

**Sapoin B und D:**  
**Heterologe Expression in *Pichia pastoris* und**  
**biophysikalische Charakterisierung**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Natascha Remmel  
aus Wermelskirchen

Bonn 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1997 bis Juli 2007 unter der Leitung von Professor Dr. Konrad Sandhoff am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Referent: Professor Dr. Konrad Sandhoff
2. Referent: Privatdozentin Dr. Gerhild van Echten-Deckert
3. Referent: Professor Dr. Siegfried Waldvogel
4. Referent: Professor Dr. Albert Haas

Tag der Promotion: 11.09.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

**Im Rahmen der Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:**

- Rommel, N., Locatelli-Hoops, S., Breiden, B., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (2007) Saposin B mobilizes lipids from cholesterol poor and bis(monoacylglycerol)phosphate-rich membranes at acidic pH values. Unglycosylated Patient variant saposin B lacks lipid extraction capacity. *Febs J* **274**, 3405-3420
- Locatelli-Hoops, S., Rommel, N., Klingenstein, R., Breiden, B., Rossocha, M., Schoeniger, M., Koenigs, C., Saenger, W., und Sandhoff, K. (2006) Saposin A Mobilizes Lipids from Low Cholesterol and High Bis(monoacylglycerol)phosphate-containing Membranes: Patient variant saposin A lacks lipid extraction capacity. *J Biol Chem* **281**, 32451-32460
- Schultz-Heienbrok, R., Rommel, N., Klingenstein, R., Rossocha, M., Sandhoff, K., Saenger, W., und Maier, T. (2006) Crystallization and preliminary characterization of three different crystal forms of human saposin C heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 117-120
- Koochekpour, S., Sartor, O., Hiraiwa, M., Lee, T. J., Rayford, W., Rommel, N., Sandhoff, K., Minokadeh, A., und Patten, D. Y. (2005) Saposin C stimulates growth and invasion, activates p42/44 and SAPK/JNK signaling pathways of MAPK and upregulates uPA/uPAR expression in prostate cancer and stromal cells. *Asian J Androl* **7**, 147-158
- Norris, A. J., Whitelegge, J. P., Yaghoubian, A., Alattia, J. R., Prive, G. G., Toyokuni, T., Sun, H., Brooks, M. N., Panza, L., Matto, P., Compostella, F., Rommel, N., Klingenstein, R., Sandhoff, K., Fluharty, C., Fluharty, A., und Faull, K. F. (2005) A novel mass spectrometric assay for the cerebroside sulfate activator protein (saposin B) and arylsulfatase A. *J Lipid Res* **46**, 2254-2264
- Koochekpour, S., Sartor, O., Lee, T. J., Zieske, A., Patten, D. Y., Hiraiwa, M., Sandhoff, K., Rommel, N., und Minokadeh, A. (2004) Prosaptide TX14A stimulates growth, migration, and invasion and activates the Raf-MEK-ERK-RSK-Elk-1 signaling pathway in prostate cancer cells. *Prostate* **61**, 114-123
- Winau, F., Schwierzeck, V., Hurwitz, R., Rommel, N., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Porcelli, S. A., Brinkmann, V., Sugita, M., Sandhoff, K., Kaufmann, S. H., und Schaible, U. E. (2004) Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat Immunol* **5**, 169-174
- Sadeghlar, F., Rommel, N., Breiden, B., Klingenstein, R., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (2003) Physiological relevance of sphingolipid activator proteins in cultured human fibroblasts. *Biochimie* **85**, 439-448

## Abkürzungen

Ac, AcOH	Acetat, Essigsäure
Amp	Ampicillin
AOX	Alkoholoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	Arylsulfatase A
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
Cer	Ceramid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonia]-1-propansulfonat
Chol	Cholesterol
Cit	Citrat
Con A	Concanavalin A
CV	Säulenvolumen
Cyt c	Cytochrom c
DC	Dünschichtchromatographie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiotreitol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DO	gelöster Sauerstoff ( <i>dissolved oxygen</i> )
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiammintetraessigsäure
Endo H	$\beta$ -Endo-N-acetylglucosaminidase H
EtOH	Ethanol
FKS	fötale Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GSL	Glykosphingolipid
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption-Ionisations/ Flugzeit-Massenspektrometrie
Man	Mannose
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol
MW(CO)	Molekulargewicht ( <i>cut off</i> )
NaCit	Natriumcitrat
NaPP	Natriumphosphat
NiNTA	Nickel-Nitriloessigsäure

## Abkürzungen

---

OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>P.pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PNGase F	Peptid-N-Glykanase F
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAP	Sphingolipidaktivatorprotein
Sap	Saposin
- r/h	- rekombinant/human (aufgereinigt aus Gewebe)
- d/g/u/v	- deglykosyliert/glykosyliert/unglykosyliert/variant
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiammin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
UDP	Uridindiphosphat
w/v, v/v	Gewicht, Volumen pro Volumen
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
2.1	GLYKOSPHINGOLIPIDE .....	3
2.1.1	<i>Funktion .....</i>	3
2.1.2	<i>Biosynthese.....</i>	4
2.1.3	<i>Abbau der GSL.....</i>	5
2.2	SPHINGOLIPIDAKTIVATORPROTEINE.....	9
2.2.1	<i>Entstehung der Saps aus dem Vorläufer .....</i>	10
2.2.2	<i>Struktur und Funktion .....</i>	11
2.3	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG VON SAP-B UND -D.....	19
2.3.1	<i>Dynamische Lichtstreuung.....</i>	19
2.3.2	<i>Oberflächenplasmonresonanz.....</i>	21
2.4	ZIELSETZUNG .....	24
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
3.1	EXPRESSION .....	25
3.1.1	<i>Das Expressionssystem Pichia pastoris .....</i>	25
3.1.2	<i>Darstellung der Vektoren .....</i>	28
3.1.3	<i>Darstellung der rekombinanten Hefestämme.....</i>	29
3.1.4	<i>Schüttelkolben-Expression .....</i>	30
3.1.5	<i>Hochdichte-Zell-Fermentation im Bioreaktor .....</i>	32
3.2	AUFREINIGUNG .....	33
3.3	CHARAKTERISIERUNG .....	37
3.4	FUNKTIONALITÄTSSTUDIEN .....	39
3.4.1	<i>Untersuchungen zur Stimulierung des von Arylsulfatase A katalysierten Sulfatid-Abbaus durch Sap-B im mizellaren und liposomalen in vitro Assay und in Zellkulturstudien mit pSap-defizienten Fibroblasten.....</i>	39
3.4.2	<i>Untersuchungen zur Stimulierung des von der sauren Ceramidase katalysierten Ceramid-Abbaus durch Sap-D im liposomalen Assay .....</i>	41
3.5	BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	44
3.5.1	<i>Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....</i>	44
3.5.2	<i>Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR).....</i>	48
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>
4.1	EXPRESSION UND REINIGUNG.....	65
4.2	FUNKTIONSSTUDIEN UND BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	69
4.2.1	<i>Sap-B.....</i>	70
4.2.2	<i>Sap-D.....</i>	78
<b>5</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>80</b>
5.1	GERÄTE.....	80
5.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	81
5.3	CHEMIKALIEN .....	81
5.4	BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME, ZELLINIEN, PLASMIDE UND NUKLEINSÄUREN .....	82
5.5	KITS .....	83
5.6	ANTIKÖRPER, ENZYME, PROTEINE.....	83
5.7	SÄULEN UND SÄULENMATERIAL .....	84

