide in den Fibroblasten aus NPC-Patienten.



**Abbildung 45: Färbung des Cholesterins und neutraler Lipide in Patientenfibroblasten.** Das Cholesterin wurde in Fibroblasten aus SPLIS- und NPC-Patienten mit Hilfe des Farbstoffs Filipin III (45  $\mu$ M) gefärbt. Der Farbstoff LD540 (0,1  $\mu$ g/ml, orange) wurde zur Färbung der neutralen Lipide sowie Lipidtröpfchen in Kombination mit einer Kernfärbung (DAPI, 1  $\mu$ g/ml, türkis) verwendet. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild der Färbung.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass für die Kompartimentalisierung neben der SGPL1-Defizienz ein weiterer Faktor nötig ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 Hepatozytenspezifischer *Sgpl1* Knockout in der Maus (*Sgpl1*<sup>HepKO</sup>)

#### 4.1.1 Basale Charakterisierung der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse

Aufgrund der vielen Veränderungen der Leberlipide und der Veränderungen des Cholesterins in Mensch und Maus verursacht durch eine S1P-Lyase-Defizienz, sollte die Rolle der S1P-Lyase in der Leber, dem Hauptort des Lipidmetabolismus, weiter analysiert werden. Daher stellte sich die Frage, welchen Effekt ein hepatozytenspezifischer *Sgpl1*-Knockout, mit besonderem Augenmerk auf den Lipidstoffwechsel, haben könnte.

Die stark verminderte SGPL1-Expression in der Leber sowie in den Hepatozyten der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse bestätigte die erfolgreiche Etablierung des hepatozytenspezifischen S1P-Lyaseknockouts mit Hilfe des floxflox/AlbCre-Systems. Die Expression der S1P-Lyase war sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene deutlich vermindert, jedoch nicht bis auf null gesenkt. Die verbleibende mRNA- und Proteinexpression könnte auf eine Expression von SGPL1 durch andere Zellen als Hepatozyten zurückzuführen sein, da für die Untersuchungen Leberhomogenate verwendet worden sind. Die verwendete Methode der Isolierung sowie anschließende Kultivierung der Hepatozyten führt ebenfalls zu einer Mischkultur. Somit waren neben den Hepatozyten weitere Leberzellen, welche S1P-Lyase besaßen, enthalten. Die Ergänzung dieser Methode beispielsweise durch eine angefügte Zentrifugation mit einem Dichtegradienten, könnte zu einer reinen Hepatozytenkultur und dabei zu weniger verbliebener SGPL1-Expression führen (Salem et al. 2018).

Globale *Sgpl1* Knockoutmäuse haben ein signifikant niedrigeres Körpergewicht, Lymphopenie und weniger Fettgewebsmasse. (Bektas et al. 2010). Ein induzierter *Sgpl1* Knockout führt ebenfalls zu reduziertem Körpergewicht und weniger Fettgewebe in Kombination mit höherer Knochenmasse (Weske et al. 2018). Im Gegensatz dazu zeigte die basale Charakterisierung der *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse weder einen Einfluss auf das Körper- noch auf das Lebergewicht der Mäuse.

Des Weiteren beschrieben Vogel et al. eine Läsion in histologischen Leberschnitten (Vogel et al. 2009). Allende et al. zeigten, dass Mäuse mit globalem *Sgpl1* Knockout unter Neutrophilie sowie einer allgemeinen Entzündung leiden (Allende et al. 2011). Dies konnte in *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen, anhand der durchgeführten H & E Färbung der Leberschnitte, sowie mit der Untersuchung der Blutzellzahlen, ausgeschlossen werden. Eine Leberschädigung hervorgerufen durch die hepatozytenspezifische Deletion der S1P-Lyase konnte ebenfalls mit Hilfe der Bestimmung der Leberenzyme GOT, GPT und GGT ausgeschlossen werden.

Hingegen lassen die deutlich erniedrigten Spiegel des Leberenzym GPT den Schluss zu, dass die hepatozytenspezifische *Sgp11*-Deletion eine protektive Wirkung bewirken könnte. Das müsste in weiteren Versuchen genauer analysiert werden.

Da bei Lipidspeicherkrankheiten der Phänotyp oft mit dem Alter fortschreitet, wurden Mäuse im Alter von acht Wochen und im Alter von acht Monaten analysiert (Ferreira und Gahl 2017). Die oben beschriebene Suppression der S1P-Lyase-Expression in Lebern von *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen war während der Alterung stabil. Dennoch war die basale Charakterisierung im Vergleich zu altersgleichen *Sgp11*<sup>Kontrolle</sup> Mäusen normal. Zusammenfassend zeigten *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse einen milden und unauffälligen Phänotyp und unterschieden sich nicht von den Kontrollmäusen in Bezug auf Körpergewicht, Lebergewicht, Leberhistologie, Leberenzyme sowie der Blutzellzahlen bis zu einem Alter von acht Monaten.

#### 4.1.2 Sphingolipidspiegel der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse

Im Rahmen der ausführlichen massenspektrometrischen Messungen konnte der Einfluss des hepatozytenspezifischen Knockouts auf den Sphingolipidmetabolismus untersucht werden. Aufgrund der S1P-Lyase-Defizienz war mit einer S1P-Akkumulation und einem Rückstau weiterer Sphingolipide zu rechnen.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl S1P als auch Sphingosin in der Leber von *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäusen akkumulieren. Die Konzentration war im Durchschnitt  $\approx 1,5 - 2$ -fach erhöht. Dies war allerdings nicht so deutlich wie in globalen *Sgp11* Knockoutmäusen, in denen S1P 472-fach und Sphingosin 42-fach erhöht sind (Bektas et al. 2010). Diese Ergebnisse, zusammen mit dem unveränderten Lebergewicht, deuten auf einen Mechanismus hin, der den Verlust der S1P-Lyase in Hepatozyten kompensieren kann. Ferner brachte eine genauere Betrachtung dieser Lipidakkumulation einen stärkeren Anstieg der Sphingolipidspiegel in jüngeren Mäusen verglichen mit älteren Mäusen zum Vorschein. Dies wird vor allem bei der Akkumulation des Sphingosins deutlich, welches im Alter von acht Wochen circa 3,8-fach erhöht, im Alter von acht Monaten jedoch lediglich 1,5-fach und damit signifikant weniger erhöht war. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der vermutete kompensatorische Mechanismus mit zunehmendem Alter effektiver wird. Ein solcher Mechanismus zur Kompensation könnte ein verstärkter Metabolismus von S1P und Sphingosin zu anderen Sphingolipiden sein.

Interessanterweise war die S1P-Konzentration im Plasma der *Sgp11*<sup>HepKO</sup> Mäuse nicht erhöht. Obwohl S1P *in vitro* im Blut bemerkenswert stabil ist, ist die Halbwertszeit *in vivo* mit  $\approx 15$  Minuten sehr kurz (Peest et al. 2008; Venkataraman et al. 2008). Kharel et al. postulierten die Leber als primären Ort des S1P-Katabolismus'. Der dort beschriebene Mechanismus

besagt eine Dephosphorylierung des Plasma-S1Ps an der Oberfläche der Hepatozyten durch die Lipidphosphatphosphatase 3 (LPP3). Auf den Import des resultierenden Sphingosins in die Hepatozyten folgt anschließend die Rephosphorylierung des Sphingosins durch die dort lokalisierte SPHK2. Abschließend kann das S1P durch die S1P-Lyase abgebaut werden (Kharel et al. 2020). Kharel et al. verwendeten ein Cre-Rekombinase kodierendes hepatotropes Adenovirus. Dies wurde intravenös verabreicht und führte sieben bis zehn Tage nach Injektion zu einer signifikanten S1P-Erhöhung. Im Rahmen dieser Dissertation konnte jedoch gezeigt werden, dass die S1P-Lyase in Hepatozyten nicht erforderlich ist, um die S1P-Konzentration im Plasma in einem normalen Bereich zu halten. Dies kann auf mehrere Gründe zurückzuführen sein. Einerseits waren die Zeitpunkte in dieser und der von Kharel et al. durchgeführten Studie unterschiedlich: während Kharel et al. das Plasma-S1P innerhalb weniger Tage nach der Injektion des Virus maßen, wurden in dieser Studie die Mäuse im Alter von acht Wochen sowie acht Monaten analysiert. Somit hatten kompensatorische Mechanismen in dem hier verwendeten System mehr Zeit, sich zu entwickeln. Im Plasma könnte ein solcher kompensatorischer Mechanismus die Umwandlung von erhöhtem S1P in Sphingosin und nachfolgend in Ceramide sein. Tatsächlich war Sphingosin in *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen erhöht, aber nicht im Alter von acht Monaten. Dies deutet auf eine Entwicklung der kompensatorischen Mechanismen im Alter hin. Andererseits waren die angewandten Methoden unterschiedlich. Die intravenöse Applikation eines hepatotropen Adenovirus' könnte eventuell die Expression der Cre-Rekombinase und damit die Deletion der *Sgpl1* nicht nur in Hepatozyten sondern auch in anderen Zelltypen bewirken (Liu et al. 2017).

Globale *Sgpl1* Knockoutmäuse wiesen sowohl im Serum ( $\approx$  2,5-fach) als auch in der Leber ( $\approx$  10-fach) stark erhöhte Spiegel an Ceramiden mit kürzerer Kettenlänge (C18:1/14:0-C18:1/18:1) auf. Die Ceramide mit einer Kettenlänge im Bereich von C18:1/20:0 bis C18:1/24:1 waren jedoch unverändert (Bektas et al. 2010). Im Gegensatz dazu waren in der Leber acht Wochen alter *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäuse alle gemessenen Ceramide (C18:1/16:0, C18:1/18:0, C18:1/20:0, C18:1/22:0, C18:1/24:0 und C18:1/24:1) erhöht, während in der Leber acht Monate alter Mäuse eine Präferenz für sehr langkettige Ceramide (C18:1/22:0, C18:1/24:0, C18:1/24:1) erkennbar war. Dies spiegelte sich ebenfalls im Plasma der Mäuse wider, aber jedoch nicht so hoch und so umfangreich wie im Serum der globalen Knockoutmäuse.

Die sehr langkettigen Ceramide mit einer Kettenlänge von C20-C26 sind Produkte der CERS2, welche die abundante Isoform der Ceramid Synthasen in der Mausleber ist. (Grösch et al. 2012). Bektas et al. vermuteten, dass die extrem hohen S1P-Konzentrationen im globalen *Sgpl1*-Knockout die *CerS2* über ihr S1P-Bindemotiv hemmt und somit die Bildung sehr

langkettiger Ceramide unterdrückt (Laviad et al. 2008; Bektas et al. 2010). In der Leber von *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen war die Expression der *CerS2* auf mRNA-Ebene signifikant erhöht, jedoch waren die S1P-Spiegel deutlich geringer im Vergleich zu den von Bektas et al. beschriebenen Mäusen. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich erklären, dass mit Hilfe der leicht induzierten *CerS2* Sphingosin in vorwiegend sehr langkettige Ceramide umgewandelt werden kann. Vermutlich auf Grund der nur leicht erhöhten S1P-Konzentrationen wird im Gegensatz zu globalen Knockoutmäusen die *CERS2* nicht inhibiert und die Bildung sehr langkettiger Ceramide nicht unterdrückt.

Die Serin-Palmitoyltransferase katalysiert den initialen Schritt der Sphingolipid *de novo* Synthese. Die Expressionsanalyse zeigte in der Leber von *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen auf mRNA-Ebene eine signifikant erniedrigte Expression der Untereinheiten *Sptlc1*, *Sptlc2* und *Sptssa*. Dennoch waren Dihydro-S1P und Dihydro-Sphingosin in den Lebern von acht Wochen alten weiblichen sowie Dihydro-S1P in den Lebern acht Monate alter männlichen *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen erhöht. Allerdings waren im Plasma weder Dihydro-S1P noch Dihydro-Sphingosin signifikant verändert. Diese ähnelt dem Lipidprofil der Leber von globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen. Sie zeigten eine Reduzierung der *Sptlc1* auf mRNA-Ebene während Dihydro-S1P und Dihydro-Sphingosin erhöht waren (Bektas et al. 2010). In anderen Zelltypen mit *Sgp1*-Defizit, wie z.B. Neuronen, konnte ebenfalls eine Erhöhung von Dihydro-S1P und Dihydro-Sphingosin trotz verminderter *de novo* Sphingolipidsynthese beobachtet werden (Hagen-Euteneuer et al. 2020).

Weiter konnte gezeigt werden, dass neben Leber und Plasma auch die Galle in *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen eine Rolle bei der Sekretion akkumulierender Sphingolipide spielt. Neben S1P waren auch dessen Dihydroform und Glucosylceramide signifikant erhöht. Allerdings wies die Galle im Gegensatz zu Leber und Plasma keine Veränderungen der Ceramidspiegel auf.

Somit könnte die Hochregulierung von hepatischen Transportern und die Ausscheidung von S1P in die Galle ein weiterer kompensatorischer Mechanismus sein. Hepatozyten exprimieren eine Vielzahl an Transportern. Hierzu zählen unter anderem verschiedene ABC-Transporter, welche für die Sekretion in die Gallenkanälchen (*ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*) oder den sinusodialen Efflux (*ABCC3* und *ABCC4*) zuständig sind, aber auch spezifische S1P-Transporter, wie *Spinster-2* und *Mfsd2b* (Takabe et al. 2010; Vogt et al. 2018; Spiegel et al. 2019; Ben Saad et al. 2021). Ihlefeld zeigte im Rahmen ihrer Dissertation, dass die Expression einiger ABC-Transporter (*Abca1*, *Abcb1*, *Abcc1*) sowie des S1P-spezifischen Transporters *Spns2* in *Sgp1<sup>-/-</sup>* MEFs signifikant erhöht ist (Ihlefeld 2013). Die Expressionsanalyse in Leberhomogenaten aus *Sgp1<sup>HepKO</sup>* Mäusen zeigte keine Veränderung dieser Transporter auf mRNA Ebene. Eine posttranskriptionale oder posttranslationale

Regulation kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Deshalb muss nachfolgend herausgefunden werden, welcher Transporter die S1P-Sekretion in die Galle vermittelt.

Jedoch ist wichtig noch einmal zu erwähnen, dass die hier präsentierten Daten nicht ausschließen, dass die Hepatozyten ebenfalls S1P ins Plasma sezernieren und andere Zelltypen zum S1P-Abbau im Kreislauf beitragen können. Im Gegensatz zu S1P waren Ceramide in der Galle von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen nicht erhöht, aber jedoch messbar. Somit scheinen erhöhte Ceramidkonzentrationen, die als Folge der hepatozytären Deletion der S1P-Lyase entstehen, ausschließlich ins Blut sezerniert zu werden, möglicherweise als Bestandteile von Lipoproteinen (Iqbal et al. 2017). Hingegen waren die Glucosylceramide in der Galle von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen erhöht, was darauf hindeutet, dass tatsächlich eine erhöhte Bildung von Glucosylceramiden in Hepatozyten, denen *Sgp1* fehlt, vorliegt, obwohl sie in Leberhomogenaten dieser Mäuse nicht erhöht waren.

Die Rolle der Hepatozyten für die Regulierung des Plasma-S1Ps wird außerdem durch die Beobachtung in Frage gestellt, dass eine Hepatektomie zu einer Verringerung der Plasma-S1P-Spiegel bei Mäusen führte (Kurano et al. 2013). Des Weiteren wiesen LDLR-überexprimierende Mäuse weniger S1P und ApoM im Plasma auf (Kurano et al. 2015). Somit könnte ApoM-gebundenes S1P ebenfalls über den LDL-Rezeptor eliminiert werden. Jedoch war der LDL-Rezeptor in der Leber von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen hochreguliert und gab zusammen mit weiteren Ergebnisse Hinweise auf eine erhöhte Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Leber. Dieser Weg würde jedoch eine weitere Verarbeitung von S1P über den Metabolismus oder seine Ausscheidung in die Galle erfordern.

Die Ergebnisse der HPLC-MS/MS Messungen verdeutlichen, dass eine Deletion der S1P-Lyase zu einer Vielzahl akkumulierender Sphingolipide führt. Neben S1P, dem direkten Edukt der S1P-Lyase, sind ebenfalls zahlreiche Vorläufer, wie Ceramide, in der Leber und teilweise auch in anderen Kompartimenten, wie dem Plasma und der Galle, erhöht. Anhand dieser Ergebnisse konnte die Lipidakkumulation, vor allem der Ceramide, als deutlicher Unterschied zwischen globalem und hepatozytenspezifischem *Sgp1*-Knockout gezeigt werden. Wahrscheinlich ist der milde Phänotyp der *Sgp1*<sup>HepKO</sup>-Mäuse auf die Sekretion anfallender Sphingolipide ins Blut und in die Galle zurückzuführen. Hepatozyten, denen die S1P-Lyase fehlt sezernieren akkumulierende Sphingolipide ins Blut und in die Galle. Dort können sie über den Darm ausgeschieden oder von anderen Zelltypen mit *Sgp1*-Expression abgebaut werden. Ein Beispiel für diese Zelltypen könnten Endothelzellen sein, denn Venkataraman et al. zeigten, dass die Deletion oder Überexpression der S1P-Lyase in

HUVEC Zellen die [<sup>3</sup>H]S1P-Konzentration in den Überständen erhöhte oder verringerte (Venkataraman et al. 2008).

