

# Potente und selektive Inhibition der sauren Sphingomyelinase durch Bisphosphonate\*\*

Anke G. Roth, Daniela Drescher, Yang Yang, Susanne Redmer, Stefan Uhlig und  
Christoph Arenz\*

Professor Konrad Sandhoff zum 70. Geburtstag gewidmet

Die saure Sphingomyelinase (aSMase) wird zurzeit als Angriffspunkt für Wirkstoffe im Zusammenhang mit einer Reihe unterschiedlicher Krankheiten diskutiert.<sup>[1-3]</sup> So verhindert beispielsweise eine Inhibition der aSMase bakterielle Infektionen in einem Rattenmodell der zystischen Fibrose<sup>[4]</sup> sowie das akute Lungenversagen (acute lung injury, ALI), ausgelöst durch Endotoxine, Säureexposition oder den Plättchenaktivierenden Faktor (platelet-activating factor, PAF).<sup>[5]</sup> Darüber hinaus ist die aSMase essenziell für Infektionen nichtphagozytierender Zellen mit *Neisseria gonorrhoeae*<sup>[6]</sup> und die Bildung von Lungenemphysemen.<sup>[7]</sup> Eine pharmakologische oder genetische Inhibition der aSMase verhindert die Apoptose und Degeneration von Leberzellen in einem Mausmodell der Wilson'schen Krankheit.<sup>[8]</sup> Zusätzlich schreiben einige Publikationen der aSMase eine signifikante Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques zu.<sup>[9]</sup>

Dieser vielversprechende Fortschritt in der aSMase-Forschung, auf der Grundlage von Tiermodellen und kultivierten Patientenzellen, wird jedoch durch einen Mangel an potennten und selektiven Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase gebremst. Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PtdIns3,5P<sub>2</sub>), der bisher potenteste Inhibitor ( $K_M = 0.53 \mu\text{M}$ ),<sup>[10]</sup> ist für weiterführende Studien in Zellkultur wegen der fünffach negativen Ladung und der beiden langen Fettsäureketten, die eine feste Verankerung in biologischen Membranen bewirken, nicht geeignet. Darüber hinaus ist PtdIns3,5P<sub>2</sub> biologisch labil und kann von den Phospholipasen A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C und D sowie von Phosphoinositid-Phosphatasen abgebaut werden.

Die aSMase ist eine lösliche, lysosomale Sphingolipid-Hydrolase, die konstitutiv Sphingomyelin von internalisierten Membranfragmenten abbaut.<sup>[11]</sup> Nach Stimulation kann das Enzym aber auch an der Außenseite der Plasmamembran<sup>[12]</sup> nachgewiesen werden. Dieses auch als sekretorische Sphingomyelinase (sSMase) bezeichnete, membranassoziierte

Enzym hat eine signifikante Aktivität in Serum und Urin und ist nahezu identisch mit der lysosomalen Variante. Die sSMase-Aktivität ist bei vielen Krankheitsbildern drastisch erhöht. So scheint besonders die sekretorische Form der aSMase eine wichtige Rolle in der Signalübertragung zu spielen, möglicherweise indem sie die Zusammensetzung der Plasmamembran in hypothetischen sphingolipid- und cholesterinreichen Membranmikrodomänen verändert. Diese „Lipid Rafts“ könnten möglicherweise als Signalplattformen dienen.<sup>[13]</sup> Es gibt zumindest Hinweise dafür, dass die Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid zu einer drastischen Änderung der biophysikalischen Eigenschaften von „Lipid Rafts“ führen kann.<sup>[14]</sup> Hingegen gilt als gesichert, dass Ceramid ein potenter Induktor der Apoptose ist, die einer der Hauptgründe für die Zelldegeneration bei den erwähnten Krankheiten ist. Bisher ist aber noch nicht geklärt, ob Ceramid über eine Umformung der Plasmamembran oder über eine Wechselwirkung mit Proteinen, wie Cathepsin B, an der zellulären Signalübertragung beteiligt ist. Neben der aSMase wurden noch zwei cytosolische, magnesiumabhängige und membrangebundene neutrale Sphingomyelinasen (nSMase 1 und 2)<sup>[15]</sup> sowie eine alkalische Sphingomyelinase<sup>[16]</sup> beschrieben, deren Funktion für die Zelle weitgehend unklar ist. Kürzlich wurde gezeigt, dass die nSMase für die Bildung von Exosomen<sup>[17]</sup> essenziell ist, die ihrerseits eine wichtige Rolle in der Bildung von Zell-Zell-Kontakten und der Infektion durch Retroviren spielen.<sup>[18]</sup> Anders als für die aSMase sind für die nSMase einige potente Inhibitoren bekannt.<sup>[19]</sup>