5.8	LIPIDE .....	84
5.9	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN.....	85
<b>6</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>89</b>
6.1	ARBEITEN MIT <i>E. COLI</i> .....	89
6.1.1	<i>Kulturen</i> .....	89
6.1.2	<i>Darstellung von kompetente Zellen, Transformation und Selektion</i> .....	89
6.2	ARBEITEN MIT <i>PICHIA PASTORIS</i> .....	89
6.2.1	<i>Kulturen</i> .....	89
6.2.2	<i>Transformation</i> .....	90
6.2.3	<i>Phänotypisierung</i> .....	90
6.2.4	<i>Isolierung von genomischer Hefe-DNA</i> .....	91
6.2.5	<i>Protein-Expression in Pichia pastoris</i> .....	91
6.3	ARBEITEN MIT DNA.....	92
6.3.1	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	92
6.3.2	<i>DNA-Reinigung</i> .....	93
6.3.3	<i>Konzentrationsbestimmung</i> .....	93
6.3.4	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	94
6.3.5	<i>Extraktion der DNA aus Agarosegelen</i> .....	94
6.3.6	<i>PCR</i> .....	94
6.3.7	<i>Restriktion</i> .....	95
6.3.8	<i>Ligation</i> .....	95
6.3.9	<i>Sequenzierung</i> .....	95
6.4	ARBEITEN MIT PROTEINEN .....	96
6.4.1	<i>Vorbereitung der Expressionsüberstände für die Chromatographie-Schritte</i> .....	96
6.4.2	<i>Kationentauscher-Chromatographie</i> .....	96
6.4.3	<i>Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)</i> .....	96
6.4.4	<i>Reversed-Phase-Chromatographie</i> .....	97
6.4.5	<i>Gelfiltration</i> .....	97
6.4.6	<i>Affinitätschromatographie an Concanavalin A</i> .....	97
6.4.7	<i>Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)</i> .....	97
6.4.8	<i>Proteinquantifizierung</i> .....	98
6.4.9	<i>N-terminale Sequenzierung</i> .....	98
6.4.10	<i>Enzymatische Deglykosylierung</i> .....	98
6.4.11	<i>Matrix-unterstützte Laser Desorption/ Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)</i> .....	99
6.4.12	<i>Elektrophoretische Proteintrennung (SDS-PAGE)</i> .....	99
6.4.13	<i>Anfärbung der Proteine</i> .....	99
6.4.14	<i>Western-Blot</i> .....	100
6.5	ARBEITEN MIT LIPIDEN .....	100
6.5.1	<i>Darstellung von Liposomen (MacDonald et al., 1991)</i> .....	100
6.5.2	<i>Bestimmung des Lipidgehalts der Liposomen</i> .....	101
6.5.3	<i>Ultrastrukturuntersuchungen an Liposomen</i> .....	101
6.5.4	<i>Mobilisierung von Lipiden aus an Säulenmaterial gebundenen Liposomen</i> ..	101
6.6	FUNKTIONALITÄTS-STUDIEN.....	101
6.6.1	<i>Zellkulturstudien</i> .....	101
6.6.2	<i>Abbau von Sulfatid durch Arylsulfatase A/ Sap-B im mizellaren oder liposomalen Enzymassay</i> .....	102
6.6.3	<i>Abbau von Ceramid durch saure Ceramidase/ Sap-D im liposomale Enzymassay</i> .....	103
6.7	BIOPHYSIKALISCHE METHODEN.....	103

6.7.1	<i>Dynamische Lichtstreuung, DLS</i> .....	103
6.7.2	<i>Plasmonresonanzspektroskopie, SPR</i> .....	104
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>106</b>
7.1	PRIMER.....	106
7.2	CDNA UND AMINOSÄURE-SEQUENZ DES HUMANEN PROSAPOSINS .....	106
7.3	MALDI-SPEKTREN .....	109
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>111</b>



## 1 Zusammenfassung

Die vier Saposine (Saps) A-D sind kleine, enzymatisch inaktive Glykoproteine, die in Lysosomen lokalisiert sind. Trotz ihrer hohen Sequenzhomologie zeigen sie als membranaktive, wasserlösliche Lipidbindungs- und Transferproteine unterschiedliche Spezifitäten und Mechanismen.

Zusammen mit dem GM2-Aktivatorprotein sind die Saps essentielle Cofaktoren für den Abbau von Glykosphingolipiden (GSL) mit kurzen Oligosaccharidketten, die sie an der Membran-Wasser-Grenzfläche für Exohydrolasen zugänglich machen. Nach einer gut gesicherten Hypothese erreichen die für den Abbau bestimmten Bestandteile der Zellmembran nach ihrer Endozytose intraendosomale und –lysosomale Membranstrukturen. Letztere unterscheiden sich von der begrenzenden Membran durch das Fehlen einer schützenden Glykokalix, sie enthalten fast kein Cholesterol, dafür aber das lysosomale Markerlipid Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde funktionales Sap-B und -D heterolog in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, so daß eine Kontamination mit anderen Saps ausgeschlossen werden konnte. Ihre Expression und Aufreinigung wurden zur Steigerung der Ausbeute an die Durchführung in einem Bioreaktor angepaßt.

Die Interaktion der rekombinanten Saps mit den intralysosomalen, vesikulären Membranen wurde an Liposomen nachgestellt und mittels Dynamischer Lichtstreuung und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie untersucht; für letztere Methode wurden die Liposomen reversibel immobilisiert.