Hierbei bleibt jedoch unklar, welche der erhöhten Sphingolipidmoleküle primär von der Leber sezerniert und welche durch metabolische Umwandlungen innerhalb des Gefäßsystems oder von entfernten Organen erzeugt wurden. Insbesondere die Ceramide C18:1/24:0 und C18:1/24:1 sowie das Sphingomyelin C18:1/24:1 waren im Plasma stetig erhöht. Möglicherweise sind Sphingolipide, die diese Fettsäureketten enthalten, metabolisch stabiler als andere.

#### 4.1.3 Cholesterinhomöostase in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen

Die Leber ist nicht nur der Hauptort des Lipidstoffwechsels, sondern auch das wichtigste Organ der Cholesterinhomöostase.

Bektas et al. beschrieben in globalen *Sgp1* Knockoutmäusen einen massiven Anstieg der Phospholipide, des Triacylglycerins und des Cholesterins im Serum. In der Leber dieser Mäuse waren Diacylglycerin, Triacylglycerin und Cholesterinester erhöht. Sie stellten die Vermutung auf, dass das Diacylglycerin als ein Nebenprodukt der erhöhten Sphingomyelinsynthese vermehrt entsteht (Bektas et al. 2010). Da in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen keine Erhöhung der Sphingomyeline beobachtet werden konnte und auch keine Veränderung der Triglyceridspiegel im Blut feststellbar war, wurde dieser ansonsten wichtige Punkt im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Embryonale Mausfibroblasten, die aus *Sgp1*-defizienten Mäusen isoliert worden waren (*Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs), zeigten eine Störung der intrazellulären Cholesterinverteilung, wie sie bei NPC beobachtet wird. In diesen Zellen akkumuliert Cholesterin in Endo-/Lysosomen, der Cholesterinmangel am ER aktiviert SREBP2 und führt somit zu einer Hochregulation des LDL-Rezeptors. Des Weiteren weisen diese Zellen eine erhöhte APP-Expression in Kombination mit verminderten NPC1-Spiegeln auf (Vienken et al. 2017). Deshalb wurde im Rahmen dieser Studie ebenfalls die Cholesterinhomöostase in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen analysiert. Ferner soll die Frage, ob ein hepatozytenspezifischer Knockout ebenfalls zu einem NPC-ähnlichen Phänotyp führt, beantwortet werden.

Der hepatozytenspezifische Knockout der S1P-Lyase führte in der Leber zu einer Erhöhung des Cholesterin um etwa das 1,3-fache und einer Erhöhung seines unmittelbaren Vorläufers, dem Desmosterol, um ungefähr das 1,6-fache. Dies ist auf eine leichte Herunterregulation der HMGCR und eine vermehrte Expression des LDL-Rezeptors zurückzuführen.

Diese Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Cholesterinsynthese in der Leber hin, obwohl die Expression der HMGCR, welche die Schrittmacherreaktion der Cholesterinhomöostase

katalysiert, leicht vermindert war. Die mRNA-Spiegel dieser beiden Enzyme unterschieden sich nicht, sodass auf eine Enzymregulation auf posttranslationaler Ebene geschlossen werden kann. Dies bedeutet ebenfalls, dass kein lokaler Cholesterinmangel am ER vorlag, der die *Ldlr*- und *Hmgcr*-Transkription über SREBP-Transkriptionsfaktoren ausgelöst hat, wie es in NPC normalerweise der Fall ist (Lamri et al. 2018). Die Regulation der Proteinexpression des LDLR geschieht über mehrere Wege, beispielsweise der E3-Ubiquitin-Ligase IDOL (*inducible degrader of the LDL receptor*), die Deubiquitylase USP2 oder die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (Sundararaman et al. 2021; Zhang et al. 2012; Nelson et al. 2016). Im Plasma dieser Mäuse waren das Gesamtcholesterin sowie das HDL-assoziierte Cholesterin hingegen unverändert. Das LDL-assoziierte Cholesterin war indessen vermindert, was mit einer vermehrten LDL-Aufnahme übereinstimmt. Sowohl das HDL-Cholesterin als auch das LDL-Cholesterin waren im Serum von globalen *Sgp1* Knockoutmäusen stark erhöht (Bektas et al. 2010). Damit stehen diese Ergebnisse aus dem Plasma von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Gegensatz zu denen in globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen und menschlichen SPLIS-Patienten, die ebenfalls eine Hypercholesterinämie aufweisen (Prasad et al. 2017).

Die Expressionsanalyse der Cholesterintransporter *Abca1* und *Abcg1* wies keine Veränderung in der Leber der *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäuse auf. Dies bestätigt die Annahme einer erhöhten Cholesterinsynthese in den Hepatozyten, verursacht durch die *Sgp1*-Defizienz.

Darüber hinaus konnten keine Anzeichen eines NPC-ähnlichen Phänotyps festgestellt werden. Das Cholesterin war gleichmäßig in den Hepatozyten verteilt, die Expression von NPC1 war unverändert und sekundäre Effekte wie ein APP-Induktion konnten nicht beobachtet werden, weder in der Leber noch in Hepatozyten von *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen. Hingegen wiesen Hepatozyten, die aus *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert wurden, eine um circa das 1,5-fache erhöhte Anzahl an Lipidtröpfchen aus neutralen Lipiden auf (LD540-Färbung). Hierbei grenzt sich der *Sgp1* Knockout eindeutig von dem Erscheinungsbild eines NPC Phänotyps ab. Im Gegensatz zur NPC-bedingten Cholesterinakkumulation, weisen die untersuchten Hepatozyten eine Anreicherung von Sphingolipiden in Lipidtröpfchen auf. Diese entstehen nicht durch eine Verteilungsstörung (NPC-Defizit), sondern durch eine nicht ausreichende Sekretion akkumulierenden Sphingolipide.

Ein weiterer Unterschied zu globalen *Sgp1* Knockoutmäusen zeigte sich anhand der unveränderten PPAR $\gamma$  Expression in der Leber, sowie auch in primären Hepatozyten der *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäuse (mRNS und Protein). Auch die Expression der Schlüsselenzyme wie der Leber-X-Rezeptor und die Fettsäuresynthese waren unverändert. Bektas et al. vermuteten eine mechanistische Beteiligung von PPAR $\gamma$  als fehlendes Bindeglied zwischen S1P-Lyase-Defizienz und Cholesterinhomöostase, denn in globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen

war *Ppar $\gamma$*  auf mRNA-Ebene um ungefähr das 3,5-fache erhöht (Bektas et al. 2010). Dieser große Unterschied erklärt die milden Veränderungen, die in *Sgpl1*<sup>HepKO</sup>-Mäusen beobachtet werden können, und zeigt, dass der Knockout der S1P-Lyase keinen generellen Einfluss auf die Regulation von PPAR $\gamma$  hat.

#### 4.1.4 Charakterisierung primärer Hepatozyten isoliert aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen

Die zuvor beschriebenen HPLC-MS/MS Daten schlossen nicht aus, dass die Hepatozyten ebenfalls S1P sezernieren. Deshalb wurde mit Hilfe einer Cokultur bestehend aus primären Hepatozyten und HTLA Zellen im Rahmen eines Luciferaseversuchs die S1P-Sekretion der Hepatozyten überprüft. Im Gegensatz zum serumfreien Medium enthält das Vollmedium S1P, wodurch sich die signifikant erhöhte Luciferaseaktivität in den Hepatozyten der Kontrollmäuse erklären lässt. Die Luciferaseaktivität in Hepatozyten, die aus *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen isoliert wurden, war hingegen unverändert. Dies könnte auf eine erhöhte Pufferkapazität der *Sgpl1*-defizienten Hepatozyten gegenüber des S1Ps aus dem Serum hindeuten. Die Vermutung, dass dies auf eine erhöhte S1P-Aufnahme in diesen Hepatozyten zurückzuführen ist, liegt nahe. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine Hochregulierung von LPP3 die Ursache sein könnte und das sekretierte S1P umgehend dephosphoryliert wird und somit mit diesem Versuch nicht nachweisbar ist.

Zusammengenommen zeigen die hier präsentierten Daten, dass der hepatozytenspezifische *Sgpl1* Knockout zu folgenden wichtigen Erkenntnissen führt: Die Mäuse weisen lediglich einen schwachen Phänotyp auf, welcher jedoch von älteren Mäusen besser kompensiert werden kann. Jedoch sorgt die Deletion der S1P-Lyase für eine hochgradig zelltypspezifische Akkumulation von S1P und vorgelagerten Sphingolipiden. Diese ist auf die zelltypspezifische Expression von sphingolipidmetabolisierenden Enzymen und Transportern zurückzuführen. Die Hepatozyten exprimieren zahlreiche Effluxtransporter und sind somit in der Lage, die akkumulierenden Sphingolipide zu einem großen Teil zu eliminieren und die Leberfunktion stabil zu halten. Die S1P-Lyase in Hepatozyten ist hingegen jedoch nicht erforderlich für die Kontrolle des Plasma-S1P-Spiegels. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs, die Deletion der S1P-Lyase in Hepatozyten zu keinem NPC-ähnlichen Phänotyp führt.

Für zukünftige Studien bleibt die Aufklärung der Rolle von S1P in der Galle, mit ihrem möglichem Einfluss auf den Darm. Jedoch implementieren diese Ergebnisse eine wichtige Informationen für das Verständnis der Rolle der Leber im Ganzkörper-Sphingolipid-Stoffwechsel.

## 4.2 Die Rolle der S1P-Lyase in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

S1P-Lyase-defiziente Mäuse weisen viele Gemeinsamkeiten mit SPLIS Patienten auf, beispielweise Störungen und Veränderungen der Nieren (Zhao et al. 2021). In Menschen zählen SRNS, Nebenniereninsuffizienz und neurologische Störungen zu den Hauptsymptomen von SPLIS (Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017; Saba 2019). Des Weiteren zeigen zahlreiche Patienten, wie auch die Mäuse, erhöhte Cholesterin- und Triglyceridspiegel im Serum (Bektas et al. 2010; Lovric et al. 2017; Prasad et al. 2017). Eine Lymphopenie kann ebenfalls sowohl in S1P-defizienten Mäusen als auch in SPLIS Patienten auftreten (Vogel et al. 2009; Weber et al. 2009; Lovric et al. 2017). Embryonale Fibroblasten der S1P-Lyase-defizienten Mäuse wurden bereits vielfach als Modellsystem zur Untersuchung der zellulären Wirkungen der *Sgp1*-Defizienz verwendet (Ihlefeld et al. 2012; Hagen-Euteneuer et al. 2020).

Claas et al. und Ihlefeld et al. beschrieben einen spezifischen Calciumphänotyp mit stark erhöhten basalen Calciumspiegeln sowie einer vermehrten Calciumfreisetzung aus den Thapsigargin-sensitiven Speichern des ERs in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs (Claas et al. 2010; Ihlefeld et al. 2012). Dies konnte hier erneut bestätigt werden. Sowohl die basale Calciumkonzentration, als auch die Calciumfreisetzung aus den Speichern im ER war in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs um circa 50 % erhöht (siehe 2.2.5.3). Eine erhöhte Expression der dominanten SERCA-Isoform konnte die gesteigerte Calciumspeicherung erklären, die Ursache für die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration blieb jedoch unbekannt (Ihlefeld 2013). Entscheidend für die Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration in Fibroblasten ist die PMCA, deren Expression auf mRNA- und Proteinebene jedoch in den MEFs nicht verändert war (Ihlefeld 2013). Auch die unveränderte Proteinexpression der dominanten PMCA-Isoform (PMCA1) wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Folglich kann die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration in den MEFs nicht durch verminderte Expression der PMCA erklärt werden. Dieses Enzym kann allerdings auf vielfältige Weise posttranslational modifiziert und dadurch seine Aktivität verändert werden (Brini und Carafoli 2011). Auch die Lokalisation der PMCA an der Plasmamembran spielt für die Funktion des Enzyms eine wichtige Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Lokalisation der PMCA in MEFs untersucht, und festgestellt, dass diese in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs nur zum Teil an der Plasmamembran lokalisiert ist. Hierdurch lässt sich die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration erklären. Die erhöhte Calciumspeicherung in Organellen könnte eine sekundäre Folge davon sein. Die hier beobachtete Dyslokalisierung der PMCA passt zu bereits vorher gemachten Beobachtungen an den *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs. So zeigten Ihlefeld et al. 2015, dass verschiedene Multidrugtransporter, wie ABCB1 und SPNS2, in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs überexprimiert und nicht an der Zelloberfläche, sondern überwiegend in intrazellulären Organellen, lokalisiert sind (Ihlefeld et al. 2015). Somit

könnte also ein genereller Defekt beim Transport von Proteinen an die Plasmamembran vorliegen.

Schmidt et al. beschrieben das Protein Basigin 2017 als essentielle Untereinheit der PMCA, welche für dessen korrekte Lokalisation an der Plasmamembran zuständig ist (Schmidt et al. 2017). Die Überprüfung der Basiginexpression zeigte in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs tatsächlich eine deutlich schwächere Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Allerdings muss der funktionelle Zusammenhang zwischen der mangelnden Basiginexpression und dem Calciumphänotyp der MEFs in zukünftigen Versuchen weiter analysiert werden und wurde hier nicht adressiert.

Mittels Mito Stress Test konnten weitere Rückschlüsse auf die Atmungskettenphosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Atmung gezogen werden. Die basale sowie die maximale Respiration waren unverändert. Allerdings konnte in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs eine signifikant verminderte ATP-abhängige Atmung nachgewiesen werden. Maharaj et al. konnten für SPLIS-Patienten bereits einen Zusammenhang der S1P-Defizienz und den Mitochondrien zeigen. Sie beschrieben auf Grund der mitochondrialen Dysfunktion neben einem veränderten Membranpotential auch die Einleitung der mitochondrialen Apoptose (Maharaj et al. 2020a). Bereits Law et al. beschrieben in einem Mausmodell beeindruckend den Zusammenhang zwischen der Akkumulation sehr langkettiger Ceramide auf Grund einer CERS2 Überexpression und oxidativem Stress sowie mitochondrialer Dysfunktion (Law et al. 2018). Ob diese Zusammenhänge auch in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEF bestehen, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

### 4.3 Die Rolle der S1P-Lyase in humanen Patientenfibroblasten

Zunächst wurde mittels Proteinanalyse die SGPL1- und NPC-Defizienz in den humanen Patientenfibroblasten bestätigt. Die NPC Expression unterscheidet sich in den Fibroblasten der zwei NPC Patienten stark. Dies wurde zuvor bereits durch das *Coriell Institute for Medical Research* angegeben und ist durch die unterschiedliche Art der Mutation erklärbar. Die Mutation des Patienten NPC-36 enthält eine Deletion in Kombination mit einer *Frameshift*-Mutation und sorgt somit für nahezu keine Restaktivität des NPC Proteins.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs zeigte die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration in SPLIS Fibroblasten keine veränderte basale oder lysosomale Calciumspeicherung, obwohl einige an der Calciumhomöostase beteiligte Proteine im Vergleich zu Kontrollfibroblasten vermehrt exprimiert wurden. Die SERCA2 war nur

schwach erhöht, die PMCA1 hingegen im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten dreifach erhöht. Die Überprüfung der Proteinexpression der PMCA zeigte jedoch keine Veränderung. Die vermehrte Expression der SERCA und PMCA spiegelt sich somit nicht durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration wider. Die SPCA ist ebenfalls auf mRNA-Ebene signifikant erhöht, führt aber nicht zu einer erhöhten lysosomalen Calciumfreisetzung durch GPN-Stimulation. Auch ITPR2 ist signifikant erhöht. Mögliche Auswirkungen auf einen Agonisten-induzierten Calciumanstieg wurden noch nicht überprüft.

In humanen B-Lymphozyten mit NPC-Defekt ist die Calciumfreisetzung aus dem ER im Vergleich zu Kontrollfibroblasten unverändert. Dies konnte mit den NPC-07 sowie den NPC-36 Fibroblasten bestätigt werden. Allerdings wurde an den B-Lymphozyten eine um circa 65 % verminderte Calciumfreisetzung aus Lysosomen beschrieben (Lloyd-Evans et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten zahlreiche Messungen lediglich für die NPC-07 Fibroblasten, mit lediglich leicht verminderter NPC1-Expression, einen verminderten Calciumanstieg durch GPN-Stimulation. Hingegen zeigten die NPC-36 Fibroblasten trotz geringerer NPC1-Expression eine erhöhte GPN-Wirkung. Dies Ergebnis steht im Widerspruch zur allgemeinen Annahme, dass bei NPC generell die lysosomale Calciumspeicherung vermindert ist.