Unser Bemühen, ein Phosphonat-Analogon von PtdIns3,5P<sub>2</sub> als potenziellen Inhibitor der aSMase zu synthetisieren, führte nur zu mäßig aktiven Substanzen.<sup>[27]</sup> Zusätzlich hatten wir Zugriff auf eine kleine (Bis-)Phosphonat-Bibliothek, die bereits in der Akademie der Wissenschaften (DDR) synthetisiert worden war, wobei einige Verbindungen Ähnlichkeiten mit unseren Phosphonaten aufwiesen. In einem ersten Screening stellte sich heraus, dass einige dieser Substanzen bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  die aSMase nahezu vollständig inhibierten (Tabelle 1 und 2). Unter den Substanzen befand sich auch das  $\alpha$ -Aminobisphosphonat **7b**, das um eine Größenordnung potenter wirkte als PtdIns3,5P<sub>2</sub>.

Darüber hinaus zeigte **7b**, das zwei Methylengruppen mehr enthält als **7a**, eine drastisch gesteigerte inhibitorische Potenz. Um einen besseren Einblick in die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu bekommen, synthetisierten wir 15 weitere Bisphosphonate mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen am  $\alpha$ -C-Atom sowie variierenden Lipidkettenlängen nach etablierten Vorschriften (Schema 1).<sup>[20]</sup> Anhand

[\*] A. G. Roth, D. Drescher, S. Redmer, Prof. Dr. C. Arenz  
Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin  
Brook-Taylor-Straße 2, 12489 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-2093-6947  
E-Mail: christoph.arenz@chemie.hu-berlin.de

Y. Yang, Prof. Dr. S. Uhlig  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät  
RWTH Aachen, Wendlingweg 2, 52075 Aachen (Deutschland)

[\*\*] Die Autoren bedanken sich für die Finanzierung bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG AR376/2-1, DFG Uh 88/8-1) und der Volkswagen-Stiftung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903288> zu finden.

**Tabelle 1:** aSMase-Inhibition durch die Verbindungen der ursprünglichen Phosphonatbibliothek.

	$R^1$	$R^2$	Inhibition [%] <sup>[a]</sup>
1		H	16
2		H	2
3		NH <sub>2</sub>	47
4		H	0
5		H	-5

[a] Die Inhibitionswerte beruhen jeweils auf einzelnen Bestimmungen bei 20  $\mu$ M.

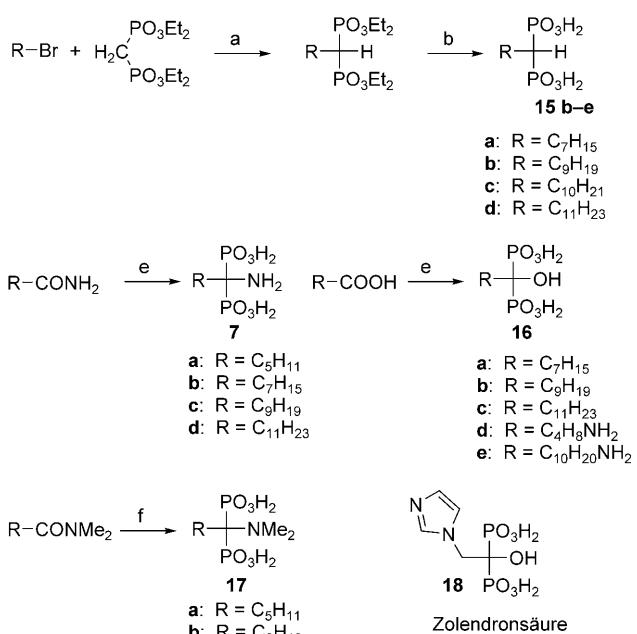
**Tabelle 2:** aSMase-Inhibition durch die Verbindungen der ursprünglichen Phosphonatbibliothek.