Während Sap-B die Größe von Liposomen in Suspension nicht veränderte, ließ Sap-D BMP-haltige Liposomen bei saurem pH aggregieren. Sowohl Sap-B als auch Sap-D banden an immobilisierte Liposomen. Glykosyliertes Sap-B störte bei saurem pH-Wert die Membranintegrität und löste so Lipide aus den Liposomen. Gefördert wurde dieser Prozeß durch die Anwesenheit von BMP; Cholesterol dagegen stabilisierte die Liposomen. Bei unglykosyliertem Wildtyp-Sap-B und zuckerfreien Varianten mit veränderter Glykosylierungssequenz war die Fähigkeit zur Lipidextraktion vermindert. Damit konnte zum ersten mal eine Funktion für die Glykosylierung von Sap-B unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden. Eine dieser Sap-B-Varianten, bei der Asparagin 215 durch

## **Zusammenfassung**

---

Histidin ersetzt ist, verursacht beim Menschen eine tödliche Sphingolipidspeicherung, die durch ein Krankheitsbild ähnlich der Metachromatischen Leukodystrophie gekennzeichnet ist. Sap-D konnte nur in der unglykosylierten Form exprimiert werden, die im liposomalen *in vitro* Assay, aber auch in Zellkultur aktiv war, und das erstmals kristallisiert werden konnte. Die Fähigkeit zur Lipidmobilisierung war deutlich geringer ausgeprägt als bei Sap-B und konnte durch den Austausch einer positiv geladenen Aminosäure (Arginin 15 gegen Glutamat), die im für die Membranbindung vermutlich relevanten Bereich des Proteins liegt, vollständig ausgeschaltet werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 Glykosphingolipide

#### 2.1.1 Funktion

Glykosphingolipide (GSL) sind neben Cholesterol und Glycerophospholipiden konstitutive Bestandteile der eukaryontischen Plasmamembran. Sie sind mit ihrem hydrophoben Ceramidanteil auf der extrazellulären Seite der Lipiddoppelschicht verankert, während die Oligosaccharid-Kopfgruppe in den Extrazellulärraum ragt, wo sie zusammen mit membranständigen Glykoproteinen und Proteoglykanen die Glykokalix der Plasmamembran bilden (Ledeer und Yu, 1982). Einerseits können die GSL Eigenschaften der Membran (z.B. Fluidität) und deren Organisation beeinflussen, andererseits interagieren ihre Kopfgruppen mit exogenen Bindungspartnern. Sie dienen so als Erkennungsstelle für Toxine, Viren und Bakterien (Hanada, 2005, Lingwood et al., 2000, Rawat et al., 2005, Svensson et al., 2006), vermitteln Zell-Zell-Kontakte (Hakomori, 2004) und sind für die Entwicklung multizellulärer Organismen unverzichtbar (Übersichtsartikel: Kolter et al., 2000). Die kombinatorische Verknüpfung der Zucker ermöglicht eine große Anzahl komplexer Strukturen der Kopfgruppe (Kolter et al., 2002), die je nach Spezies, Zelltyp und Zustand der Zelle (u.a. Differenzierung, virale Transformation, Onkogenese) charakteristische Muster ausbilden (Hakomori, 1981), z.B. befinden sich die sialinsäurehaltigen und damit sauren Ganglioside bevorzugt auf der Oberfläche von Nervenzellen, während Galaktosylceramid und Sulfatid Bestandteil der multilamellaren Schichten des Myelins sind. Fehlt der Kohlenhydratanteil, wie bei Sphingomyelin oder Ceramid, spricht man von Sphingolipiden. Auch der Fettsäureanteil und die Sphingoidbase der GSL sind variabel bezüglich Länge, Sättigungsgrad und Derivatisierung.

GSL sind auf unterschiedliche Weise an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Lipophile Intermediate ihres Stoffwechsels, darunter Ceramid, Sphingosin und ihre Phosphate - Ceramid-1-Phosphat, Sphingosin-1-Phosphat (Chalfant und Spiegel, 2005) - dienen als Signalmoleküle bei Apoptose, Proliferation, Differenzierung und Entzündungsprozessen (Übersichtsartikel: Maceyka et al., 2005, Posse de Chaves, 2006, Taha et al., 2006). Außerdem wird vermutet, daß sie zusammen mit GPI-verankerten Proteinen, Sphingomyelin und Cholesterol in funktionelle Mikrodomänen, *caveolae* oder die sogenannten *rafts*, segregieren (Übersichtsartikel: Brown und London, 2000, Cheng et al., 2006, Simons und Toomre, 2000), wo sie die Eigenschaften von Rezeptoren modulieren (Duchemin et al., 2002, Liu et al., 2004, Miljan et al., 2002, Yamashita et al., 2003) und so Einfluß auf die

Genexpression nehmen können (Inokuchi et al., 2004). Die ursprüngliche Definition der *rafts* bezieht sich auf das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten von Membranfraktionen in Detergenzien (Brown und London, 1998, Simons und Ikonen, 1997) und gibt die Versuchsbedingungen eher wieder als die *in vivo* Situation (Heerklotz et al., 2003). Ihre Charakterisierung ist nach wie vor schwierig (Hancock, 2006, Munro, 2003) und erfordert die sorgfältige Auswahl der Methoden wie z.B. *single molecule tracking*-Mikroskopie (Kusumi et al., 2004).

### 2.1.2 Biosynthese

Die *de novo* Biosynthese der GSL (Kolter und Sandhoff, 1999, Merrill, 2002) wird durch membrangebundene Enzyme katalysiert und ist an den vesikulären Transport der wachsenden Lipidmoleküle gekoppelt.