Vienken et al. beschrieben eine NPC-ähnliche Cholesterinverteilungsstörung in *Sgpl1*<sup>-/-</sup> MEFs (Vienken et al. 2017). In Fibroblasten stellt die Cholesterinfärbung mittels Filipin bis heute die wichtigste Methode zur NPC-Schnelldiagnose dar. Mit dieser Methode konnte ich in den NPC-07 und NPC-36 Fibroblasten die deutliche Cholesterinakkumulation in Endo/Lysosomen bestätigen. Hingegen zeigte die Färbung in den Fibroblasten der SPLIS-Patienten lediglich in etwa der Hälfte der Zellen diese Cholesterinakkumulation in intrazellulären Vesikeln. Dies Ergebnis zeigt, dass neben der *Sgpl1*-Defizienz anscheinend ein zweiter Faktor nötig ist, damit die NPC-ähnliche Cholesterinverteilungsstörung auftritt. Hierzu passt, dass in den *Sgpl1*-defizienten Hepatozyten keine Cholesterinsequestrierung beobachtet wurde (siehe oben). Ein möglicher Grund für das Fehlen der Cholesterinverteilungsstörung in circa der Hälfte der SPLIS Fibroblasten könnte die Hochregulation der NPC-Proteine sein, die laut Taqman-Array auf mRNA-Ebene circa 3-fach (NPC1) und 7-fach (NPC2) hochreguliert sind. Vermutlich kann diese Hochregulation eine funktionelle Beeinträchtigung der NPC-Proteine kompensieren. Allerdings zeigten die Westernblots keine Hochregulation des NPC1-Proteins. Eine andere Möglichkeit könnte die vermehrte Expression von Transportern für den Export von S1P oder anderen Sphingolipiden im Teil der resistenten SPLIS Fibroblasten sein. Dies wurde hier jedoch nicht untersucht. Zukünftige Untersuchungen müssten also klären, welche Unterschiede zwischen SPLIS Fibroblasten mit und ohne NPC-Phänotyp existieren. Auch Sphingolipid-Messungen an den SPLIS Fibroblasten stehen noch aus. Die LD540 Färbung

zeigte darüber hinaus in den SPLIS Fibroblasten, aber auch in den NPC Fibroblasten, eine deutliche Akkumulation neutraler Lipide. Eine genaue Aussage darüber, welche Lipide in den Vesikeln akkumulieren, war allein mit der Färbung nicht möglich.

#### 4.4 Ausblick und offenen Fragen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse in einem Alter von bis zu acht Monaten einen hepatozytenspezifischen Knockout der S1P-Lyase weitestgehend kompensieren können. Ihr äußeres Erscheinungsbild ist unauffällig, wohingegen globale Knockoutmäuse bei normaler Fütterung eine starke Reduktion an viszeralem, subkutanen sowie abdominalen weißen Fettgewebe aufweisen (Bektas et al. 2010; Weske et al. 2018). Deshalb stellt sich für weiterführende Untersuchungen die Frage welchen Einfluss die S1P-Lyase in Adipozyten hat. Bisher ist in Adipozyten die intrazelluläre Rolle des S1Ps sowie der Mechanismus der zu Lipodystrophie führt unbekannt. Mit Hilfe eines adipozytenspezifischen *Sgp1*-Knockout könnten diese Fragen sowie die Lipidakkumulation genauer untersucht werden.

In dem hier verwendeten Mausmodell waren die Tiere in der Lage unter anderem durch Lipidsekretion in das Plasma und die Galle den Knockout beträchtlich zu kompensieren. Studien zeigten, dass das Plasma-S1P maßgeblich aus Erythrozyten und Endothelzellen stammt (Cartier und Hla 2019). Weshalb die Hypothese nahe liegt, dass das Endothel entscheidend zum S1P-Abbau beiträgt. Ein endothelspezifischer *Sgp1*-Knockout könnte weitere Aufschlüsse über die Rolle der S1P-Lyase bei der Regulation des Plasma-S1P-Spiegels liefern.

In *Sgp1*-defizienten Mausfibroblasten kann ein spezifischer Calcium-Phänotyp (basale Konzentration und Speicherung erhöht) beobachtet werden (Ihlefeld et al. 2012). Das Enzym PMCA pumpt Calciumionen aus dem Zytosol aus der Zelle heraus und ist somit essentiell für die Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration. In *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs konnte eine Dyslokalisierung der PMCA in intrazellulären Vesikeln, jedoch keine veränderte Expression beobachtet werden. Erste Versuche ließen auf eine Beteiligung der essentiellen PMCA-Untereinheit Basigin/CD147 schließen. Deshalb sollte mit Hilfe zukünftiger Versuche der Einfluss der *Sgp1*-Defizienz auf die Lokalisation und die Funktionalität der PMCA sowie den damit verbundenen Calciumphänotyp genauer untersucht werden, mit dem Ziel der genauen Aufklärung dieses Mechanismus'.

Aktuell existiert keine gezielte Therapiemöglichkeit für SPLIS-Patienten. Jedoch beschrieben Zhao et al. kürzlich in globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen die Wirksamkeit der Übertragung des

menschlichen SGPL1-Gens mit Hilfe eines Adeno-assoziierten Virus (AAV-SPL) (Zhao et al. 2021). Dies stellt einen ersten wichtigen Schritt für eine neue universelle Behandlungsmethode von SPLIS dar.

## 5. Zusammenfassung

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein wichtiger Lipidmediator, der über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und intrazelluläre Wirkungen vielfältige Wirkungen auslöst und eine Rolle bei der Lymphozytenzirkulation, der Erhaltung der endothelialen Barriere, bei Entzündungsprozessen und Tumorwachstum spielt. Die S1P-Lyase (*Sgp1*) katalysiert den irreversiblen Abbau von S1P und damit den letzten Schritt des Sphingolipidkatabolismus<sup>4</sup>. Ein Fehlen der *Sgp1* bewirkt eine Akkumulation von S1P und anderen Sphingolipiden im Blut und Gewebe, was multiple Organschäden zur Folge hat. Menschen mit S1P-Lyase-Insuffizienz-Syndrom (SPLIS) leiden insbesondere unter steroidresistentem nephrotischem Syndrom, Nebennierenrindeninsuffizienz und neurologischen Störungen. Weitere mögliche Symptome sind Lymphopenie, Hautveränderungen und Dyslipidämien. S1P-Lyase-defiziente Mäuse weisen sehr ähnliche Organschädigungen auf.

An *Sgp1*-Knockoutmäusen war zuerst die massive Akkumulation nicht nur von Sphingolipiden, sondern auch von Cholesterin und Triglyceriden in Blut und Leber aufgefallen. Auch bei SPLIS-Patienten wurde eine Hypercholesterinämie beobachtet. Um die Kreuzregulation des Sphingolipid- und Cholesterinmetabolismus besser zu verstehen, sollte die Rolle der *Sgp1* in der Leber, dem Hauptort des Lipidmetabolismus, untersucht werden. Hierzu sollte ein Mausmodell mit einem hepatozytenspezifischen *Sgp1* Knockout (*Sgp1*<sup>HepKO</sup>) etabliert und charakterisiert werden. Dies wurde durch Kreuzen von *Sgp1*<sup>fl/fl</sup>-Mäusen mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter dem Albuminpromoter exprimierten, erreicht. Die basale Charakterisierung zeigte, dass diese Mäuse im Gegensatz zu globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen sowohl im Alter von acht Wochen, als auch im Alter von acht Monaten einen unauffälligen Phänotyp aufwiesen. Das äußere Erscheinungsbild inklusive Leber- und Körpergewicht, das Blutbild, die Leberenzyme sowie die Histologie der Leber waren unverändert. Die Analyse der Leberlipide mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Tandemmassenspektrometrie zeigte eine signifikante Akkumulation (≈1,5-2-fach) von S1P, Sphingosin und Ceramiden, aber nicht von Glucosylceramiden und Sphingomyelin in der Leber. Messungen im Plasma zeigten eine Erhöhung mehrerer Ceramide, während der S1P-Spiegel normal war. Ferner zeigten Untersuchungen der Galle signifikant erhöhte Konzentrationen an S1P, Dihydro-S1P und Glucosylceramiden, jedoch unveränderte Ceramide. Die Ergebnisse legen folgende Schlussfolgerungen nahe (siehe Abbildung 46):

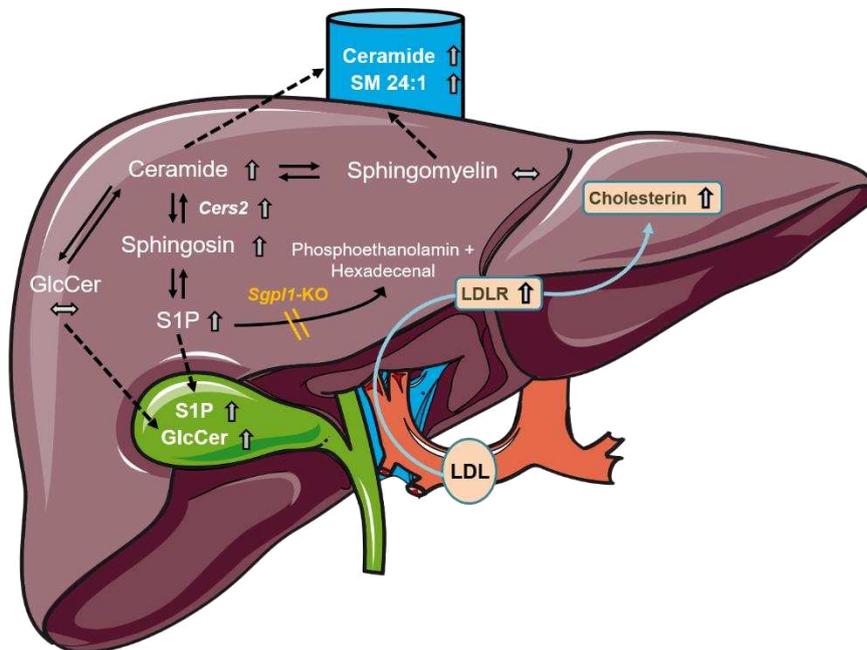
1. In der Leber kann mit Hilfe von Ceramidsynthasen akkumulierendes Sphingosin in Ceramide umgewandelt werden, welche anschließend ins Blut sezerniert und letztendlich vermutlich von anderen Zellen verstoffwechselt werden. Außerdem ist nicht ausgeschlossen,

dass S1P ebenfalls ins Blut sezerniert und dort effektiv abgebaut wird, so dass die S1P-Konzentration im Plasma unverändert bleibt.

2. S1P sowie Glucosylceramide werden an die Galle abgegeben und ausgeschieden.

3. Die *Sgp1* in der Leber ist nicht essentiell für die Regulation des Plasma-S1Ps, was zuvor vermutet worden war

Eine Analyse der Sterole zeigte in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen erhöhte Spiegel an Cholesterin und Desmosterol in der Leber. In Übereinstimmung mit der erhöhten Proteinexpression des *low density lipoprotein* (LDL-) Rezeptors und erniedrigten Konzentrationen des LDL-Cholesterins im Plasma, deuten diese Daten auf eine erhöhte Aufnahme von LDL-Cholesterin durch die Leber hin. Untersuchungen in der Leber sowie mit primären Hepatozyten zeigten im Gegensatz zu globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen keine Veränderungen der Peroxisomen-Proliferator-aktiviertem Rezeptor  $\gamma$  Expression. Weitere Gene mit zentraler Rolle wie der *Liver X receptor* oder die Fettsäuresynthese, waren ebenfalls nicht reguliert. Dieser im Vergleich zu globalen *Sgp1*-Knockoutmäusen milde Phänotyp lässt sich durch die deutlich geringere Akkumulation von Sphingolipiden aufgrund der oben beschriebenen Kompensationsmechanismen in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen erklären.



**Abbildung 46: Schematische Darstellung der Lipidakkumulation und -sekretion in *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäusen.** Der hepatozytenspezifische *Sgp1*-Knockout verursacht einen Rückstau zahlreicher Sphingolipide. Sphingosin kann durch die dominante Ceramidsynthese CERS2 in sehr langkettige Ceramide umgewandelt, welche ins Blut abgegeben und von anderen Zellen verstoffwechselt werden können. S1P und Glucosylceramide hingegen werden über die Galle ausgeschieden. Die erhöhte Expression des LDLR führt zu einer erhöhten LDL-Aufnahme und somit möglicherweise zu erhöhten Cholesterinspiegeln in der Leber. CERS2, Ceramidsynthase 2; GlcCer, Glucosylceramide; LDL, *low density lipoprotein*, LDLR- LDL-Rezeptor; S1P, Sphingosin-1-Phosphat.

In weiteren Untersuchungen sollten die Auswirkungen einer *Sgp1*-Defizienz an Fibroblasten untersucht werden. Hierzu standen embryonale Fibroblasten aus *Sgp1*-Knockoutmäusen zur Verfügung (*Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs). In einer Kooperation mit Dr. Janecke von der Universität Innsbruck standen außerdem humane Fibroblasten eines SPLIS-Patienten zur Verfügung.

An *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs war zuvor eine gestörte Calciumhomöostase festgestellt worden, welche sich durch eine erhöhte zytosolische Calciumkonzentration und vermehrte Calciumspeicherung im Endoplasmatischen Retikulum und in Lysosomen auszeichnete. Die Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA) trägt an Fibroblasten entscheidend zur Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration bei. Ihre Expression auf Proteinebene war jedoch in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs nicht verändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch eine Immunfärbung erstmals festgestellt, dass die PMCA in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs nicht vollständig an der Plasmamembran lokalisiert war. Dies könnte der Grund für die erhöhte zytosolische Calciumkonzentration in den Zellen sein. Als mögliche Ursache hierfür konnte eine deutlich verminderte Expression von Basigin in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs festgestellt werden. Basigin wurde unter anderem als Untereinheit der PMCA identifiziert, welche essentiell für die korrekte Lokalisierung der PMCA an der Plasmamembran ist. Der Nachweis, dass die verminderte Expression von Basigin zur Dysregulation der Calciumhomöostase in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs beiträgt, steht noch aus. Schließlich konnte mit Hilfe der Seahorse-Technologie in *Sgp1*-defizienten MEFs ein stark verminderter ATP-abhängiger Sauerstoffverbrauch beobachtet werden.

In humanen Fibroblasten mit *Sgp1*-Insuffizienz konnte die in *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs vorliegende Störung der Calciumhomöostase nicht beobachtet werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass einige an der Calciumhomöostase beteiligte Gene, wie die PMCA, auf mRNA-Ebene verändert waren. Wie in den murinen Fibroblasten mit *Sgp1*-Defizienz war die Expression der PMCA auf Proteinebene jedoch unverändert. Die zytosolische Calciumkonzentration sowie die Calciumanstiege nach Stimulation mit Thapsigargin und Glycy-L-Phenylalanin- $\beta$ -Naphthylamid waren unverändert. In *Sgp1*<sup>-/-</sup> MEFs war eine Cholesterinverteilungsstörung beschrieben worden, bei der das zelluläre Cholesterin in Endo-/Lysosomen akkumulierte, wie es auch bei Morbus Niemann-Pick Typ C der Fall ist. In den Fibroblasten des SPLIS-Patienten konnte mittels Filipin-Färbung tatsächlich ebenfalls in etwa der Hälfte der Zellen eine deutliche Cholesterinakkumulation in intrazellulären Vesikeln nachgewiesen werden. Da jedoch nicht alle *Sgp1*-defizienten humanen Fibroblasten diese Cholesterinverteilungsstörung aufwiesen, legt dies Ergebnis nahe, dass neben der *Sgp1*-Defizienz ein zweiter Faktor für das Auftreten dieses Phänotyps nötig ist. Interessanterweise konnte in den Hepatozyten der *Sgp1*<sup>HepKO</sup> Mäuse durch Filipin-Färbung eine subzelluläre Cholesterinverteilungsstörung ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnte ein Export der akkumulierenden Sphingolipide in Hepatozyten und einem Teil der Fibroblasten das Auftreten dieser Störung verhindern.