	$R^1$	$R^2$	Inhibition [%] <sup>[a]</sup>
6		OH	54
7a		NH <sub>2</sub>	92
7b		NH <sub>2</sub>	93
8		CH <sub>3</sub>	62
9		H	76
10		H	8
11		H	32
12		H	2
13		H	36
14		H	24

[a] Die Inhibitionswerte beruhen jeweils auf einzelnen Bestimmungen bei 20  $\mu$ M.

dieser neu synthetisierten Inhibitoren konnten wir zeigen, dass die Inhibition mit der Länge der Lipidketten korreliert. (Diese Korrelation stimmt, solange die Substanzen gut löslich sind.) Die Einführung funktioneller Gruppen mit freien Elektronenpaaren am  $\alpha$ -C-Atom (-NH<sub>2</sub> stärker als -OH) führt zu einem zusätzlichen Anstieg der Inhibition der aSMase gegenüber den H-Bisphosphonaten **15a-d**.

Bisphosphonate sind dafür bekannt, zweiwertige Metallionen wie Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> zu komplexieren.<sup>[21]</sup> Liegt zusätzlich eine Hydroxy- oder Aminogruppe vor, können noch stabilere dreizähnige Komplexe gebildet werden. Tat-



**Schema 1:** Synthese der Bisphosphonate. Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) NaH, Toluol, 60°C, 16 h; b) HCl, Rückfluss, 16 h; c) P(OMe)<sub>3</sub>, 0°C, 2 h; d) HP(OMe)<sub>2</sub>, nBu<sub>2</sub>NH, 0°C, 16 h; e) H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, MsOH; dann PCl<sub>3</sub>, 90°C, 16 h; f) PCl<sub>3</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>, 70°C, 12 h, dann H<sub>2</sub>O, 2 h.

sächlich führt eine  $\alpha$ -Aminosubstitution zu stabileren Komplexen als eine  $\alpha$ -Hydroxysubstitution, was nahe legt, dass die Inhibition der aSMase mit der Tendenz zur Komplexbildung mit dem Zn<sup>2+</sup>-Ion im reaktiven Zentrum der aSMase korreliert. Erwähnenswert ist, dass die aSMase, sowohl in der lysosomalen als auch in der sekretorischen Form, ein Zn<sup>2+</sup>-abhängiges Enzym ist. Darüber hinaus wird die lysosomale Variante weder durch EDTA inhibiert noch durch Zn<sup>2+</sup> stimuliert. Diese Beobachtung kann durch die Abundanz von Zn<sup>2+</sup> in den Lysosomen erklärt werden. Die sekretorische Sphingomyelinase kann hingegen durch Zn<sup>2+</sup> stimuliert werden.<sup>[22]</sup> Um die aSMase-inhibierenden Bisphosphonate unter Berücksichtigung ihrer Metallbindungseigenschaften zu charakterisieren, testeten wir **7c** jeweils in Gegenwart von millimolaren Konzentrationen an Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> oder Zn<sup>2+</sup>. Die inhibitorische Aktivität wurde durch die zugeführten Metallionen nicht signifikant vermindert.

Andererseits zeigt die äußerst mäßige Inhibition der aSMase durch das N-Phenylaminobisphosphonat **10** oder durch das ( $\omega$ -Aminoalkyl)hydroxybisphosphonat **16e** eindeutig, dass die Komplexbildungsfähigkeit und die Gegenwart eines hydrophoben Strukturelements nicht hinreichend für eine Inhibition der aSMase sind.

Zusätzlich wurden fast alle Substanzen auf eine Inhibition der Mg<sup>2+</sup>-abhängigen nSMase getestet. Eine Inhibition dieses Isoenzyms durch die Bisphosphonate wurde bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M nicht beobachtet (siehe die Hintergrundinformationen). Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der aSMase nicht nur sehr potent, sondern auch höchst selektiv bezüglich der nSMase ist. Darüber hinaus wurde der beste Inhibitor, **7c**, auf eine Inhibition der Ser/Thr-Phosphatase 1 (PP1) getestet; PP1 gehört ebenso wie die

Phosphoesterase-Domäne der aSMase zur Familie der Dimetall-Phosphoesterasen.<sup>[23]</sup> Dieses Enzym wurde durch **7c** bei Konzentrationen bis 2  $\mu$ M ebenfalls nicht inhibiert (siehe die Hintergrundinformationen), und eine Selektivität gegenüber PP1 wurde somit ebenfalls gezeigt.