Sie beginnt auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums mit der geschwindigkeits-bestimmenden Kondensation von L-Serin mit Palmitoyl-CoA durch die Serin-Palmitoyl-Transferase zu 3-Ketosphinganin, das NADPH-abhängig zu *D-erythro*-Sphinganin reduziert und zu Dihydroceramid acyliert wird. Die Dihydroceramid-Desaturase führt eine Doppelbindung ein, so daß Ceramid entsteht, der gemeinsame Vorläufer aller GSL und Sphingomyelin. Ceramid erreicht zusammen mit dem Transferprotein CERT (Hanada et al., 2003) die zytosolische Seite der Membran des Golgi-Apparates (Jeckel et al., 1992, van Meer und Lisman, 2002), wo durch die Glucosylceramidsynthase (UDP-Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosyltransferase) eine UDP-aktivierte Glucose (UDP-Glc) auf Ceramid übertragen wird. Von der zytosolischen Seite von Golgi oder ER-Membran transloziert das entstandene Glucosylceramid vermutlich mit Hilfe von *multi-drug*-Transportern (De Rosa et al., 2004, Eckford und Sharom, 2005) auf die luminal Seite, damit im Lumen des Golgi-Apparates die Kohlenhydratkette stufenweise von Glykosyltransferasen über Laktosylceramid (Lannert et al., 1994) zu den übrigen komplexen GSL verlängert werden kann. Die beteiligten Enzyme sind in ihrer Kinetik und Substratspezifität sehr unterschiedlichen, was den Anteil der einzelnen GSL bei der Synthese bestimmt (Bieberich und Yu, 1999).

Genetische Defekte der Biosynthese werden beim Menschen selten beobachtet (Dawkins et al., 2001, Schulz et al., 2006, Simpson et al., 2004), zusammen mit Befunden von verschiedenen *knock-out* Mäusen (Legende zu Abb. 2-1) stützen sie das kombinatorische Biosyntheschema (Pohlentz et al., 1988).

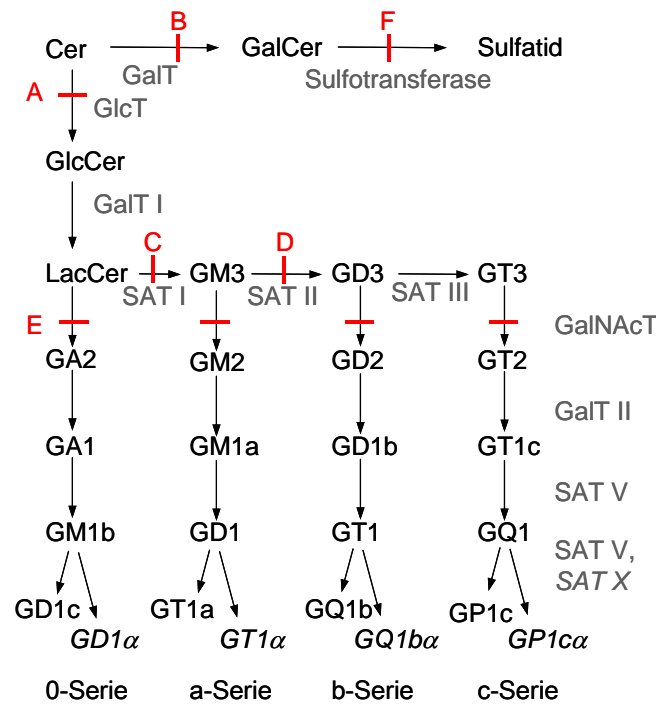


Abb. 2-1 Kombinatorische Biosynthese der Glykosphingolipide, modifiziert nach Kolter et al. (2002), die Nomenklatur der Glykolipide richtet sich nach Svennerholm (1963) und Chester (1997), ein Teil der Strukturen findet sich in Abb. 2-4; G – Gangliosid; A, M, D, usw. – asialo-, mono-, di- = Anzahl der Sialinsäurereste; Einteilung in 0-, a-, usw. Serien gemäß der Anzahl an Sialinsäureresten an der „inneren“ Galaktose (des Laktosylceramids); bei der Sialyltransferase V entsteht eine NeuAc $\alpha$ 2,8NeuAc-Verknüpfung, bei der Sialyltransferase X NeuAc $\alpha$ 2,6GalNAc; Cer – Ceramid; Gal – Galaktosyl; Glc – Glucosyl; Lac – Laktosyl; SA – Sialyl; T – Transferase; A-F bezeichnen Enzymdefekte in *knock-out* Mäusen:

- A: Glucosyltransferase(GlcT) *-/-* (Yamashita et al., 1999);
- B: Galaktosyltransferase (GalT) *-/-* (Bosio et al., 1996, Coetzee et al., 1996);
- C: Sialyltransferase I (SAT I) *-/-* (Yamashita et al., 2003);
- D: Sialyltransferase II (SAT II) *-/-* (Kawai et al., 1998, Kawai et al., 2001);
- E: N-Acetylgalaktosyltransferase (GalNAcT) *-/-* (Sheikh et al., 1999, Takamiya et al., 1996);
- F: Sulfotransferase *-/-* (Honke et al., 2002);
- D+E: *GM3 only* Maus (Kawai et al., 2001);
- C+E: *LacCer only* Maus (Yamashita et al., 2005)

Über exozytotischen Vesikel-Fluß und Verschmelzung mit der Plasmamembran gelangen die GSL schließlich auf die Außenseite der Zelle (van Meer und Lisman, 2002). Dem Umfang nach bedeutender als die *de novo* Synthese ist in den meisten Zellen der Anteil recycelter Abbauprodukte, die wieder in den Biosyntheseweg eingehen (*salvage pathway*) (Gillard et al., 1998, Tettamanti, 2004).

### 2.1.3 Abbau der GSL

Die GSL der Plasmamembran, die für den Abbau bestimmt sind, werden internalisiert. Sie erreichen das lysosomale Kompartiment der Zelle über endozytotischen Vesikelfluß (Maxfield und McGraw, 2004) als Komponenten intraendosomaler oder intralysosomaler Membranen (Fürst und Sandhoff, 1992, Möbius et al., 1999a, b), auf deren Oberfläche saure Exohydrolasen sequentiell die äußeren Zucker der GSL bis zum Ceramid abspalten, das von

## Einleitung

der sauren Ceramidase weiter zu Sphingosin und einer Fettsäure deacyliert wird. Erst die Grundbausteine – Monosaccharide, Sialinsäure, Fettsäuren und Sphingosin – sind in der Lage, das Lysosom zu verlassen, um weiter zerlegt oder in anabolen Stoffwechselprozessen erneut eingesetzt zu werden. Im Unterschied zur Biosynthese, wo die Enzyme und ihre Lipid-Substrate membranständig sind, gilt dies beim Abbau nur für die Substrate, während sich die Hydrolasen gelöst im Lumen der sauren Organellen befinden. Lipide mit kurzen Kohlenhydratketten sind den Hydrolasen sterisch nicht mehr zugänglich, weshalb der Kontakt von Enzym und Substrat durch nicht-enzymatische, wasserlösliche, membranaktive Cofaktoren, die Sphingolipidaktivatorproteine (SAPs), vermittelt wird (Jatzkewitz, 1978, Kolter und Sandhoff, 2005).