Insgesamt tragen die Ergebnisse zum besseren Verständnis der molekularen Prozesse bei *Sgp1*-Defizienz in der Leber, Hepatozyten und Fibroblasten bei.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdel-Misih, Sherif R. Z.; Bloomston, Mark (2010): Liver anatomy. In: *The Surgical clinics of North America* 90 (4), S. 643–653. DOI: 10.1016/j.suc.2010.04.017.
- Allende, Maria L.; Bektas, Meryem; Lee, Bridgin G.; Bonifacino, Eliana; Kang, Jiman; Tuymetova, Galina et al. (2011): Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (9), S. 7348–7358. DOI: 10.1074/jbc.M110.171819.
- Alvarez, Sergio E.; Harikumar, Kuzhuvelil B.; Hait, Nitai C.; Allegood, Jeremy; Strub, Graham M.; Kim, Eugene Y. et al. (2010): Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. In: *Nature* 465 (7301), S. 1084–1088. DOI: 10.1038/nature09128.
- An, S.; Bleu, T.; Huang, W.; Hallmark, O. G.; Coughlin, S. R.; Goetzl, E. J. (1997): Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids. In: *FEBS letters* 417 (3), S. 279–282. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01301-x.
- Anekonda, Thimmappa S.; Quinn, Joseph F.; Harris, Christopher; Frahler, Kate; Wadsworth, Teri L.; Woltjer, Randall L. (2011): L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. In: *Neurobiology of disease* 41 (1), S. 62–70. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.08.020.
- Anitschkow, Nikolai Nikolajewitsch; Chaladow, S. (1913): Über experimentelle Cholesterinsteatose und Über experimentelle Cholesterinsteatose und ihre Bedeutung für die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. In: *Zentralbl. Allg. Pathol.* (24), S. 1–9.
- Antebi, A.; Fink, G. R. (1992): The yeast Ca<sup>2+</sup>-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. In: *Molecular biology of the cell* 3 (6), S. 633–654. DOI: 10.1091/mbc.3.6.633.
- Aoki, Shinya; Yatomi, Yutaka; Ohta, Masato; Osada, Makoto; Kazama, Fuminori; Satoh, Kaneo et al. (2005): Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. In: *Journal of biochemistry* 138 (1), S. 47–55. DOI: 10.1093/jb/mvi100.
- Atkinson, Derek; Nikodinovic Glumac, Jelena; Asselbergh, Bob; Ermanoska, Biljana; Blocquel, David; Steiner, Regula et al. (2017): Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency causes Charcot-Marie-Tooth neuropathy. In: *Neurology* 88 (6), S. 533–542. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003595.
- Bamborschke, Daniel; Pergande, Matthias; Becker, Kerstin; Koerber, Friederike; Dötsch, Jörg; Vierzig, Anne et al. (2018): A novel mutation in sphingosine-1-phosphate lyase causing congenital brain malformation. In: *Brain & development* 40 (6), S. 480–483. DOI: 10.1016/j.braindev.2018.02.008.
- Bandhuvula, Padmavathi; Saba, Julie D. (2007): Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. In: *Trends in molecular medicine* 13 (5), S. 210–217. DOI: 10.1016/j.molmed.2007.03.005.
- Bektas, Meryem; Allende, Maria Laura; Lee, Bridgin G.; Chen, WeiPing; Amar, Marcelo J.; Remaley, Alan T. et al. (2010): Sphingosine 1-phosphate lyase deficiency disrupts lipid homeostasis in liver. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (14), S. 10880–10889. DOI: 10.1074/jbc.M109.081489.

- Ben Saad, Amel; Bruneau, Alix; Mareux, Elodie; Lapalus, Martine; Delaunay, Jean-Louis; Gonzales, Emmanuel et al. (2021): Molecular Regulation of Canalicular ABC Transporters. In: *International journal of molecular sciences* 22 (4). DOI: 10.3390/ijms22042113.
- Ben-David, Oshrit; Futerman, Anthony H. (2010): The role of the ceramide acyl chain length in neurodegeneration: involvement of ceramide synthases. In: *Neuromolecular medicine* 12 (4), S. 341–350. DOI: 10.1007/s12017-010-8114-x.
- Berridge, M. J. (1984): Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. In: *The Biochemical journal* 220 (2), S. 345–360. DOI: 10.1042/bj2200345.
- Blouin, A.; Bolender, R. P.; Weibel, E. R. (1977): Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. In: *The Journal of cell biology* 72 (2), S. 441–455. DOI: 10.1083/jcb.72.2.441.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brady, R. O.; Kanfer, J. N.; Mock, M. B.; Fredrickson, D. S. (1966): The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (2), S. 366–369. DOI: 10.1073/pnas.55.2.366.
- Brady, Roscoe O.; Kanfer, Julian N.; Shapiro, David (1965): The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. In: *Biochemical and biophysical research communications* (18), S. 221–225. DOI: 10.1016/0006-291x(65)90743-6.
- Bright, Richard (1831): Reports of Medical Cases, Selected with a View of Illustrating the Symptoms and Cure of Diseases, by a Reference to Morbid Anatomy. In: *The Medico-chirurgical review* 15 (30), S. 289–330.
- Brini, Marisa; Carafoli, Ernesto (2011): The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a004168.
- Brinkmann, Volker; Davis, Michael D.; Heise, Christopher E.; Albert, Rainer; Cottens, Sylvain; Hof, Robert et al. (2002): The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (24), S. 21453–21457. DOI: 10.1074/jbc.C200176200.
- Brown, M. S.; Faust, J. R.; Goldstein, J. L.; Kaneko, I.; Endo, A. (1978): Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. In: *The Journal of biological chemistry* 253 (4), S. 1121–1128.
- Brown, M. S.; Ho, Y. K.; Goldstein, J. L. (1976): The low-density lipoprotein pathway in human fibroblasts: relation between cell surface receptor binding and endocytosis of low-density lipoprotein. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 275, S. 244–257. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1976.tb43358.x.
- Bucher, N. L.; Overath, P.; Lynen, F. (1960): beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. In: *Biochimica et biophysica acta* 40, S. 491–501. DOI: 10.1016/0006-3002(60)91390-1.

- Bultynck, G.; Sienaert, I.; Parys, J. B.; Callewaert, G.; Smedt, H. de; Boens, N. et al. (2003): Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445 (6), S. 629–642. DOI: 10.1007/s00424-002-0971-1.
- Carriere, R. (1969): The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. In: *International review of cytology* 25, S. 201–277. DOI: 10.1016/s0074-7696(08)60204-1.
- Carstea, E. D.; Morris, J. A.; Coleman, K. G.; Loftus, S. K.; Zhang, D.; Cummings, C. et al. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. In: *Science (New York, N.Y.)* 277 (5323), S. 228–231. DOI: 10.1126/science.277.5323.228.
- Cartier, Andreane; Hla, Timothy (2019): Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. In: *Science (New York, N.Y.)* 366 (6463). DOI: 10.1126/science.aar5551.
- Cellini, Barbara; Montioli, Riccardo; Oppici, Elisa; Astegno, Alessandra; Voltattorni, Carla Borri (2014): The chaperone role of the pyridoxal 5'-phosphate and its implications for rare diseases involving B6-dependent enzymes. In: *Clinical biochemistry* 47 (3), S. 158–165. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.021.
- Channon, H. J. (1925): Cholesterol Synthesis in the Animal Body. In: *The Biochemical journal* 19 (3), S. 424–432. DOI: 10.1042/bj0190424.
- Charruyer, Alexandra; Grazide, Solène; Bezombes, Christine; Müller, Sabina; Laurent, Guy; Jaffrézou, Jean-Pierre (2005): UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (19), S. 19196–19204. DOI: 10.1074/jbc.M412867200.
- Chatterjee, S.; Ghosh, N. (1989): Neutral sphingomyelinase from human urine. Purification and preparation of monospecific antibodies. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (21), S. 12554–12561.
- Choi, Youn-Jeong; Saba, Julie D. (2019): Sphingosine phosphate lyase insufficiency syndrome (SPLIS): A novel inborn error of sphingolipid metabolism. In: *Advances in biological regulation* 71, S. 128–140. DOI: 10.1016/j.jbior.2018.09.004.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical biochemistry* 162 (1), S. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Christoffersen, Christina; Obinata, Hideru; Kumaraswamy, Sunil B.; Galvani, Sylvain; Ahnström, Josefin; Sevana, Madhumati et al. (2011): Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (23), S. 9613–9618. DOI: 10.1073/pnas.1103187108.
- Chun, Jerold; Goetzl, Edward J.; Hla, Timothy; Igarashi, Yasuyuki; Lynch, Kevin R.; Moolenaar, Wouter et al. (2002): International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. In: *Pharmacological reviews* 54 (2), S. 265–269. DOI: 10.1124/pr.54.2.265.
- Claas, Ralf Frederik; ter Braak, Michael; Hegen, Bianca; Hardel, Verena; Angioni, Carlo; Schmidt, Helmut et al. (2010): Enhanced Ca<sup>2+</sup> storage in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. In: *Cellular signalling* 22 (3), S. 476–483. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.11.001.

- Colié, Sandra; van Veldhoven, Paul P.; Kedjouar, Blandine; Bedia, Carmen; Albinet, Virginie; Sorli, Sonia-Caroline et al. (2009): Disruption of sphingosine 1-phosphate lyase confers resistance to chemotherapy and promotes oncogenesis through Bcl-2/Bcl-xL upregulation. In: *Cancer research* 69 (24), S. 9346–9353. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2198.
- Cooper, J. A.; Church, H. J.; Wu, H. Y. (2020): Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol: Further insights into the performance of this oxysterol in diagnosis of Niemann-Pick disease type C. In: *Molecular genetics and metabolism* 130 (1), S. 77–86. DOI: 10.1016/j.ymgme.2020.02.008.
- Cutler, R. G.; Haughey, N. J.; Tammara, A.; McArthur, J. C.; Nath, A.; Reid, R. et al. (2004a): Dysregulation of sphingolipid and sterol metabolism by ApoE4 in HIV dementia. In: *Neurology* 63 (4), S. 626–630. DOI: 10.1212/01.wnl.0000134662.19883.06.
- Cutler, Roy G.; Kelly, Jeremiah; Storie, Kristin; Pedersen, Ward A.; Tammara, Anita; Hatanpaa, Kimmo et al. (2004b): Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7), S. 2070–2075. DOI: 10.1073/pnas.0305799101.
- Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P. G.; Coso, O. A.; Gutkind, S.; Spiegel, S. (1996): Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. In: *Nature* 381 (6585), S. 800–803. DOI: 10.1038/381800a0.
- Degagné, Emilie; Pandurangan, Ashok; Bandhuvula, Padmavathi; Kumar, Ashok; Eltanawy, Abeer; Zhang, Meng et al. (2014): Sphingosine-1-phosphate lyase downregulation promotes colon carcinogenesis through STAT3-activated microRNAs. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (12), S. 5368–5384. DOI: 10.1172/JCI74188.
- Dobrowsky, R. T.; Hannun, Y. A. (1992): Ceramide stimulates a cytosolic protein phosphatase. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (8), S. 5048–5051.
- Dolphin, Annette C. (2018): Voltage-gated calcium channels: their discovery, function and importance as drug targets. In: *Brain and neuroscience advances* 2. DOI: 10.1177/2398212818794805.
- Duckworth, W. C.; Hamel, F. G.; Peavy, D. E. (1988): Hepatic metabolism of insulin. In: *The American journal of medicine* 85 (5A), S. 71–76. DOI: 10.1016/0002-9343(88)90399-3.
- Dunham, E. T.; Glynn, I. M. (1961): Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. In: *The Journal of physiology* 156, S. 274–293. DOI: 10.1113/jphysiol.1961.sp006675.
- Dunn, H. G.; Lake, B. D.; Dolman, C. L.; Wilson, J. (1969): The neuropathy of Krabbe's infantile cerebral sclerosis (globoid cell leucodystrophy). In: *Brain* 92 (2), S. 329–344. DOI: 10.1093/brain/92.2.329.
- Dusendschon, A. (1946): Deux cas familiaux de maladie de Niemann-Pick chez adulte. In: *Thesis, Medizinische Fakultät*.
- Ebashi, S.; Lipmann, F. (1962): ADENOSINE TRIPHOSPHATE-LINKED CONCENTRATION OF CALCIUM IONS IN A PARTICULATE FRACTION OF RABBIT MUSCLE. In: *The Journal of cell biology* 14 (3), S. 389–400. DOI: 10.1083/jcb.14.3.389.
- Edsall, L. C.; Spiegel, S. (1999): Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. In: *Analytical biochemistry* 272 (1), S. 80–86. DOI: 10.1006/abio.1999.4157.

- Elleder, M.; Jirtsek, A. (1983): International symposium on Niemann-Pick disease. Congress report European Journal of Paediatrics (140), S. 90–91.
- Ellis, H. (2009): On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Supra-renal Capsules. In: *BMJ* 339 (oct14 2), b4183-b4183. DOI: 10.1136/bmj.b4183.
- Endo, A.; Kuroda, M.; Tanzawa, K. (1976): Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. In: *FEBS letters* 72 (2), S. 323–326. DOI: 10.1016/0014-5793(76)80996-9.
- Farber, S. (1952): A lipid metabolic disorder: disseminated lipogranulomatosis; a syndrome with similarity to, and important difference from, Niemann-Pick and Hand-Schüller-Christian disease. In: *A.M.A. American journal of diseases of children* 84 (4), S. 499–500.
- Ferreira, Carlos R.; Gahl, William A. (2017): Lysosomal storage diseases. In: *Translational science of rare diseases* 2 (1-2), S. 1–71. DOI: 10.3233/TRD-160005.
- Fox, A. P.; Nowycky, M. C.; Tsien, R. W. (1987): Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. In: *The Journal of physiology* 394, S. 173–200. DOI: 10.1113/jphysiol.1987.sp016865.
- Fyrst, Henrik; Saba, Julie D. (2008): Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: sphingolipid metabolism takes flight. In: *Biochimica et biophysica acta* 1781 (9), S. 448–458. DOI: 10.1016/j.bbailip.2008.05.005.
- Gatt, S.; Dinur, T.; Kopolovic, J. (1978): Niemann Pick disease: presence of the magnesium-dependent sphingomyelinase in brain of the infantile form of the disease. In: *Journal of neurochemistry* 31 (2), S. 547–550. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1978.tb02671.x.
- Genter, Mary Beth; van Veldhoven, Paul P.; Jegga, Anil G.; Sakthivel, Bhuvana; Kong, Sue; Stanley, Kristin et al. (2003): Microarray-based discovery of highly expressed olfactory mucosal genes: potential roles in the various functions of the olfactory system. In: *Physiological genomics* 16 (1), S. 67–81. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00117.2003.
- Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1990): Regulation of the mevalonate pathway. In: *Nature* 343 (6257), S. 425–430. DOI: 10.1038/343425a0.
- Goldstein, Joseph L.; Brown, Michael S. (2015): A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. In: *Cell* 161 (1), S. 161–172. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.036.
- Gordon, T.; Castelli, W. P.; Hjortland, M. C.; Kannel, W. B.; Dawber, T. R. (1977): High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. In: *The American journal of medicine* 62 (5), S. 707–714. DOI: 10.1016/0002-9343(77)90874-9.
- Grösch, Sabine; Schiffmann, Susanne; Geisslinger, Gerd (2012): Chain length-specific properties of ceramides. In: *Progress in lipid research* 51 (1), S. 50–62. DOI: 10.1016/j.plipres.2011.11.001.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- Guillas, I.; Kirchman, P. A.; Chuard, R.; Pfefferli, M.; Jiang, J. C.; Jazwinski, S. M.; Conzelmann, A. (2001): C26-CoA-dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces*

- cerevisiae is operated by Lag1p and Lac1p. In: *The EMBO journal* 20 (11), S. 2655–2665. DOI: 10.1093/emboj/20.11.2655.
- Hagen-Euteneuer, Nadine; Alam, Shah; Rindsfuesser, Hannah; Meyer Zu Heringdorf, Dagmar; van Echten-Deckert, Gerhild (2020): S1P-lyase deficiency uncouples ganglioside formation - Potential contribution to tumorigenic capacity. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* 1865 (8), S. 158708. DOI: 10.1016/j.bbali.2020.158708.
- Hait, Nitai C.; Allegood, Jeremy; Maceyka, Michael; Strub, Graham M.; Harikumar, Kuzhuvellil B.; Singh, Sandeep K. et al. (2009): Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945), S. 1254–1257. DOI: 10.1126/science.1176709.
- Hanada, Kentaro (2003): Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1632 (1-3), S. 16–30. DOI: 10.1016/s1388-1981(03)00059-3.
- Hannun, Y. A. (1996): Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5294), S. 1855–1859. DOI: 10.1126/science.274.5294.1855.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2008): Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 139–150. DOI: 10.1038/nrm2329.
- Hannun, Yusuf A.; Obeid, Lina M. (2018): Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (3), S. 175–191. DOI: 10.1038/nrm.2017.107.
- Hartmann, Daniela; Lucks, Jessica; Fuchs, Sina; Schiffmann, Susanne; Schreiber, Yannick; Ferreirós, Nerea et al. (2012): Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 44 (4), S. 620–628. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.12.019.
- Higgins, M. E.; Davies, J. P.; Chen, F. W.; Ioannou, Y. A. (1999): Niemann-Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. In: *Molecular genetics and metabolism* 68 (1), S. 1–13. DOI: 10.1006/mgme.1999.2882.
- Hla, T.; Maciag, T. (1990): An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (16), S. 9308–9313.
- Hoefele, Julia; Beck, Bodo B.; Weber, Lutz T.; Brinkkötter, Paul (2018): Steroid-resistentes nephrotisches Syndrom. In: *medgen* 30 (4), S. 410–421. DOI: 10.1007/s11825-018-0215-1.
- Huang, Hsien-Da; Lee, Tzong-Yi; Tzeng, Shih-Wei; Horng, Jorng-Tzong (2005): KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. In: *Nucleic acids research* 33 (Web Server issue), W226-9. DOI: 10.1093/nar/gki471.
- Huwiler, A.; Johansen, B.; Skarstad, A.; Pfeilschifter, J. (2001): Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (1), S. 7–9. DOI: 10.1096/fj.00-0370fje.