Bisphosphonate sind bekannte Medikamente gegen Osteoporose, Knochenkrebs und viele weitere Erkrankungen des Knochenskeletts.<sup>[21]</sup> Der Schlüssel für die Spezifität der Bisphosphonate liegt in ihrer Fähigkeit, schnell und mit hoher Affinität an unbekannte Strukturen auf der Knochenoberfläche zu binden. Dabei führt die hohe Affinität zur Knochenoberfläche zu einem schnellen Entzug der Bisphosphonate aus Blut und Gewebe.<sup>[24]</sup> Interessanterweise zeigte der weit verbreitete Wirkstoff Zoledronsäure (**18**) ebenfalls eine signifikante Inhibition der aSMase mit einem  $IC_{50}$ -Wert von ungefähr 5  $\mu$ M (Tabelle 3). Die pharmakologische Relevanz einer aSMase-Inhibition durch klinisch eingesetzte Bisphosphonate kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden.

**Tabelle 3:** aSMase-Inhibition durch die synthetisierten Bisphosphonate.<sup>[a]</sup>

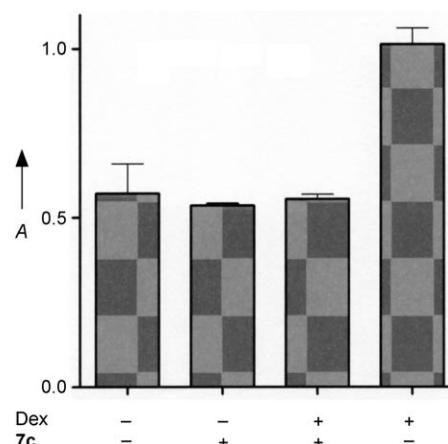
	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]		$IC_{50}$ [ $\mu$ M]		$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
<b>7a</b>	$4.66 \pm 1.07$	<b>15c</b>	$0.30 \pm 0.05$	<b>16e</b>	$1.95 \pm 0.22$
<b>7b</b>	$0.04 \pm 0.01$	<b>15d</b>	$0.17 \pm 0.04$	<b>17a</b>	$9.50 \pm 4.00$
<b>7c</b>	$0.02 \pm 0.00$	<b>16a</b>	$0.16 \pm 0.04$	<b>17b</b>	$0.18 \pm 0.03$
<b>7d</b>	$0.29 \pm 0.09$	<b>16b</b>	$0.08 \pm 0.01$	<b>18</b>	$5.08 \pm 0.74$
<b>15a</b>	$0.35 \pm 0.08$	<b>16c</b>	$0.07 \pm 0.01$		
<b>15b</b>	$0.31 \pm 0.12$	<b>16d</b>	$6.80 \pm 2.40$		

[a] Der  $IC_{50}$ -Wert für die Inhibition der nSMase ist für alle getesteten Substanzen > 100  $\mu$ M.

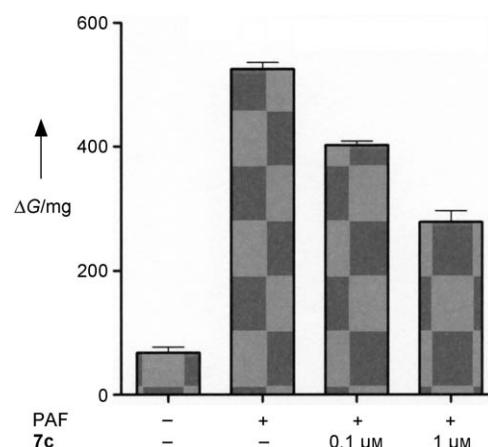
Da aSMase das proapoptotische Ceramid produziert, kann eine Inhibition dieses Enzyms durch RNAi oder unspezifische Inhibitoren Zellen vor Dexamethason<sup>[25]</sup> oder Cu<sup>2+</sup>-induzierter<sup>[8]</sup> Apoptose bewahren. HepG2-Leberzellen wurden von uns mit Dexamethason ( $10^{-8}$  M) behandelt, um eine Apoptose zu induzieren. Die Zugabe von 0.1  $\mu$ M des aSMase-Inhibitors **7c** in das Medium unterdrückte jedoch hoch effizient die so induzierte Apoptose, wie anhand eines DNA-Fragmentierungs-ELISA gezeigt wurde (Abbildung 1).