Die fortschreitende Azidifizierung des Lysosols (Maxfield und Yamashiro, 1987, Sun-Wada et al., 2003) gewährleistet optimale pH-Bedingungen für die am Abbau beteiligten Hydrolasen.

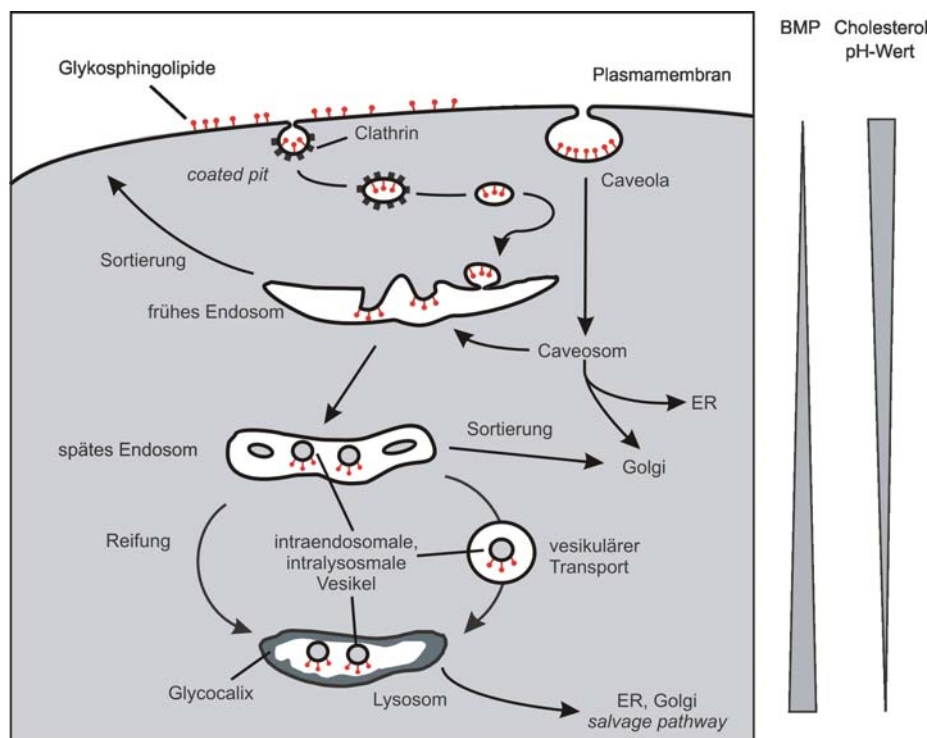


Abb. 2-2 Topologie des lysosomalen Glykosphingolipid-Abbaus, modifiziert nach Kolter und Sandhoff (2005), der Gehalt an BMP steigt, der von Cholesterol sinkt von der Plasmamembran über die intraendosomalen und intralysosomalen Vesikel, parallel dazu werden die Organellen azidifiziert, die pH-Werte verändern sich von ca. pH 7,0 auf der Plasmamembran bis pH 4,2 im Lysosomen; BMP - Bis(monoacylglycero)phosphat; ER – Endoplasmatisches Retikulum

Der luminaler Teil der Perimetermembran des Lysosoms wird von einer Glykocalix aus hochglykosylierten Membranproteinen vor dem Abbau durch lysosomale Enzyme geschützt (Eskelinen et al., 2003), wogegen die intralysosomalen Vesikel durch ihre starke Krümmung und der daraus resultierenden Erniedrigung des Lateraldrucks destabilisiert werden. Ihr

Durchmesser wurde im Gewebe von Sap-Vorläufer-defizienten Patienten mit ca. 50 bis 100 nm bestimmt (Bradová et al., 1993, Giehl et al., 1999). Im Unterschied zu intraendosomalen Vesikeln enthalten die intralysosmalen Membranen kaum noch Cholesterol, dafür ist eine Anreicherung des anionischen Lipids Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) zu beobachten (Kobayashi et al., 1998, Möbius et al., 2003), letzteres wird auch irrtümlich als *Lysobisphosphatididsäure*, LBPA, bezeichnet. BMP (Abb. 2-3) ist in der limitierenden Perimetermembran nicht vorhanden. Es entsteht vermutlich aus dem Abbau von mitochondrialem Cardiolipin und Phosphatidylglycerol (Amidon et al., 1996, Brotherus und Renkonen, 1977) und besitzt in Anwesenheit lysosomaler Phospholipasen aufgrund seiner ungewöhnlichen Stereochemie eine ausreichende Lebensdauer (Matsuzawa und Hostetler, 1979). Auch *in vitro* wurde gezeigt, daß lysosomale, anionische Lipide den GSL-Abbau und die Membranperturbation durch SAPs stimulieren (Hepbildikler et al., 2002, Linke et al., 2001a, Linke et al., 2001b, Locatelli-Hoops et al., 2006, Salvioli et al., 2000, Werth et al., 2001, Wilkening et al., 1998, Wilkening et al., 2000).

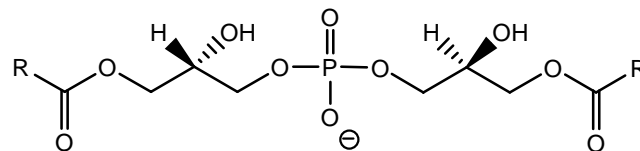


Abb. 2-3 Struktur des sn1,sn1'-Bis(monoacylglycero)phosphats (BMP), R = Alkyl

Aufgrund der Membranzusammensetzung, des pH-Wertes und der Anwesenheit der Aktivatoren findet der Sphingolipid-Katabolismus nur innerhalb des Lysosoms statt und gefährdet nicht die Integrität der Zelle und ihrer Kompartimente.

Eine Ausnahme stellt der streng regulierte Abbau des Sphingomyelins in der Plasmamembran durch die neutrale Sphingomyelinase dar, der hauptsächlich der stress-induzierten Freisetzung von Signalmolekülen dient (Clarke et al., 2006, Riboni et al., 1997).

Der Abbau der Sphingolipide kann auf fast jeder Stufe durch eine Reihe von monogenetischen Erbkrankheiten gestört werden (Abb. 2-4) (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999, Kolter und Sandhoff, 2006). Nach der Speichersubstanz werden sie Sphingolipidosen genannt und gehören zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten, die bisher ca. 40 Varianten umfaßt (Vellodi, 2005).