- Huwiler, Andrea; Zangemeister-Wittke, Uwe (2018): The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. In: *Pharmacology & therapeutics* 185, S. 34–49. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.11.001.
- Ihlefeld, Katja (2013): Veränderte Histonacetylierung in embryonalen Fibroblasten aus Sphingosin-1-phosphat-Lyase-defizienten Mäusen.
- Ihlefeld, Katja; Claas, Ralf Frederik; Koch, Alexander; Pfeilschifter, Josef M.; Meyer Zu Heringdorf, Dagmar (2012): Evidence for a link between histone deacetylation and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. In: *The Biochemical journal* 447 (3), S. 457–464. DOI: 10.1042/BJ20120811.
- Ihlefeld, Katja; Vienken, Hans; Claas, Ralf Frederik; Blankenbach, Kira; Rudowski, Agnes; ter Braak, Michael et al. (2015): Upregulation of ABC transporters contributes to chemoresistance of sphingosine 1-phosphate lyase-deficient fibroblasts. In: *Journal of lipid research* 56 (1), S. 60–69. DOI: 10.1194/jlr.M052761.
- Ikeda, Mika; Kihara, Akio; Igarashi, Yasuyuki (2004): Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. In: *Biochemical and biophysical research communications* 325 (1), S. 338–343. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.10.036.
- Im, Dong-Soon (2010): Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors. In: *Acta pharmacologica Sinica* 31 (9), S. 1213–1222. DOI: 10.1038/aps.2010.135.
- Iqbal, Jahangir; Walsh, Meghan T.; Hammad, Samar M.; Hussain, M. Mahmood (2017): Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 28 (7), S. 506–518. DOI: 10.1016/j.tem.2017.03.005.
- Ito, Kiyoharu; Anada, Yoshihiro; Tani, Motohiro; Ikeda, Mika; Sano, Takamitsu; Kihara, Akio; Igarashi, Yasuyuki (2007): Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 357 (1), S. 212–217. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.03.123.
- Ito, T.; Nemoto, M. (1952): Über die Kupfferschen Sternzellen und die Fettspeicherungszellen (fat storing cells) in der Blutkapillarenwand der menschlichen Leber. In: *Okajimas folia anatomica Japonica* 24 (4), S. 243–258. DOI: 10.2535/ofaj1936.24.4\_243.
- Janecke, Andreas R.; Xu, Ruijuan; Steichen-Gersdorf, Elisabeth; Waldegger, Siegfried; Entenmann, Andreas; Giner, Thomas et al. (2017): Deficiency of the sphingosine-1-phosphate lyase SGPL1 is associated with congenital nephrotic syndrome and congenital adrenal calcifications. In: *Human mutation* 38 (4), S. 365–372. DOI: 10.1002/humu.23192.
- Jetter, Alexander; Kullak-Ublick, Gerd A. (2020): Drugs and hepatic transporters: A review. In: *Pharmacological research* 154, S. 104234. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.04.018.
- Kanfer, Julian N.; Young, Oscar M.; Shapiro, David; Brady, Roscoe O. (1965): The Metabolism of Sphingomyelin. Purification And Properties Of A Sphingomyelin-Cleaving Enzyme From Rat Liver Tissue. In: *The Journal of biological chemistry* 241 (5), S. 1081–1084.
- Kark, R. M.; Pirani, C. L.; Pollak, V. E.; Muehrcke, R. C.; Blainey, J. D. (1958): The nephrotic syndrome in adults: a common disorder with many causes. In: *Annals of internal medicine* 49 (4), S. 751–754. DOI: 10.7326/0003-4819-49-4-751.

- Kawahara, Atsuo; Nishi, Tsuyoshi; Hisano, Yu; Fukui, Hajime; Yamaguchi, Akihito; Mochizuki, Naoki (2009): The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. In: *Science (New York, N.Y.)* 323 (5913), S. 524–527. DOI: 10.1126/science.1167449.
- Keele, Kenneth D. (1969): Addison on the 'Supra-Renal Capsules' - On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Supra-renal Capsules, by Thomas Addison, first published in London, 1855. Reprinted in facsimile, 1968, by Dawsons of Pall Mall. In: *Med. Hist.* 13 (2), S. 195–202. DOI: 10.1017/S0025727300014290.
- Kharel, Yugesh; Huang, Tao; Salamon, Anita; Harris, Thurl E.; Santos, Webster L.; Lynch, Kevin R. (2020): Mechanism of sphingosine 1-phosphate clearance from blood. In: *The Biochemical journal* 477 (5), S. 925–935. DOI: 10.1042/BCJ20190730.
- Kihara, Akio; Ikeda, Mika; Kariya, Yuki; Lee, Eun-Young; Lee, Yong-Moon; Igarashi, Yasuyuki (2003): Sphingosine-1-phosphate lyase is involved in the differentiation of F9 embryonal carcinoma cells to primitive endoderm. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 14578–14585. DOI: 10.1074/jbc.M211416200.
- Klenk, E. (1934): Über die Natur der Phosphatide der Milz bei der Niemann-Pickschen Krankheit. [10. Mitteilung über Phosphatide.]. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 229 (4-6), S. 151–156. DOI: 10.1515/bchm2.1934.229.4-6.151.
- Krabbe, Knud (1916): A NEW FAMILIAL, INFANTILE FORM OF DIFFUSE BRAIN-SCLEROSIS. In: *Brain* 39 (1-2), S. 74–114. DOI: 10.1093/brain/39.1-2.74.
- Krebs, Joachim (2017): The Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA): Regulation of Cytosolic Ca<sup>2+</sup>, Genetic Diversities and Its Role in Sub-plasma Membrane Microdomains. In: *Advances in experimental medicine and biology* 981, S. 3–21. DOI: 10.1007/978-3-319-55858-5\_1.
- Krebs, Joachim; Agellon, Luis B.; Michalak, Marek (2015): Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. In: *Biochemical and biophysical research communications* 460 (1), S. 114–121. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.004.
- Kroeze, Wesley K.; Sassano, Maria F.; Huang, Xi-Ping; Lansu, Katherine; McCorvy, John D.; Giguère, Patrick M. et al. (2015): PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable human GPCRome. In: *Nature structural & molecular biology* 22 (5), S. 362–369. DOI: 10.1038/nsmb.3014.
- Kruth, H. S.; Comly, M. E.; Butler, J. D.; Vanier, M. T.; Fink, J. K.; Wenger, D. A. et al. (1986): Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (35), S. 16769–16774.
- Kühlbrandt, Werner (2004): Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 282–295. DOI: 10.1038/nrm1354.
- Kupffer, C. (1876): Ueber Sternzellen der Leber. In: *Archiv f. mikrosk. Anat.* 12 (1), S. 353–358. DOI: 10.1007/BF02933897.
- Kurano, Makoto; Tsukamoto, Kazuhisa; Hara, Masumi; Ohkawa, Ryunosuke; Ikeda, Hitoshi; Yatomi, Yutaka (2015): LDL receptor and ApoE are involved in the clearance of ApoM-

- associated sphingosine 1-phosphate. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (4), S. 2477–2488. DOI: 10.1074/jbc.M114.596445.
- Kurano, Makoto; Tsukamoto, Kazuhisa; Ohkawa, Ryunosuke; Hara, Masumi; Iino, Junko; Kageyama, Yuko et al. (2013): Liver involvement in sphingosine 1-phosphate dynamism revealed by adenoviral hepatic overexpression of apolipoprotein M. In: *Atherosclerosis* 229 (1), S. 102–109. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.024.
- Lachmann, Robin H.; te Vrugte, Danielle; Lloyd-Evans, Emyr; Reinkensmeier, Gabriele; Sillence, Daniel J.; Fernandez-Guillen, Luisa et al. (2004): Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann-Pick disease type C. In: *Neurobiology of disease* 16 (3), S. 654–658. DOI: 10.1016/j.nbd.2004.05.002.
- Lamri, Amel; Pigeyre, Marie; Garver, William S.; Meyre, David (2018): The Extending Spectrum of NPC1-Related Human Disorders: From Niemann-Pick C1 Disease to Obesity. In: *Endocrine reviews* 39 (2), S. 192–220. DOI: 10.1210/er.2017-00176.
- Laviad, Elad L.; Albee, Lee; Pankova-Kholmyansky, Irene; Epstein, Sharon; Park, Hyejung; Merrill, Alfred H.; Futerman, Anthony H. (2008): Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (9), S. 5677–5684. DOI: 10.1074/jbc.M707386200.
- Law, Brittany A.; Liao, Xianghai; Moore, Kelsey S.; Southard, Abigail; Roddy, Patrick; Ji, Ruiping et al. (2018): Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (3), S. 1403–1416. DOI: 10.1096/fj.201700300R.
- Lee, M. J.; van Brocklyn, J. R.; Thangada, S.; Liu, C. H.; Hand, A. R.; Menzeleev, R. et al. (1998): Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. In: *Science (New York, N.Y.)* 279 (5356), S. 1552–1555. DOI: 10.1126/science.279.5356.1552.
- Lee-Rueckert, Miriam; Escola-Gil, Joan Carles; Kovanen, Petri T. (2016): HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1861 (7), S. 566–583. DOI: 10.1016/j.bbali.2016.03.004.
- Levy, Michal; Futerman, Anthony H. (2010): Mammalian ceramide synthases. In: *IUBMB life* 62 (5), S. 347–356. DOI: 10.1002/iub.319.
- Li, Jian; Pfeffer, Suzanne R. (2016): Lysosomal membrane glycoproteins bind cholesterol and contribute to lysosomal cholesterol export. In: *eLife* 5. DOI: 10.7554/eLife.21635.
- Li, Xiang; Gulbins, Erich; Zhang, Yang (2012): Oxidative stress triggers Ca-dependent lysosome trafficking and activation of acid sphingomyelinase. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 30 (4), S. 815–826. DOI: 10.1159/000341460.
- Linhares, Natália Duarte; Arantes, Rodrigo Rezende; Araujo, Stanley Almeida; Pena, Sergio D. J. (2018): Nephrotic syndrome and adrenal insufficiency caused by a variant in SGPL1. In: *Clinical kidney journal* 11 (4), S. 462–467. DOI: 10.1093/ckj/sfx130.
- Linton, MacRae F.; Yancey, Patricia G.; Davies, Sean S.; Jerome, W. Gray; Linton, Edward F.; Song, Wenliang L. et al. (2000): Endotext. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis.

- Liscum, L.; Faust, J. R. (1987): Low density lipoprotein (LDL)-mediated suppression of cholesterol synthesis and LDL uptake is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (35), S. 17002–17008.
- Liu, Qiang; Zhou, Shuya; Fan, Changfa; Huang, Weijin; Li, Qianqian; Liu, Susu et al. (2017): Biodistribution and residence time of adenovector serotype 5 in normal and immunodeficient mice and rats detected with bioluminescent imaging. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3597. DOI: 10.1038/s41598-017-03852-0.
- Lloyd-Evans, Emyr; Morgan, Anthony J.; He, Xingxuan; Smith, David A.; Elliot-Smith, Elena; Sillence, Daniel J. et al. (2008): Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. In: *Nature medicine* 14 (11), S. 1247–1255. DOI: 10.1038/nm.1876.
- Lovric, Svjetlana; Goncalves, Sara; Gee, Heon Yung; Oskouian, Babak; Srinivas, Honnappa; Choi, Won-Il et al. (2017): Mutations in sphingosine-1-phosphate lyase cause nephrosis with ichthyosis and adrenal insufficiency. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (3), S. 912–928. DOI: 10.1172/JCI89626.
- Luo, Jie; Jiang, Luyi; Yang, Hongyuan; Song, Bao-Liang (2017): Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: A story that never ends. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 18 (4), S. 209–217. DOI: 10.1111/tra.12471.
- Luo, Jie; Yang, Hongyuan; Song, Bao-Liang (2020): Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 21 (4), S. 225–245. DOI: 10.1007/s11883-014-0424-2.
- Luu, Winnie; Sharpe, Laura J.; Gelissen, Ingrid C.; Brown, Andrew J. (2013): The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis. In: *IUBMB life* 65 (8), S. 675–684. DOI: 10.1002/iub.1182.
- Lynen, F. (1965): Der Weg von der „aktivierten Essigsäure“ zu den Terpenen und Fettsäuren. Nobel-Vortrag am 11. Dezember 1964. In: *Angewandte Chemie* 77 (21), S. 929–944. DOI: 10.1002/ange.19650772102.
- Maceyka, Michael; Harikumar, Kuzhuvilil B.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2012): Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. In: *Trends in cell biology* 22 (1), S. 50–60. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.003.
- Maharaj, A.; Williams, J.; Bradshaw, T.; Güran, T.; Braslavsky, D.; Casas, J. et al. (2020a): Sphingosine-1-phosphate lyase (SGPL1) deficiency is associated with mitochondrial dysfunction. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 202, S. 105730. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105730.
- Maharaj, Avinaash; Theodorou, Demetria; Banerjee, Indraneel Indi; Metherell, Louise A.; Prasad, Rathi; Wallace, Dean (2020b): A Sphingosine-1-Phosphate Lyase Mutation Associated With Congenital Nephrotic Syndrome and Multiple Endocrinopathy. In: *Frontiers in pediatrics* 8, S. 151. DOI: 10.3389/fped.2020.00151.
- Mahmood, Syed S.; Levy, Daniel; Vasan, Ramachandran S.; Wang, Thomas J. (2014): The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. In: *Lancet (London, England)* 383 (9921), S. 999–1008. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61752-3.

- Marsolais, David; Rosen, Hugh (2009): Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. In: *Nature reviews. Drug discovery* 8 (4), S. 297–307. DOI: 10.1038/nrd2356.
- Martin-Grace, Julie; Dineen, Rosemary; Sherlock, Mark; Thompson, Christopher J. (2020): Adrenal insufficiency: Physiology, clinical presentation and diagnostic challenges. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 505, S. 78–91. DOI: 10.1016/j.cca.2020.01.029.
- McGovern, M. M.; Aron, A.; Brodie, S. E.; Desnick, R. J.; Wasserstein, M. P. (2006): Natural history of Type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. In: *Neurology* 66 (2), S. 228–232. DOI: 10.1212/01.wnl.0000194208.08904.0c.
- Meacci, Elisabetta; Garcia-Gil, Mercedes (2019): S1P/S1P Receptor Signaling in Neuromuscular Disorders. In: *International journal of molecular sciences* 20 (24). DOI: 10.3390/ijms20246364.
- Menche, Nicole (2016): *Biologie Anatomie Physiologie*. 8. Aufl.: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Michel, C.; van Echten-Deckert, G.; Rother, J.; Sandhoff, K.; Wang, E.; Merrill, A. H. (1997): Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (36), S. 22432–22437. DOI: 10.1074/jbc.272.36.22432.
- Mikami, A.; Imoto, K.; Tanabe, T.; Niidome, T.; Mori, Y.; Takeshima, H. et al. (1989): Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. In: *Nature* 340 (6230), S. 230–233. DOI: 10.1038/340230a0.
- Mikoshiba, Katsuhiko (2015): Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. In: *Advances in biological regulation* 57, S. 217–227. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.10.001.
- Mitra, Poulami; Oskeritzian, Carole A.; Payne, Shawn G.; Beaven, Michael A.; Milstien, Sheldon; Spiegel, Sarah (2006): Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44), S. 16394–16399. DOI: 10.1073/pnas.0603734103.
- Moghadam, Soheila Hoseinzadeh; Tavasoli, Ali Reza; Modaresi, Mohammadreza; Ziaee, Vahid (2019): Farber disease: report of three cases with joint involvement mimicking juvenile idiopathic arthritis. In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 19 (4), S. 521–525.
- Mori, Y.; Friedrich, T.; Kim, M. S.; Mikami, A.; Nakai, J.; Ruth, P. et al. (1991): Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. In: *Nature* 350 (6317), S. 398–402. DOI: 10.1038/350398a0.
- Mullen, Thomas D.; Obeid, Lina M. (2012): Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12 (4), S. 340–363. DOI: 10.2174/187152012800228661.
- Münzer, Franz Theodor (1923): Über die Zweikernigkeit der Leberzellen. In: *Archiv f mikr Anat u Entwicklungsmechanik* 98 (1-2), S. 249–282. DOI: 10.1007/BF02109231.
- Murata, N.; Sato, K.; Kon, J.; Tomura, H.; Yanagita, M.; Kuwabara, A. et al. (2000): Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. In: *The Biochemical journal* 352 Pt 3, S. 809–815.