Ermutigt durch die hohe biologische Aktivität in kultivierten Zellen einerseits und das offenkundige pharmakologische Interesse an potennten aSMase-Inhibitoren für die Behandlung von Lungenerkrankungen andererseits, untersuchten wir, ob der Inhibitor auch die Ausbildung eines PAF-induzierten Lungenödems erschwert, wie dies zuvor bereits für den unspezifischen und indirekten aSMase-Inhibitor Imipramin gezeigt werden konnte.<sup>[5]</sup> In der Tat hemmte **7c** die Lungenödementwicklung in isolierten, ventilierten und perfundierten Rattenlungen (IPL, Abbildung 2) konzentrationsabhängig. Ähnlich wie Imipramin (10  $\mu$ M), konnte der Inhibitor **7c** die Entstehung eines Lungenödems in diesem Modell vermindern, aber nicht vollständig unterdrücken.

Das Bisphosphonat **7c** ist der potenteste bekannte aSMase-Inhibitor. Die Verbindung ist mehr als 5000-fach selektiv gegenüber dem Mg<sup>2+</sup>-abhängigen Isoenzym nSMase und ebenfalls selektiv gegenüber dem Dimetallenzym Ser/Thr-Proteinphosphatase 1. Die Substanz kann leicht im Gramm-Maßstab synthetisiert werden, zeigt Aktivität in



**Abbildung 1.** Der aSMase-Inhibitor **7c** (0.1  $\mu$ M) inhibiert die Dexamethason(Dex)-induzierte Apoptose in HepG2-Zellen. Gezeigt ist die Absorption in einem DNA-Fragmentierungs-ELISA.



**Abbildung 2.** Der aSMase-Inhibitor **7c** vermindert die Bildung eines PAF-induzierten Lungenödems in isolierten, ventilierten und perfundierten Rattenlungen (IPL). Die Gewichtszunahme ( $\Delta G$ ) wurde 10 min nach der Zugabe von PAF (5 nmol) gemessen.

Zellkultur und bewahrt HepG2-Zellen vor einer Dexamethason-induzierten Apoptose. Wir stellen hier einen leistungsstarken Wirkstoff für die aSMase-Forschung vor, der aller Voraussicht nach die tricyclischen Antidepressiva Imipramin und Desipramin ersetzen kann. Letztere werden trotz der bekannten indirekten und unspezifischen Wirkungsweise vielfach zur Inhibition der aSMase-Aktivität in Zellen und Tiermodellen eingesetzt. Die Tatsache, dass Bisphosphonate potente aSMase-Inhibitoren sind, deutet darauf hin, dass diese Eigenschaft für deren weit verbreiteten klinischen Einsatz in der Therapie der Osteoporose relevant sein könnte. Das Lebenszeitrisiko nordamerikanischer Frauen, an dieser Krankheit zu erkranken beträgt 40–50%.<sup>[26]</sup>

Schlussendlich legt die Beobachtung, dass der aSMase-Inhibitor **7c** die Entstehung von Lungenödemen in isolierten Rattenlungen signifikant vermindern kann, nahe, dass eine parenterale Verabreichung von Bisphosphonaten möglicherweise zur Behandlung von akutem Lungenversagen und anderen entzündlichen Erkrankungen genutzt werden könnte.

## Experimentelles

Enzymassays: Die aSMase oder nSMase enthaltenden Enzympräparationen wurden aus Rattenhirn isoliert.<sup>[19d]</sup> Der Mizellare nSMase-Assay wurde unter Verwendung von <sup>14</sup>C-markierten Sphingomyelin als Substrat ausgeführt.<sup>[19d]</sup> Der aSMase-Fluoreszenzassay wurde in einer 384er-Mikrotiterplatte ausgeführt. Als Substrat diente HMU-PC (6-Hexadecanoylamin-4-methylumbelliferyl-phosphorylcholin).