# Einleitung

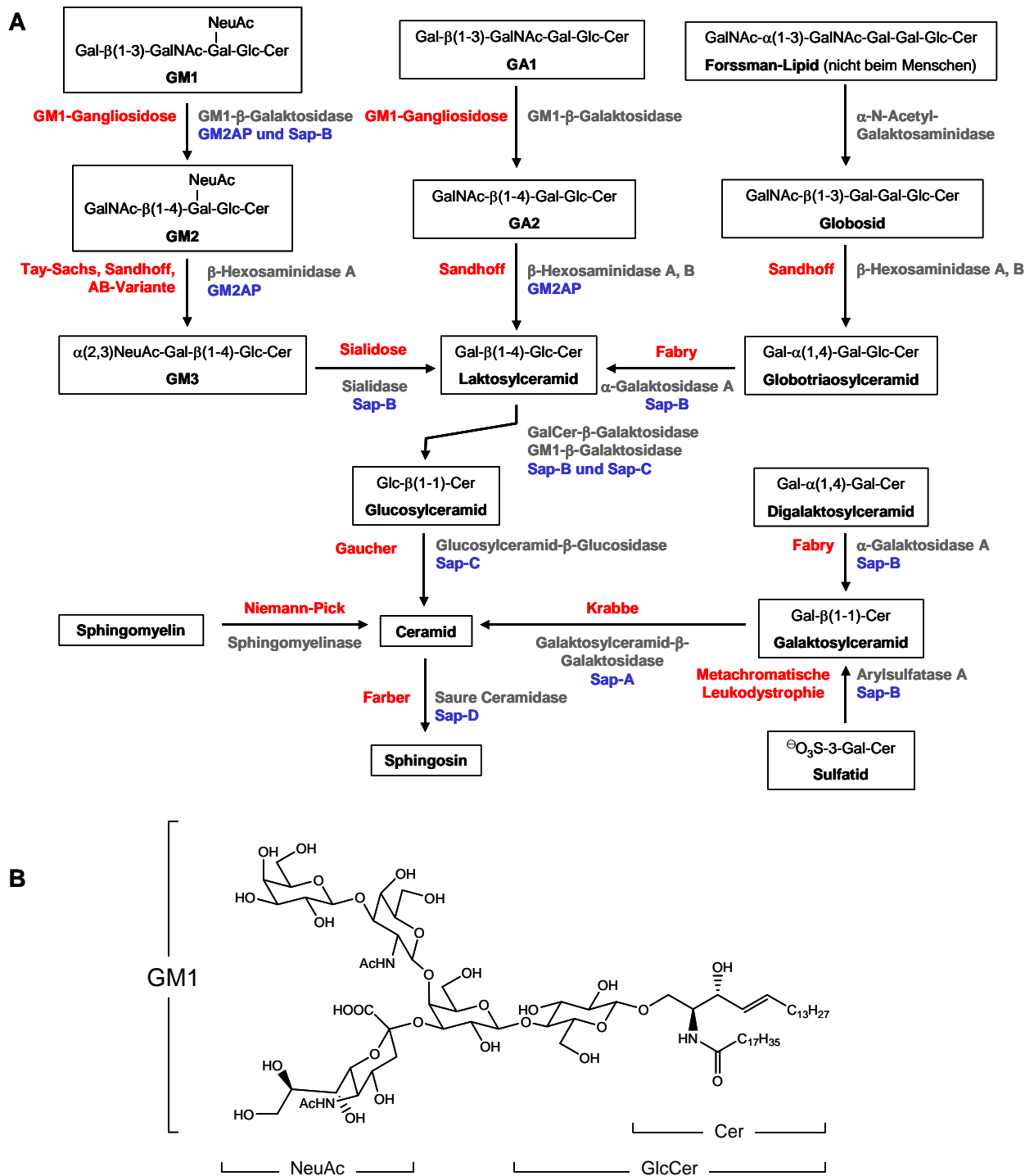


Abb. 2-4 A: Lysosomaler Sphingolipid-Abbau, modifiziert nach Kolter und Sandhoff (2005), angegeben sind die Namen der erblichen Krankheiten (rot), der Enzyme (grau) und der *in vivo* notwendigen Aktivatorproteine (blau)., B: Struktur des Gangliosids GM1; Cer – Ceramid; Gal – Galaktose; GalNAc – N-Acetylgalactosamin; Glc – Glucose; GlcCer – Glucosylceramid; NeuAc – N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure)

Meistens betrifft der Defekt eines der abbauenden Enzyme, das entweder vollständig fehlt oder verminderte Aktivität besitzt. Manchmal ist eine ganze Gruppe von ähnlichen Enzymen betroffen, die falsch sortiert sind oder modifiziert wurden. So fehlt bei der *I-cell disease* der für den Transport vieler lysosomaler Enzyme notwendige Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (Varki et al., 1981). Bei der Multiplen Sulfatase Defizienz findet die posttranslationale



Konversion einer Aminosäure zum aktiven Zentrum nicht statt (Dierks et al., 2003). Auch kann eine falsche Lipidsortierung wie bei Niemann-Pick Typ C die Ursache für eine Sphingolipidose sein. Dort führt wahrscheinlich die defekte Cholesteroltranslokation aus dem Lysosomen heraus indirekt auch zu einer Sphingomyelinspeicherung (Patterson, 2003). Bei Wirkstoff-induzierten Lipidosen vermutet man, daß die korrekt exprimierte saure Sphingomyelinase durch die veränderte Membranzusammensetzung gehemmt und vorzeitig abgebaut wird (Kölzer et al., 2004b).

In selteneren Fällen fehlt bei einer GSL-Speicherung nicht das Enzym, sondern einzelne Aktivatoren oder der gesamte Sap-Vorläufer (2.2.2).

Man findet eine große Variabilität bei der Schwere der Erkrankungen, den betroffenen Organen und den Verlaufsformen (Gieselmann, 2005), die vom spezifischen GSL-Expressionsmuster bzw. der GSL-Aufnahme der Organe und der Restaktivität des betroffenen Enzyms abhängen (Conzelmann und Sandhoff, 1983). Dessen Umsatzrate reicht unterhalb eines kritischen Grenzwerts nicht mehr aus, den Substratfluß ins Lysosom zu verarbeiten wodurch es zur Speicherung der Substrate und auch zur Akkumulation von intralysosomalen Membranstrukturen kommt. Die Entstehung von zytotoxischen, amphiphilen lyso-Verbindungen, die Aktivierung von Entzündungsprozessen, wie auch die veränderte Lipidsortierung werden als verbindende Mechanismen zwischen der Störung auf zellulärer Ebene und der Pathogenese diskutiert (Pagano, 2003, Schueler et al., 2003, Sillence und Platt, 2003).