- Naureckiene, S.; Sleat, D. E.; Lackland, H.; Fensom, A.; Vanier, M. T.; Wattiaux, R. et al. (2000): Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5500), S. 2298–2301. DOI: 10.1126/science.290.5500.2298.
- Nelson, Jessica Kristine; Sorrentino, Vincenzo; Avagliano Trezza, Rossella; Heride, Claire; Urbe, Sylvie; Distel, Ben; Zelcer, Noam (2016): The Deubiquitylase USP2 Regulates the LDLR Pathway by Counteracting the E3-Ubiquitin Ligase IDOL. In: *Circulation research* 118 (3), S. 410–419. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307298.
- Newcomb, Benjamin; Rhein, Cosima; Mileva, Izolda; Ahmad, Rasheed; Clarke, Christopher J.; Snider, Justin et al. (2018): Identification of an acid sphingomyelinase ceramide kinase pathway in the regulation of the chemokine CCL5. In: *Journal of lipid research* 59 (7), S. 1219–1229. DOI: 10.1194/jlr.M084202.
- Newton, Jason; Lima, Santiago; Maceyka, Michael; Spiegel, Sarah (2015): Revisiting the sphingolipid rheostat: Evolving concepts in cancer therapy. In: *Experimental cell research* 333 (2), S. 195–200. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.02.025.
- Nilsson, O.; Månsson, J. E.; Håkansson, G.; Svennerholm, L. (1982): The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from the three major types of Gaucher's disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 712 (3), S. 453–463. DOI: 10.1016/0005-2760(82)90272-7.
- Nishizuka, Y. (1984): Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 225 (4668), S. 1365–1370. DOI: 10.1126/science.6147898.
- Norman, A. W.; Demel, R. A.; Kruyff, B. de; van Geurts Kessel, W. S.; van Deenen, L. L. (1972): Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol. In: *Biochimica et biophysica acta* 290 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/0005-2736(72)90046-6.
- Nowycky, M. C.; Fox, A. P.; Tsien, R. W. (1985): Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. In: *Nature* 316 (6027), S. 440–443. DOI: 10.1038/316440a0.
- Obeid, L. M.; Linardic, C. M.; Karolak, L. A.; Hannun, Y. A. (1993): Programmed cell death induced by ceramide. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5102), S. 1769–1771. DOI: 10.1126/science.8456305.
- Oertel, Stephanie; Scholich, Klaus; Weigert, Andreas; Thomas, Dominique; Schmetzner, Julia; Trautmann, Sandra et al. (2017): Ceramide synthase 2 deficiency aggravates AOM-DSS-induced colitis in mice: role of colon barrier integrity. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (16), S. 3039–3055. DOI: 10.1007/s00018-017-2518-9.
- Ogretmen, Besim; Hannun, Yusuf A. (2004): Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (8), S. 604–616. DOI: 10.1038/nrc1411.
- Okazaki, T.; Bielawska, A.; Bell, R. M.; Hannun, Y. A. (1990): Role of ceramide as a lipid mediator of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced HL-60 cell differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (26), S. 15823–15831.
- Olivera, A.; Spiegel, S. (1993): Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. In: *Nature* 365 (6446), S. 557–560. DOI: 10.1038/365557a0.

- Oskouian, Babak; Sooriyakumaran, Prathap; Borowsky, Alexander D.; Crans, Angelina; Dillard-Telm, Lisa; Tam, Yuen Yee et al. (2006): Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46), S. 17384–17389. DOI: 10.1073/pnas.0600050103.
- Osman, A. Arnold (1937): Original Papers of Richard Bright on Renal Disease. Edited by A. Arnold Osman. In: *Oxford University Press*, S. 12.
- Panneer Selvam, Shanmugam; Palma, Ryan M. de; Oaks, Joshua J.; Oleinik, Natalia; Peterson, Yuri K.; Stahelin, Robert V. et al. (2015): Binding of the sphingolipid S1P to hTERT stabilizes telomerase at the nuclear periphery by allosterically mimicking protein phosphorylation. In: *Science signaling* 8 (381), ra58. DOI: 10.1126/scisignal.aaa4998.
- Park, Walter D.; O'Brien, John F.; Lundquist, Patrick A.; Kraft, Daniel L.; Vockley, Cate Walsh; Karnes, Pamela S. et al. (2003): Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. In: *Human mutation* 22 (4), S. 313–325. DOI: 10.1002/humu.10255.
- Patterson, Marc C.; Vecchio, Darleen; Prady, Helena; Abel, Larry; Wraith, James E. (2007): Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. In: *The Lancet. Neurology* 6 (9), S. 765–772. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70194-1.
- Patton, J. L.; Lester, R. L. (1991): The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. In: *Journal of bacteriology* 173 (10), S. 3101–3108. DOI: 10.1128/jb.173.10.3101-3108.1991.
- Pedersen, Peter L.; Carafoli, Ernesto (1987a): Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. In: *Trends in biochemical sciences* 12, S. 146–150. DOI: 10.1016/0968-0004(87)90071-5.
- Pedersen, Peter L.; Carafoli, Ernesto (1987b): Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. In: *Trends in biochemical sciences* 12, S. 186–189. DOI: 10.1016/0968-0004(87)90090-9.
- Peest, Ulrike; Sensken, Sven-Christian; Andréani, Paul; Hänel, Petra; van Veldhoven, Paul P.; Gräler, Markus H. (2008): S1P-lyase independent clearance of extracellular sphingosine 1-phosphate after dephosphorylation and cellular uptake. In: *Journal of cellular biochemistry* 104 (3), S. 756–772. DOI: 10.1002/jcb.21665.
- Pentchev, P. G.; Comly, M. E.; Kruth, H. S.; Patel, S.; Proestel, M.; Weintraub, H. (1986): The cholesterol storage disorder of the mutant BALB/c mouse. A primary genetic lesion closely linked to defective esterification of exogenously derived cholesterol and its relationship to human type C Niemann-Pick disease. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (6), S. 2772–2777.
- Pettus, Benjamin J.; Bielawska, Alicja; Subramanian, Preeti; Wijesinghe, Dayanjan S.; Maceyka, Michael; Leslie, Christina C. et al. (2004): Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (12), S. 11320–11326. DOI: 10.1074/jbc.M309262200.
- Pezzuti, Isabela Leite; Silva, Ivani Novato; Albuquerque, Cristiano Túlio Maciel; Duarte, Mariana Guerra; Silva, José Maria Penido (2014): Adrenal insufficiency in association with congenital nephrotic syndrome: a case report. In: *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 27 (5-6), S. 565–567. DOI: 10.1515/jpem-2011-0296.

- Pfändler, U. (1946): La maladie de Niemann-Pick dans le cadre des lipoidoses. In: *Schweizerische medizinische Wochenschrift* (76), S. 1128.
- Pfeifer, Nathan D.; Hardwick, Rhiannon N.; Brouwer, Kim L. R. (2014): Role of hepatic efflux transporters in regulating systemic and hepatocyte exposure to xenobiotics. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 54, S. 509–535. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-140021.
- Pick, Ludwig (1927): Über die lipoidzellige Splenohepatomegalie Typus Niemann-Pick als Stoffwechselerkrankung. In: *Medizinische Klinik* (23), S. 1483–1488.
- Pick, Ludwig (1933): Niemann-Pick's disease and other forms of so-called xanthomatoses. In: *The American journal of medical science* (185), S. 601.
- Pitson, Stuart M. (2011): Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. In: *Trends in biochemical sciences* 36 (2), S. 97–107. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.08.001.
- Platt, F. M.; Neises, G. R.; Dwek, R. A.; Butters, T. D. (1994): N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (11), S. 8362–8365.
- Plitzko, Birte; Loesgen, Sandra (2018): Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR) in Culture Cells for Assessment of the Energy Metabolism. In: *Bio-protocol* 8 (10), e2850. DOI: 10.21769/BioProtoc.2850.
- Postic, C.; Shiota, M.; Niswender, K. D.; Jetton, T. L.; Chen, Y.; Moates, J. M. et al. (1999): Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (1), S. 305–315. DOI: 10.1074/jbc.274.1.305.
- Prasad, Rathi; Hadjidemetriou, Irene; Maharaj, Avinaash; Meimaridou, Eirini; Buonocore, Federica; Saleem, Moin et al. (2017): Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome. In: *The Journal of clinical investigation* 127 (3), S. 942–953. DOI: 10.1172/JCI90171.
- Prensky, A. L.; Ferreira, G.; Carr, S.; Moser, H. W. (1967): Ceramide and Ganglioside Accumulation in Farber's Lipogranulomatosis. In: *Experimental Biology and Medicine* 126 (3), S. 725–728. DOI: 10.3181/00379727-126-32554.
- Rappaport, A. M.; Borowy, Z. J.; Loughheed, W. M.; Lotto, W. N. (1954): Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. In: *The Anatomical record* 119 (1), S. 11–33. DOI: 10.1002/ar.1091190103.
- Reiss, Ulrike; Oskouian, Babak; Zhou, Jianhui; Gupta, Vinita; Sooriyakumaran, Prathap; Kelly, Samuel et al. (2004): Sphingosine-phosphate lyase enhances stress-induced ceramide generation and apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (2), S. 1281–1290. DOI: 10.1074/jbc.M309646200.
- Repa, J. J.; Mangelsdorf, D. J. (2000): The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. In: *Annual review of cell and developmental biology* 16, S. 459–481. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.459.
- Rios, E.; Brum, G. (1987): Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. In: *Nature* 325 (6106), S. 717–720. DOI: 10.1038/325717a0.
- Rosen, Hugh; Stevens, Raymond C.; Hanson, Michael; Roberts, Edward; Oldstone, Michael B. A. (2013): Sphingosine-1-phosphate and its receptors: structure, signaling, and influence.

- In: *Annual review of biochemistry* 82, S. 637–662. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062411-130916.
- Rosenbaum, Daniel M.; Rasmussen, Søren G. F.; Kobilka, Brian K. (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. In: *Nature* 459 (7245), S. 356–363. DOI: 10.1038/nature08144.
- Rui, Liangyou (2014): Energy metabolism in the liver. In: *Comprehensive Physiology* 4 (1), S. 177–197. DOI: 10.1002/cphy.c130024.
- Saba, J. D.; Nara, F.; Bielawska, A.; Garrett, S.; Hannun, Y. A. (1997): The BST1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is the sphingosine-1-phosphate lyase. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (42), S. 26087–26090. DOI: 10.1074/jbc.272.42.26087.
- Saba, Julie D. (2019): Fifty years of lyase and a moment of truth: sphingosine phosphate lyase from discovery to disease. In: *Journal of lipid research* 60 (3), S. 456–463. DOI: 10.1194/jlr.S091181.
- Saba, Julie D.; Keller, Nancy; Wang, Jen-Yeu; Tang, Felicia; Slavin, Avi; Shen, Yizhuo (2021): Genotype/Phenotype Interactions and First Steps Toward Targeted Therapy for Sphingosine Phosphate Lyase Insufficiency Syndrome. In: *Cell biochemistry and biophysics*. DOI: 10.1007/s12013-021-01013-9.
- Salem, Esam S. B.; Murakami, Kazutoshi; Takahashi, Toshimasa; Bernhard, Elise; Borra, Vishnupriya; Bethi, Mridula; Nakamura, Takahisa (2018): Isolation of Primary Mouse Hepatocytes for Nascent Protein Synthesis Analysis by Non-radioactive L-azidohomoalanine Labeling Method. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (140). DOI: 10.3791/58323.
- Sato, Koichi; Malchinkhuu, Enkhzol; Horiuchi, Yuta; Mogi, Chihiro; Tomura, Hideaki; Tosaka, Masahiko et al. (2007): Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. In: *Journal of neurochemistry* 103 (6), S. 2610–2619. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04958.x.
- Sattler, Katherine J. E.; Elbasan, Sehriban; Keul, Petra; Elter-Schulz, Miriam; Bode, Constantin; Gräler, Markus H. et al. (2010): Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. In: *Basic research in cardiology* 105 (6), S. 821–832. DOI: 10.1007/s00395-010-0112-5.
- Saygili, Seha; Canpolat, Nur; Sever, Lale; Caliskan, Salim; Atayar, Emine; Ozaltin, Fatih (2019a): Persistent hypoglycemic attacks during hemodialysis sessions in an infant with congenital nephrotic syndrome: Answers. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 34 (1), S. 77–79. DOI: 10.1007/s00467-018-3982-7.
- Saygili, Seha; Canpolat, Nur; Sever, Lale; Caliskan, Salim; Atayar, Emine; Ozaltin, Fatih (2019b): Persistent hypoglycemic attacks during hemodialysis sessions in an infant with congenital nephrotic syndrome: Questions. In: *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 34 (1), S. 75–76. DOI: 10.1007/s00467-018-3980-9.
- Schatzmann, H. J. (1973): Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. In: *The Journal of physiology* 235 (2), S. 551–569. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010403.
- Schmahl, Jennifer; Raymond, Christopher S.; Soriano, Philippe (2007): PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. In: *Nature genetics* 39 (1), S. 52–60. DOI: 10.1038/ng1922.

- Schmidt, Cameron A.; Fisher-Wellman, Kelsey H.; Neuffer, P. Darrell (2021): From OCR and ECAR to energy: Perspectives on the design and interpretation of bioenergetics studies. In: *The Journal of biological chemistry* 297 (4), S. 101140. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101140.
- Schmidt, Nadine; Kollwe, Astrid; Constantin, Cristina E.; Henrich, Sebastian; Ritzau-Jost, Andreas; Bildl, Wolfgang et al. (2017): Neuroplastin and Basigin Are Essential Auxiliary Subunits of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPases and Key Regulators of Ca<sup>2+</sup> Clearance. In: *Neuron* 96 (4), 827-838.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.09.038.
- Schneider, P. B.; Kennedy, E. P. (1967): Sphingomyelinase in normal human spleens and in spleens from subjects with Niemann-Pick disease. In: *Journal of lipid research* 8 (3), S. 202–209.
- Schorling, S.; Vallée, B.; Barz, W. P.; Riezman, H.; Oesterhelt, D. (2001): Lag1p and Lac1p are essential for the Acyl-CoA-dependent ceramide synthase reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Molecular biology of the cell* 12 (11), S. 3417–3427. DOI: 10.1091/mbc.12.11.3417.
- Schuchman, E. H.; Suchi, M.; Takahashi, T.; Sandhoff, K.; Desnick, R. J. (1991): Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (13), S. 8531–8539.
- Schuchman, Edward H.; Desnick, Robert J. (2017): Types A and B Niemann-Pick disease. In: *Molecular genetics and metabolism* 120 (1-2), S. 27–33. DOI: 10.1016/j.ymgme.2016.12.008.
- Schulze, Ryan J.; Schott, Micah B.; Casey, Carol A.; Tuma, Pamela L.; McNiven, Mark A. (2019): The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. In: *The Journal of cell biology* 218 (7), S. 2096–2112. DOI: 10.1083/jcb.201903090.
- Schümann, Jens; Grevot, Armelle; Ledieu, David; Wolf, Armin; Schubart, Anna; Piaia, Alessandro et al. (2015): Reduced Activity of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Induces Podocyte-related Glomerular Proteinuria, Skin Irritation, and Platelet Activation. In: *Toxicologic pathology* 43 (5), S. 694–703. DOI: 10.1177/0192623314565650.
- Schwab, Susan R.; Pereira, João P.; Matloubian, Mehrdad; Xu, Ying; Huang, Yong; Cyster, Jason G. (2005): Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. In: *Science (New York, N.Y.)* 309 (5741), S. 1735–1739. DOI: 10.1126/science.1113640.
- Serra, Montserrat; Saba, Julie D. (2010): Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. In: *Advances in enzyme regulation* 50 (1), S. 349–362. DOI: 10.1016/j.advenzreg.2009.10.024.
- Settas, Nikolaos; Persky, Rebecca; Faucz, Fabio R.; Sheanon, Nicole; Voutetakis, Antonis; Lodish, Maya et al. (2019): SGPL1 Deficiency: A Rare Cause of Primary Adrenal Insufficiency. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 104 (5), S. 1484–1490. DOI: 10.1210/jc.2018-02238.
- Spence, M. W.; Byers, D. M.; Palmer, F. B.; Cook, H. W. (1989): A new Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (10), S. 5358–5363.