Die Reaktionsmischung bestand aus 13.3  $\mu$ L HMU-PC, 13.3  $\mu$ L Reaktionspuffer (100 mM NaOAc, pH 5.2, 0.2% (w/v) Na-TC, 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, 0.2% (v/v) Triton X-100) und 13.3  $\mu$ L Enzympräparation. Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, und die Reaktionen wurden 3 Stunden bei 37°C im Plattenlesegerät (FLUOstar OPTIMA, BMG labtech) inkubiert. Die Fluoreszenz von 6-Hexadecanoylamin-4-methylumbelliferon (HMU) wurde in Echtzeit gemessen (Anregung 380 nm, Emission 460 nm). Assays, bei denen das natürliche Substrat (<sup>14</sup>C-markiert) genutzt wurde, zeigten stets die gleichen Ergebnisse.

Substanzbibliotheken und Synthesen: Alle beschriebenen Substanzen wurden <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>31</sup>P-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert. Die Synthesen wurden ausgeführt wie in Lit. [20] beschrieben.

Apoptoseassay: Im Vorversuch wurde die Kinetik der DNA-Fragmentierung nach der Dexamethason-Zugabe im Lysat und im Überstand gemessen. Zwischen 6 h und 8 h war ein steiler Anstieg in der Absorption der Überstände zu beobachten, was typisch für Apoptose ist. Die Apoptoseassays wurden nach Herstellerangaben ausgeführt (Roche Katalognr. 11585045). Zuvor wurden die Zellen trypsinisiert, in Kulturmöglichkeit ( $2 \times 10^5$  Zellen  $\text{mL}^{-1}$ ) suspendiert und mit BrdU-Lösung versetzt (10  $\mu$ M Endkonzentration). Dann wurde eine 96er-Mikrotiterplatte mit ca.  $1 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung beschickt. Nach 16 h wurden die Zellen gewaschen und mit neuem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Dexamethason ( $10^{-8}$  M) und **7c** (0.1  $\mu$ M) versetzt. Nach weiteren 7 h Inkubation wurde ein Teil des Überstands (100  $\mu$ L) abgenommen und in eine 96er-Mikrotiterplatte überführt, in der zuvor Anti-BrdU-Antikörper immobilisiert worden waren. Nach Inkubation, Entfernen des Überstands und intensivem Waschen wurden der zweite Antikörper und das TMB-Substrat hinzugefügt und die Absorption bei 370 nm gemessen (FLUOstar OPTIMA, BMG labtech). Die Experimente wurden jeweils in einer Fünffachbestimmung ausgeführt.

PAF-induziertes Lungenödem: Weibliche Wistar-Ratten (Gewicht 220 bis 250 g) wurden unter Standard-Laborbedingungen gehalten (Futter und Wasser ad libitum). Die Präparation, Perfusion und Ventilation der Rattenlungen wurden ausgeführt wie in Lit. [5] beschrieben. Zuerst wurden die Lungen durch die Lungenarterie bei einem konstanten Druck (12 cm H<sub>2</sub>O) mit Krebs-Henseleit-Puffer mit 2% Albumin, 0.1% Glucose und 0.3% HEPES perfundiert. Die Bildung des Ödems wurde durch eine kontinuierliche Messung der Gewichtszunahme gemessen. PAF führt in diesem Modell zu einer schnellen Ödembildung und ist auf die aSMase zurückzuführen. Der Inhibitor **7c** wurde in Puffer aufgenommen und 10 min vor der PAF-Zugabe (5 nmol) in das Pufferreservoir gegeben. Die isolierten und perfundierten Rattenlungen wurden 30 min vor der Zugabe des Inhibitors **7c** perfundiert und 10 min nach der Zugabe mit PAF (5 nmol, als Bolus) versetzt. Die Gewichtszunahme wurde über 10 min detektiert. Die Daten sind in Abbildung 2 als Mittelwerte (mit Standardabweichungen) aus vier unabhängigen Experimenten in jeder Gruppe gezeigt. Statistik: 0.1  $\mu$ M **7c**:  $p < 0.01$  gegen PAF allein; 1  $\mu$ M **7c**:  $p < 0.01$  gegen PAF allein und gegen 0.1  $\mu$ M **7c**/PAF (Tukey-Test).