### **2.2 Sphingolipidaktivatorproteine**

Als Sphingolipidaktivatorproteine bezeichnet man eine Gruppe von sauren Glykoproteinen mit geringem Molekulargewicht, die als membranaktive Cofaktoren des lysosomalen Glykosphingolipidkatabolismus agieren, ohne selbst enzymatische Aktivität zu besitzen (Übersichtsartikel: Kishimoto et al., 1992, Kolter und Sandhoff, 2005). Neben dem GM2-Aktivatorprotein (GM2AP) sind vier weitere SAPs bekannt: die homologen Saposine oder Saps, die durch proteolytische Prozessierung (Abb. 2-5) aus ihrem Vorläufer Prosaposin (pSap) entstehen (Fürst et al., 1988, Nakano et al., 1989, O'Brien et al., 1988). Die Aktivatorproteine spielen auch eine Rolle im Immunsystem bei der Erkennung von Lipidantigenen (Winau et al., 2004, Yuan et al., 2007, Zhou et al., 2004a) und bei der Ausbildung der Permeabilitätsbarriere der Haut (Doering et al., 1999).

### 2.2.1 Entstehung der Saps aus dem Vorläufer

Das pSap-Gen befindet sich auf Chromosom 10 (10q21-22) (Fujibayashi et al., 1985, Inui et al., 1985, Kao et al., 1987), die daraus abgeleitete cDNA (Nakano et al., 1989, O'Brien et al., 1988) ist in Abb. 2-5 dargestellt. Die evolutionäre Entstehung des Vorläufergens aus wahrscheinlich zwei aufeinanderfolgenden Duplikationen (Hazkani-Covo et al., 2002, Rorman et al., 1992) erklärt die hohe Sequenzhomologie (Soeda et al., 1993) der aus jeweils ca. 80 Aminosäuren aufgebauten Saps, wobei Sap-A und -C die höchste (39%), Sap-B zu den anderen Saps dagegen die geringste (15-22%) Sequenz-Übereinstimmung aufweist. Neben den Disulfidbrücken sind die N-Glykosylierungsstellen konserviert, nur Sap-A besitzt zwei (Kishimoto et al., 1992). Je nach Proteinquelle variiert der Zuckergehalt (Kleinschmidt et al., 1987, Sano und Radin, 1988, Sano et al., 1992) bzw. die Struktur der Glykane (Ito et al., 1993, Yamashita et al., 1990). Ihre Funktion ist bisher noch unklar, da unglykosylierte Saps in viele Funktionalitätstests keine Unterschiede zeigen (z.B. Sap-A: Morimoto et al., 1989, Sap-B: Hiraiwa et al., 1993, Norris et al., 2005, Whitelegge et al., 2003, Sap-C: Qi et al., 1994, Sano und Radin, 1988, Weiler et al., 1993 Sap-D: Tatti et al., 1999). Diskutiert werden der Schutz vor proteolytischem Abbau (Herbst et al., 2004), die Unterstützung des korrekten Faltungsprozesses (Hiraiwa et al., 1993) oder die Stabilisierung der Tertiärstruktur und der Einfluß auf Membran- und Lipidbindungseigenschaften der Saps (Locatelli-Hoops et al., 2006). Durch alternatives Spleißen des Exons 8 entstehen entwicklungsabhängig und gewebespezifisch drei Varianten, die sich innerhalb des für Sap-B codierenden Bereichs um bis zu 9 bp unterscheiden (Holtschmidt et al., 1991, Zhao et al., 1997), und die zu stabilen und ähnlich aktiven, reifen Sap-B-Isoformen prozessiert werden (Henseler et al., 1996a). Es wurde vermutet, daß der pSap-Polymorphismus die Sphingolipid-Bindungsspezifität von Sap-B verändert und sich die Zelle auf diese Weise an die gegebene Lipidzusammensetzung anpaßt (Lamontagne und Potier, 1994).

Ein Teil des Sap-Vorläufers, ein 70 kDa-Glykoprotein, gelangt über ER und Golgi, mittels Sortilin (Lefrancois et al., 2003) oder Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (Vielhaber et al., 1996), direkt in die Lysosomen, der größere Teil (ca. 60%) (Henseler et al., 1996a) wird nach Sekretion über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, über LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*) (Hiesberger et al., 1998, Kiss et al., 2006) oder über den Mannose-Rezeptor ins Lysosomen reendozytiert, der bevorzugte Weg ist zelltypabhängig (Laurent-Matha et al., 2002). Im Lysosom findet die proteolytische Prozessierung in die einzelnen ca. 8-11 kDa großen Sap-Domänen statt (Fujibayashi und Wenger, 1986, Fürst et al., 1988, Leonova et al., 1996, O'Brien et al., 1988, Sano et al., 1989).