- Spiegel, Sarah; Maczys, Melissa A.; Maceyka, Michael; Milstien, Sheldon (2019): New insights into functions of the sphingosine-1-phosphate transporter SPNS2. In: *Journal of lipid research* 60 (3), S. 484–489. DOI: 10.1194/jlr.S091959.
- Spohner, Anna Katharina; Jakobi, Katja; Trautmann, Sandra; Thomas, Dominique; Schumacher, Fabian; Kleuser, Burkhard et al. (2021): Mouse Liver Compensates Loss of Sgpl1 by Secretion of Sphingolipids into Blood and Bile. In: *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910617.
- Springson, David. B.; Coulon, Andree (1954): The precursors of sphingosine in brain tissue. In: *The Journal of biological chemistry* 207 (2), S. 585–592.
- Steinberg, Daniel (2013): In celebration of the 100th anniversary of the lipid hypothesis of atherosclerosis. In: *Journal of lipid research* 54 (11), S. 2946–2949. DOI: 10.1194/jlr.R043414.
- Stoffel, W.; Bister, K. (1973): Stereospecificities in the metabolic reactions of the four isomeric sphinganines (dihydrosphingosines) in rat liver. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 354 (2), S. 169–181. DOI: 10.1515/bchm2.1973.354.1.169.
- Streb, H.; Irvine, R. F.; Berridge, M. J.; Schulz, I. (1983): Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. In: *Nature* 306 (5938), S. 67–69. DOI: 10.1038/306067a0.
- Strub, Graham M.; Paillard, Melanie; Liang, Jie; Gomez, Ludovic; Allegood, Jeremy C.; Hait, Nitai C. et al. (2011): Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (2), S. 600–612. DOI: 10.1096/fj.10-167502.
- Sugita, M.; Dulaney, J. T.; Moser, H. W. (1972): Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). In: *Science (New York, N.Y.)* 178 (4065), S. 1100–1102. DOI: 10.1126/science.178.4065.1100.
- Sundararaman, Sai Sahana; Döring, Yvonne; van der Vorst, Emiel P. C. (2021): PCSK9: A Multi-Faceted Protein That Is Involved in Cardiovascular Biology. In: *Biomedicines* 9 (7). DOI: 10.3390/biomedicines9070793.
- Sutherland, Francis; Harris, Julie (2002): Claude Couinaud: a passion for the liver. In: *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 137 (11), S. 1305–1310. DOI: 10.1001/archsurg.137.11.1305.
- Suzuki, K.; Suzuki, Y. (1970): Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (2), S. 302–309. DOI: 10.1073/pnas.66.2.302.
- Sweeley, Charles C. (1991): Chapter 11 Sphingolipids. In: *New Comprehensive Biochemistry* (12), S. 327–361. DOI: 10.1016/S0167-7306(08)60339-7.
- Takabe, Kazuaki; Kim, Roger H.; Allegood, Jeremy C.; Mitra, Poulami; Ramachandran, Subramaniam; Nagahashi, Masayuki et al. (2010): Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (14), S. 10477–10486. DOI: 10.1074/jbc.M109.064162.
- Taylor, Veronica A.; Stone, Hillarey K.; Schuh, Meredith P.; Zhao, Xueheng; Setchell, Kenneth D.; Erkan, Elif (2019): Disarranged Sphingolipid Metabolism From Sphingosine-1-

- Phosphate Lyase Deficiency Leads to Congenital Nephrotic Syndrome. In: *Kidney international reports* 4 (12), S. 1763–1769. DOI: 10.1016/j.ekir.2019.07.018.
- Teichgräber, Volker; Ulrich, Martina; Endlich, Nicole; Riethmüller, Joachim; Wilker, Barbara; Oliveira-Munding, Cheyla Conceição de et al. (2008): Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. In: *Nature medicine* 14 (4), S. 382–391. DOI: 10.1038/nm1748.
- Thudichum, Johann Ludwig Wilhelm (1884): A treatise on the chemical constitution of the brain. London: Bailliere Tindall and Cox.
- Toyoshima, Chikashi (2009): How Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (6), S. 941–946. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.008.
- Trefts, Elijah; Gannon, Maureen; Wasserman, David H. (2017): The liver. In: *Current biology* : CB 27 (21), R1147-R1151. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- van Veldhoven, P. P.; Gijssbers, S.; Mannaerts, G. P.; Vermeesch, J. R.; Brys, V. (2000): Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22(1). In: *Biochimica et biophysica acta* 1487 (2-3), S. 128–134. DOI: 10.1016/s1388-1981(00)00079-2.
- van Veldhoven, P. P.; Mannaerts, G. P. (1991): Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (19), S. 12502–12507.
- Vanier, M. T.; Duthel, S.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Pentchev, P.; Carstea, E. D. (1996): Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. In: *American journal of human genetics* 58 (1), S. 118–125.
- Vanier, Marie T. (2010): Niemann-Pick disease type C. In: *Orphanet journal of rare diseases* 5, S. 16. DOI: 10.1186/1750-1172-5-16.
- Venkataraman, Krishnan; Lee, Yong-Moon; Michaud, Jason; Thangada, Shobha; Ai, Youxi; Bonkovsky, Herbert L. et al. (2008): Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. In: *Circulation research* 102 (6), S. 669–676. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165845.
- Vienken, Hans; Mabrouki, Nathalie; Grabau, Katja; Claas, Ralf Frederik; Rudowski, Agnes; Schömel, Nina et al. (2017): Characterization of cholesterol homeostasis in sphingosine-1-phosphate lyase-deficient fibroblasts reveals a Niemann-Pick disease type C-like phenotype with enhanced lysosomal Ca<sup>2+</sup> storage. In: *Scientific reports* 7, S. 43575. DOI: 10.1038/srep43575.
- Vogel, Peter; Donoviel, Michael S.; Read, Robert; Hansen, Gwenn M.; Hazlewood, Jill; Anderson, Stephen J. et al. (2009): Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. In: *PloS one* 4 (1), e4112. DOI: 10.1371/journal.pone.0004112.
- Vogt, Katja; Mahajan-Thakur, Shailaja; Wolf, Robert; Bröderdorf, Susanne; Vogel, Conny; Böhm, Andreas et al. (2018): Release of Platelet-Derived Sphingosine-1-Phosphate Involves Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) and Is Inhibited by Statins. In: *Thrombosis and haemostasis* 118 (1), S. 132–142. DOI: 10.1160/TH17-04-0291.

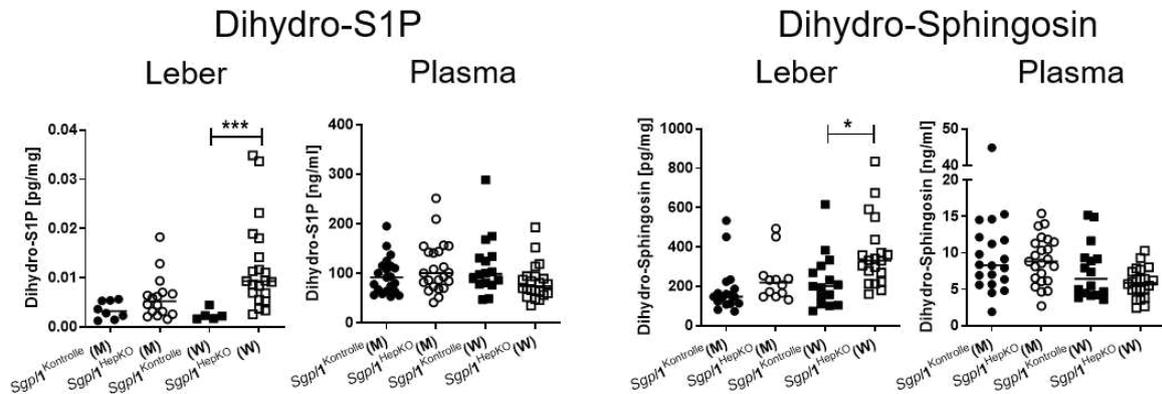
- Wang, F.; van Brocklyn, J. R.; Hobson, J. P.; Movafagh, S.; Zukowska-Grojec, Z.; Milstien, S.; Spiegel, S. (1999): Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (50), S. 35343–35350. DOI: 10.1074/jbc.274.50.35343.
- Wasserman, David H. (2009): Four grams of glucose. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 296 (1), E11-21. DOI: 10.1152/ajpendo.90563.2008.
- Weber, Claudia; Krueger, Andreas; Münk, Anika; Bode, Constantin; van Veldhoven, Paul P.; Gräler, Markus H. (2009): Discontinued postnatal thymocyte development in sphingosine 1-phosphate-lyase-deficient mice. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (7), S. 4292–4301. DOI: 10.4049/jimmunol.0901724.
- Wegner, Marthe-Susanna; Schiffmann, Susanne; Parnham, Michael John; Geisslinger, Gerd; Grösch, Sabine (2016): The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. In: *Progress in lipid research* 63, S. 93–119. DOI: 10.1016/j.plipres.2016.03.006.
- Weiss, Benjamin (1963): The biosynthesis of sphingosine. I. A study of the reaction with tritium-labeled serine. In: *The Journal of biological chemistry* 238, S. 1953–1959.
- Weske, Sarah; Vaidya, Mithila; Reese, Alina; Wnuck Lipinski, Karin von; Keul, Petra; Bayer, Julia K. et al. (2018): Targeting sphingosine-1-phosphate lyase as an anabolic therapy for bone loss. In: *Nature medicine* 24 (5), S. 667–678. DOI: 10.1038/s41591-018-0005-y.
- Wilson, J. W.; Leduc, E. H. (1948): The occurrence and formation of binucleate and multinucleate cells and polyploid nuclei in the mouse liver. In: *The American journal of anatomy* 82 (3), S. 353–391. DOI: 10.1002/aja.1000820302.
- Wu, Min; Neilson, Andy; Swift, Amy L.; Moran, Rebecca; Tamagnine, James; Parslow, Diane et al. (2007): Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (1), C125-36. DOI: 10.1152/ajpcell.00247.2006.
- Wuytack, F.; Raeymaekers, L.; Missiaen, L. (2002): Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. In: *Cell calcium* 32 (5-6), S. 279–305. DOI: 10.1016/s0143416002001847.
- Xu, Bo; Chen, Zhen; Tang, Gaorui (2021): The Current Role of Clevidipine in the Management of Hypertension. In: *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions*. DOI: 10.1007/s40256-021-00494-6.
- Yatomi, Y.; Igarashi, Y.; Yang, L.; Hisano, N.; Qi, R.; Asazuma, N. et al. (1997a): Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. In: *Journal of biochemistry* 121 (5), S. 969–973. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021681.
- Yatomi, Y.; Ruan, F.; Ohta, J.; Welch, R. J.; Hakomori, S.; Igarashi, Y. (1995): Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride. In: *Analytical biochemistry* 230 (2), S. 315–320. DOI: 10.1006/abio.1995.1480.
- Yatomi, Y.; Yamamura, S.; Ruan, F.; Igarashi, Y. (1997b): Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (8), S. 5291–5297. DOI: 10.1074/jbc.272.8.5291.

- Zhang, H.; Desai, N. N.; Murphey, J. M.; Spiegel, S. (1990): Increases in phosphatidic acid levels accompany sphingosine-stimulated proliferation of quiescent Swiss 3T3 cells. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (34), S. 21309–21316.
- Zhang, H.; Desai, N. N.; Olivera, A.; Seki, T.; Brooker, G.; Spiegel, S. (1991): Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. In: *The Journal of cell biology* 114 (1), S. 155–167. DOI: 10.1083/jcb.114.1.155.
- Zhang, Li; Reue, Karen; Fong, Loren G.; Young, Stephen G.; Tontonoz, Peter (2012): Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (11), S. 2541–2546. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.250571.
- Zhao, Piming; Liu, Isaac D.; Hodgkin, Jeffrey B.; Benke, Peter I.; Selva, Jeremy; Torta, Federico et al. (2020): Responsiveness of sphingosine phosphate lyase insufficiency syndrome to vitamin B6 cofactor supplementation. In: *Journal of inherited metabolic disease* 43 (5), S. 1131–1142. DOI: 10.1002/jimd.12238.
- Zhao, Piming; Tassew, Gizachew B.; Lee, Joanna Y.; Oskouian, Babak; Muñoz, Denise P.; Hodgkin, Jeffrey B. et al. (2021): Efficacy of AAV9-mediated SGPL1 gene transfer in a mouse model of S1P lyase insufficiency syndrome. In: *JCI insight* 6 (8). DOI: 10.1172/jci.insight.145936.
- Zondag, G. C.; Postma, F. R.; Etten, I. V.; Verlaan, I.; Moolenaar, W. H. (1998): Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. In: *The Biochemical journal* 330 (Pt 2), S. 605–609. DOI: 10.1042/bj3300605.

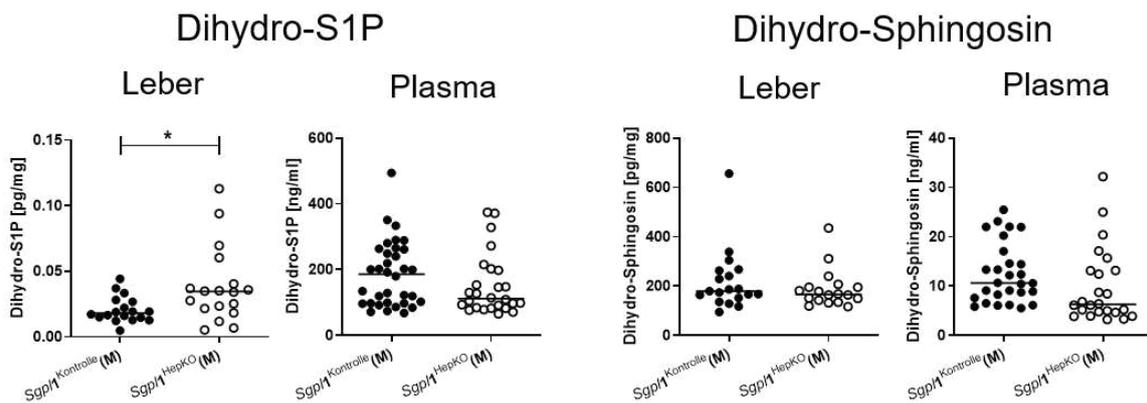
## 7. Anhang

### 7.1 Weitere Ergebnisse

#### 8 Wochen



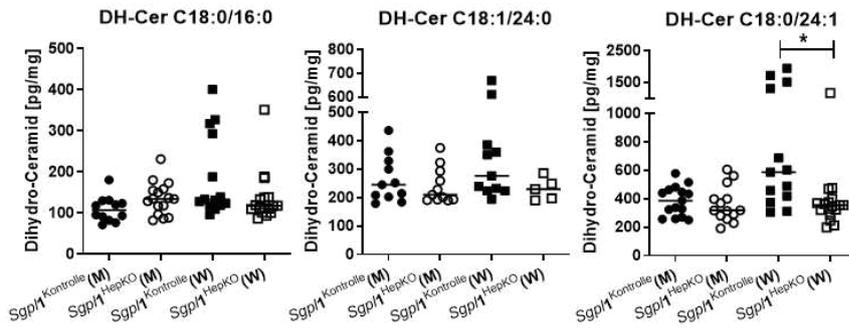
#### 8 Monate



**Anhang 1: Dihydro-S1P und Dihydro-Sphingosinspiegel in Leber und Plasma.** Die Konzentration der Dihydroformen des S1Ps und des Sphingosins wurden mittels HPLC-MS/MS in Leber und Plasma von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie ihr Median. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse.

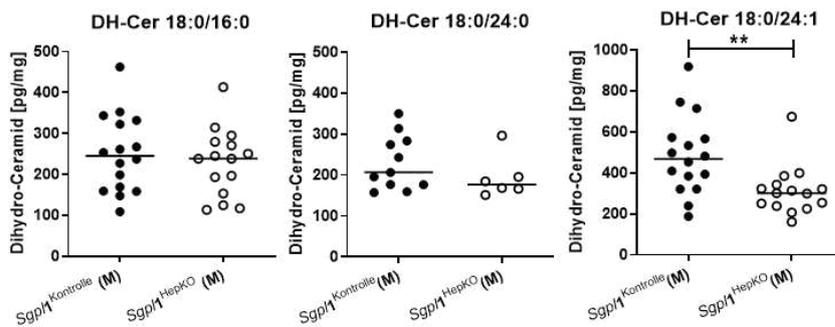
## 8 Wochen - Leber

## Dihydro-Ceramide



## 8 Monate - Leber

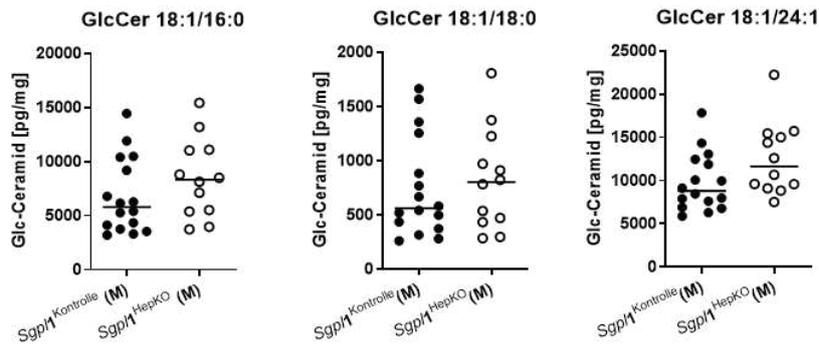
## Dihydro-Ceramide



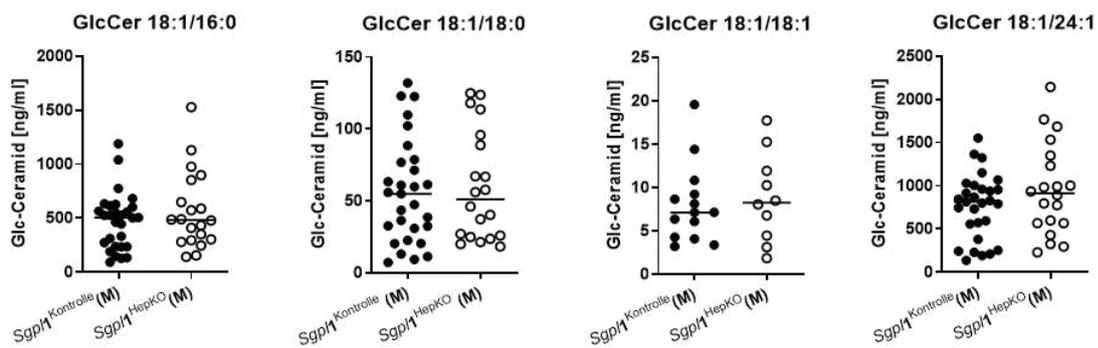
**Anhang 2: Dihydro-Ceramidspiegel in Leber und Plasma.** Die Dihydroformen der Ceramide wurden mittels HPLC-MS/MS in der Leber von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen im Alter von acht Wochen und acht Monaten gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median. \*\*  $p < 0,01$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur. M, männliche Mäuse; W, weibliche Mäuse.