Eingegangen am 17. Juni 2009

Online veröffentlicht am 10. September 2009

**Stichwörter:** Bioorganische Chemie · Bisphosphonate · Enzyminhibitoren · Sphingolipide · Wirkstoffe

- [1] S. Uhlig, E. Gulbins, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 1100.
- [2] A. Billich, T. Baumruker, *Subcell. Biochem.* **2008**, *49*, 487.
- [3] E. L. Smith, E. H. Schuchman, *FASEB J.* **2008**, *22*, 3419.
- [4] V. Teichgräber, M. Ulrich, N. Endlich, J. Riethmüller, B. Wilker, C. C. De Oliveira-Munding, A. M. van Heeckeren, M. L. Barr, G. von Kurthy, K. W. Schmid, M. Weller, B. Tummler, F. Lang, H. Grassme, G. Doring, E. Gulbins, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 382.
- [5] R. Göggel, S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. S. Slutsky, S. Schutze, E. Gulbins, S. Uhlig, *Nat. Med.* **2004**, *10*, 155.
- [6] H. Grassmé, E. Gulbins, B. Brenner, K. Ferlinz, K. Sandhoff, K. Harzer, F. Lang, T. F. Meyer, *Cell* **1997**, *91*, 605.
- [7] I. Petracche, V. Natarajan, L. Zhen, T. R. Medler, A. T. Richter, C. Cho, W. C. Hubbard, E. V. Berdyshev, R. M. Tuder, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 491.
- [8] P. A. Lang, M. Schenck, J. P. Nicolay, J. U. Becker, D. S. Kempe, A. Lupescu, S. Koka, K. Eisele, B. A. Klarl, H. Rubben, K. W. Schmid, K. Mann, S. Hildenbrand, H. Heftner, S. M. Huber, T. Wieder, A. Erhardt, D. Haussinger, E. Gulbins, F. Lang, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 164.
- [9] C. M. Devlin, A. R. Leventhal, G. Kuriakose, E. H. Schuchman, K. J. Williams, I. Tabas, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1723.
- [10] M. Kölzer, C. Arenz, K. Ferlinz, N. Werth, H. Schulze, R. Klingenstein, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1293.
- [11] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532.
- [12] S. Marathe, S. L. Schissel, M. J. Yellin, N. Beatini, R. Mintzer, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4081.
- [13] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569.
- [14] Megha, E. London, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9997.
- [15] a) B. Liu, D. F. Hassler, G. K. Smith, K. Weaver, Y. A. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34472; b) A. A. Karakashian, N. V. Giltay, G. M. Smith, M. N. Nikolova-Karakashian, *FASEB J.* **2004**, *18*, 968.
- [16] L. Nyberg, R. D. Duan, J. Axelson, A. Nilsson, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1996**, *1300*, 42.
- [17] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugge, M. Simons, *Science* **2008**, *319*, 1244.
- [18] M. Marsh, G. van Meer, *Science* **2008**, *319*, 1191.
- [19] a) F. Nara, M. Tanaka, T. Hosoya, K. Suzuki-Konagai, T. Ogita, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 525; b) C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *112*, 1498; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1440; c) C. Arenz, M. Thutewohl, O. Block, H. Waldmann, H. J. Altenbach, A. Giannis, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 141; d) V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 841; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 827.
- [20] a) L. M. Nguyen, E. Niesor, C. L. Bentzen, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1426; b) G. R. Kieczykowski, R. B. Jobson, D. G. Melillo, D. F. Reinhold, V. J. Grenda, I. Shinkai, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310; c) D. V. Griffiths, J. M. Hughes, J. W. Brown, J. C. Caesar, S. P. Swetnam, S. A. Cumming, J. D. Kelly, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 17815; d) S. H. Szajnman, E. L. Ravaschino, R. Docampo, J. B. Rodriguez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4685.
- [21] R. G. Russell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1068*, 367.
- [22] S. L. Schissel, G. A. Keesler, E. H. Schuchman, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18250.
- [23] M. Seto, M. Whitlow, M. A. McCarrick, S. Srinivasan, Y. Zhu, R. Pagila, R. Mintzer, D. Light, A. Johns, J. A. Meurer-Ogden, *Protein Sci.* **2004**, *13*, 3172.
- [24] A. Schindeler, D. G. Little, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 1872.
- [25] M. G. Cifone, G. Migliorati, R. Parroni, C. Marchetti, D. Millimaggi, A. Santoni, C. Riccardi, *Blood* **1999**, *93*, 2282.
- [26] D. Elaine, M. Maysam Abdin, C. Cyrus, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **2006**, *32*, 617.
- [27] C. Arenz, unveröffentlichte Ergebnisse.