## 8 Monate – Glucosylceramide

### Leber



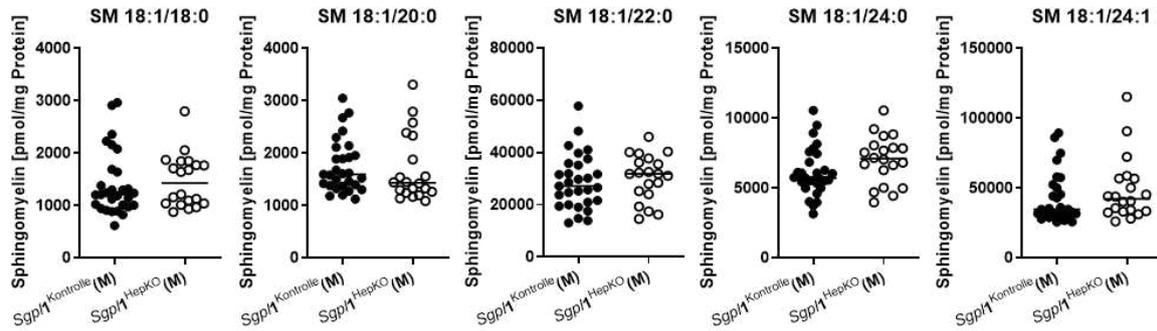
### Plasma



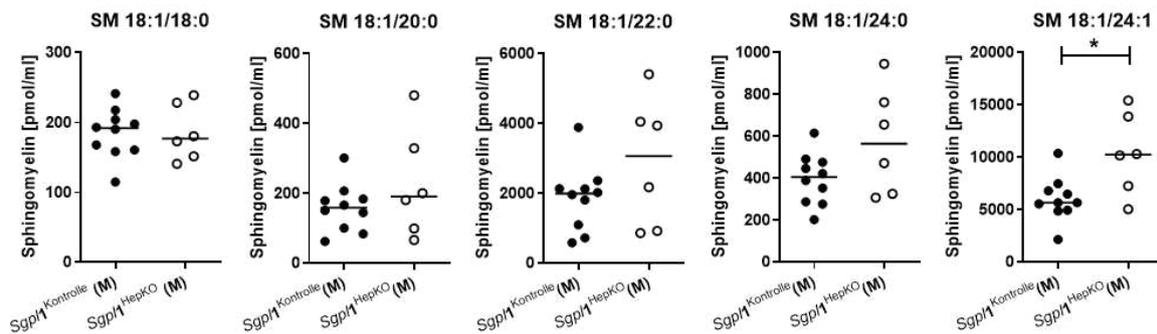
**Anhang 3: Glucosylceramidspiegel der Leber und des Plasmas.** Die Konzentration verschiedener Glucosylceramide wurde mittels HPLC-MS/MS in der Leber und dem Plasma von acht Monate alten *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median.

## 8 Monate - Sphingomyelin

## Leber

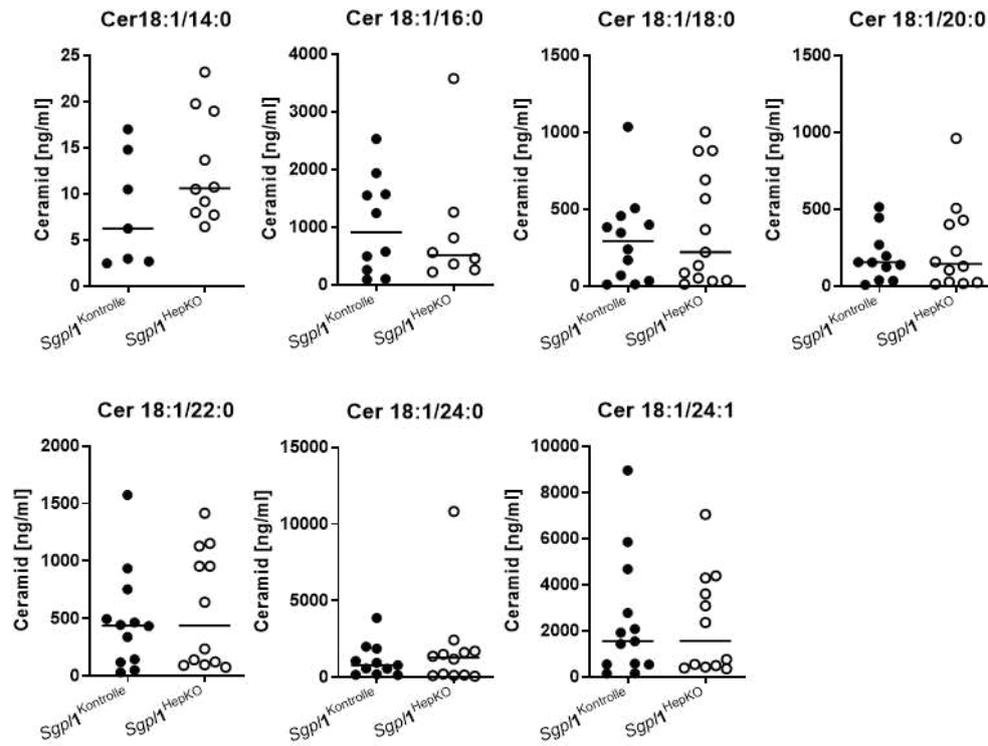


## Plasma



**Anhang 4: Sphingomyelinspiegel der Leber und des Plasmas.** Die Konzentration verschiedener Sphingomyeline wurde mittels HPLC-MS/MS im Alter von acht Monaten in der Leber und dem Plasma von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median. \*  $p < 0,05$  im Zweistichproben-t-Test mit Welch Korrektur.

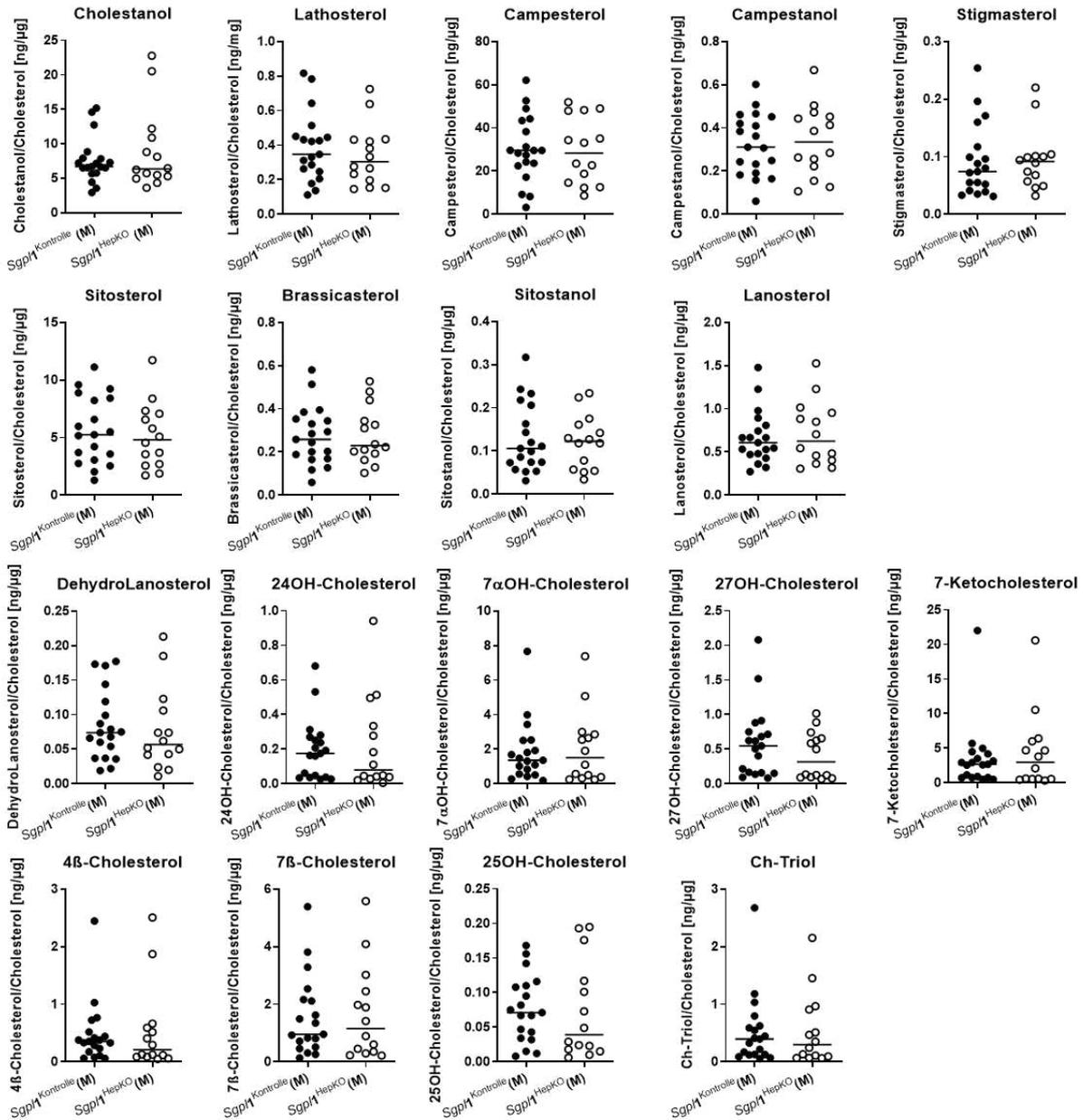
## 8 Monate - Galle



**Anhang 5: Ceramidspiegel in der Galle.** Die Ceramidspiegel wurden in der Galle von *Sgpl1*<sup>Kontrolle</sup> und *Sgpl1*<sup>HepKO</sup> Mäusen mittels HPLC-MS/MS gemessen. Dargestellt sind die Werte von einzelnen Mäusen sowie deren Median.

## 8 Monate

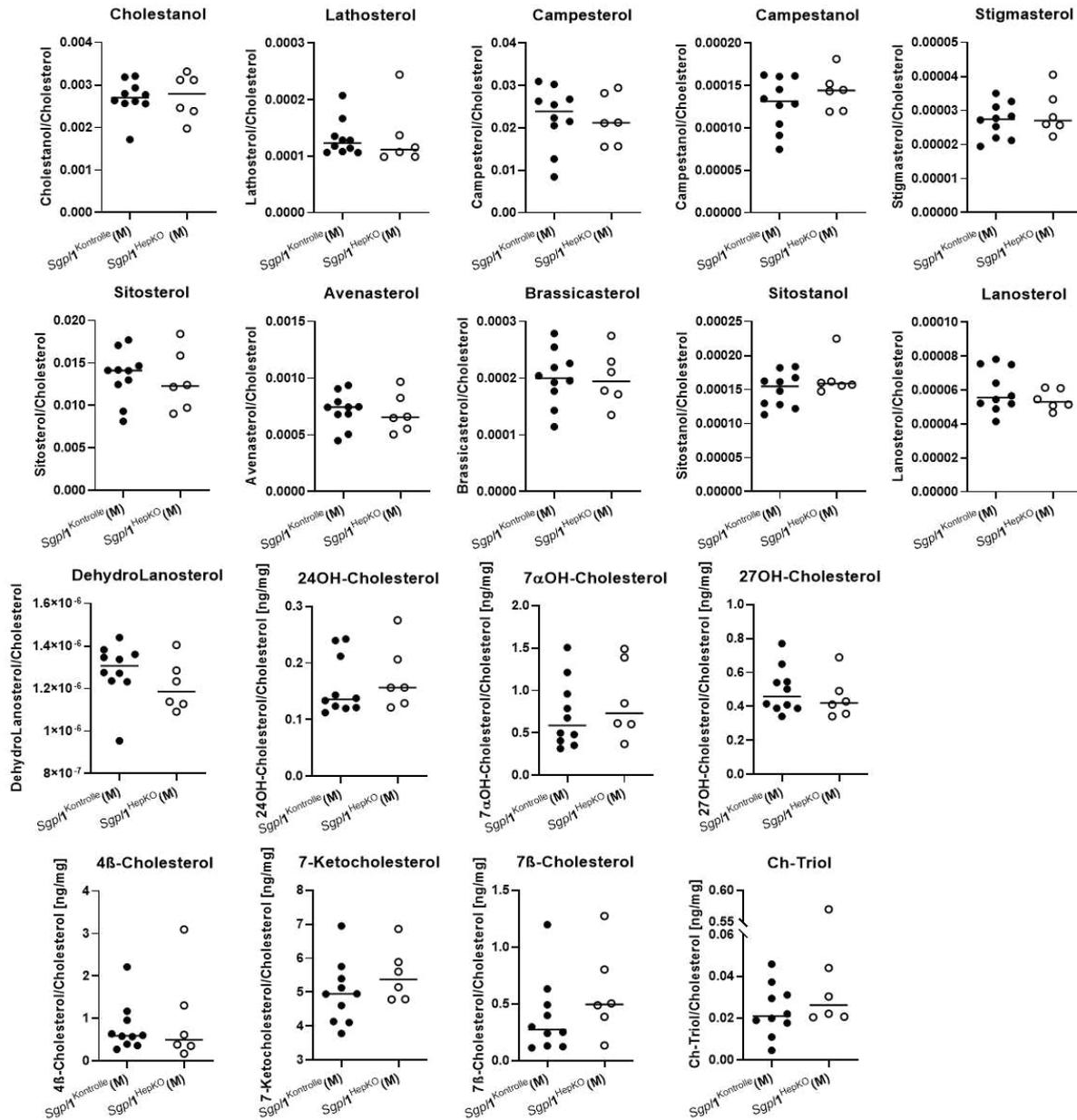
## Leber



**Anhang 6: Gehalt an Cholesterinvorläufern in der Leber.** Die Menge an Cholesterinvorläufern wurde in der Leber acht Monate alter Mäuse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion gemessen. Gezeigt sind die Werte von einzelnen Mäusen und deren Median. M, männliche Mäuse.

## 8 Monate

## Plasma



**Anhang 7: Gehalt an Cholesterinvorläufern im Plasma.** Die Menge an Cholesterinvorläufern wurde im Plasma acht Monate alter Mäuse mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion gemessen. Gezeigt sind die Werte von einzelnen Mäusen und deren Median. M, männliche Mäuse.

## 7.2 Veröffentlichungen

### 7.2.1 Veröffentlichungen entstanden aus dieser Arbeit

Spohner A. K., Jakobi K., Trautmann S., Thomas D., El-Hindi K., Grösch S., Pfeilschifter J., Saba J. D., Schumacher F., Klueser B., Lütjohann D., Meyer zu Heringdorf D. Mouse Liver Compensates Loss of Sphingosine-1-phosphate Lyase by Secretion of Sphingolipids into Blood and Bile. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (19).

DOI: 10.3390/ijms221910617

Spohner A. K., Jakobi K., Thomas D., Trautmann S., Saba J., Hintermann E., Lütjohann D., Kerksiek A., Meyer zu Heringdorf D. Characterisation of hepatocyte-specific Sphingosine-1-phosphate lyase knockout mice. (Poster)

86. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Leipzig, Deutschland.

Abstract in: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology* 2020, 393 (1)

DOI: 10.1007/s00210-020-01828-y

### 7.2.2 Weitere Veröffentlichungen

Blankenbach K. V., Claas R. F., Aster N. J., Spohner A. K., Trautmann S., Ferreirós N., Tesmer J. J. G., Offermanns S., Wieland T., Meyer zu Heringdorf D. Dissecting Gq/11 mediated plasma membrane translocation of sphingosine kinase 1. *Cells* 2020, 2201 (9)

DOI: 10.3390/cells9102201

Blankenbach K. V., Bruno G., Wondra E., Spohner A. K., Aster N. J., Vienken H., Trautmann S., Ferreirós N., Wieland T., Bruni P., Meyer zu Heringdorf D. The WD40 repeat protein, WDR36, orchestrates sphingosine kinase 1 recruitment and phospholipase C  $\beta$  activation by Gq coupled receptors. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1865 (7)

DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158704

### 7.3 Eidesstaatliche Versicherung

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den .....

.....

Anna Katharina Spohner

#### Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

#### Lipidhomöostase bei S1P Lyase Defizienz in Maus und Mensch

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den .....

.....

Anna Katharina Spohner