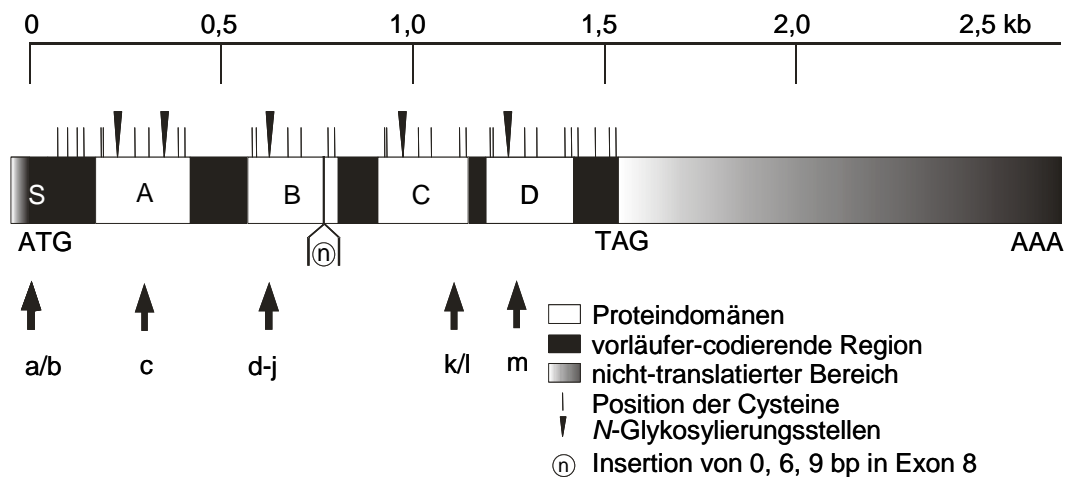


Abb. 2-5 Struktur der pSap-cDNA, modifiziert nach Sandhoff et al. (2001); die cDNA codiert für eine Sequenz von 524-527 (je nach Spleißvariante Holtschmidt et al., 1991) Aminosäuren einschließlich eines Signalpeptids (S) von 16 Aminosäuren für den Eintritt in das ER (Fürst und Sandhoff, 1992), A-D: Sap-A, -B, -C und -D; ATG - Translationsstart; TAG - Translationsstop; AAA – Polyadenylierungsregion; die Positionen der bekannten Mutationen sind durch Pfeile gekennzeichnet (die Zählung der Basenpaar(bp)- bzw. Aminosäureposition erfolgt anhand der Variante mit 9 bp in Exon 8).

- a: A1T (Met1Leu) (Elleder et al., 2005, Schnabel et al., 1992);
- b: (Gln50X) (Millat et al., 2003);
- c: 3-bp-Deletion 208\_210delGTC (Val70del) (Spiegel et al., 2005);
- d: G-T-Transversion der 3'-Akzeptor-Spleiß-Stelle am Übergang von Intron e zu Exon 6 (Henseler et al., 1996b);
- e: A643C (Asn215His) (Wrobe et al., 2000);
- f: C645A (Asn215Lys) (Regis et al., 1999);
- g: C650T (Thr217Ile) (Kretz et al., 1990, Rafi et al., 1990);
- h: G722C (Cys241Ser) (Holtschmidt et al., 1991);
- i: 33-bp-Insertion nach G777 (elf zusätzliche Aminosäuren nach Met259) (Zhang et al., 1990, 1991);
- j: 1-bp-Deletion 803delG (Hulkova et al., 2001);
- k: G1154T (Cys385Phe) (Schnabel et al., 1991);
- l: T1155G (Cys385Gly) (Rafi et al., 1993);
- m: C1297T (Gln433X) (Diaz-Font et al., 2005)

Der Sap-Vorläufer selbst findet sich unprozessiert bevorzugt in Hirn, Herz und Muskeln (Sano et al., 1989), außerdem extrazellulär in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Hineno et al., 1991, Kishimoto et al., 1992, Kondoh et al., 1991, Sylvester et al., 1984). Die einzelnen Saps dagegen sind in den späten Endosomen und Lysosomen aller Zelltypen lokalisiert, treten aber in abbauenden Organen wie Leber, Nieren und Milz verstärkt auf; auch gelangen sie bei Patienten mit lysosomalen Speicherkrankheiten ins Plasma (Chang et al., 2000), in den Urin (Li et al., 1985), oder werden in den Lysosomen angereichert (Inui und Wenger, 1983, Morimoto et al., 1990, Shigematsu et al., 1990, Tyynela et al., 1993).

### 2.2.2 Struktur und Funktion

Alle Aktivatoren sind membranaktiv aber auch wasserlöslich, was sie in die Lage versetzt, an der Grenzfläche zwischen Lipid und Wasser zu agieren und dabei je nach Spezifität Lipide zu binden, zu transportieren und Membranstrukturen zu verändern (Vaccaro et al., 1999).

## Einleitung

---

Beim Abbau von Glykosphingolipiden mit kurzer Oligosaccharidkette ( $\leq 4$  Zucker (Conzelmann und Sandhoff, 1987, Wilkening et al., 2000), die nach Endozytose als Bestandteil intralysosomaler Membranstrukturen vorliegen, machen die Aktivatoren diese als Substrate für lysosomale Hydrolasen zugänglich (Sandhoff und Kolter, 1996). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind für jedes Aktivatorprotein unterschiedlich und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hinweise auf die physiologischen Aufgaben der SAPs lieferten pathologische Mutationen beim Menschen (Abb. 2-5, und Sandhoff et al., 2001), mittlerweile dienen auch *knock-out* Mäuse als Modell (aufgeführt bei den einzelnen Aktivatoren).

Die Aktivatoren verbinden darüberhinaus Lipidstoffwechsel und Immunsystem miteinander, da sie für die Beladung von Molekülen der CD1-Familie mit Lipid-Antigenen und deren anschließender Präsentation auf der Plasmamembran essentiell sind (Kolter et al., 2005). In den Lysosomen sollen sie endozytierte Lipide aus der intralysosomalen Membran extrahieren und sie zu den in der Perimetermembran verankerten CD1-Molekülen transportieren, die dann zur Zelloberfläche wandern und - ähnlich den MHC-gebundenen Peptid-Antigenen - als Komplex eine Immunantwort hervorrufen. Die CD1-Moleküle des Menschen verteilen sich auf zwei Gruppen: CD1a, b und c werden von cytolytischen T-Lymphozyten erkannt, während CD1d NKT-Zellen (*natural killer T-cells*) aktiviert, die Effektor- und Regulationsfunktionen vereinen (Brigl und Brenner, 2004). Die Beladung von CD1b mit mykobakteriellen Lipiden wird von Sap-C vermittelt, beide Proteine scheinen auch direkt miteinander zu interagieren (Winau et al., 2004). Der Transfer von  $\alpha$ -Galaktosylceramid und anderen Lipiden auf CD1d ist von allen Saps und dem GM2-Aktivator abhängig, die sich anscheinend ergänzen, auch wenn Sap-B am effektivsten agiert (Kang und Cresswell, 2004, Kronenberg, 2004, Yuan et al., 2007, Zhou et al., 2004a, Zhou et al., 2004b).

Die vier Saps teilen Strukturmerkmale mit einer Reihe von funktionell unterschiedlichen Proteinen, den SAPLIPs (*saposin-like proteins*) (Kolter et al., 2005, Munford et al., 1995), während das GM2AP nicht homolog ist, sondern eine eigenständige  $\beta$ -cup Struktur besitzt (Wright und Li, 1997, Wright et al., 2000, Wright et al., 2003, Wright et al., 2005). Hochkonservierte strukturelle Elemente, die erstmals für NK-Lysin (Liepinsh et al., 1997) und mittlerweile über NMR oder Röntgenstrukturanalyse für alle Saps nachgewiesen wurden (Ahn et al., 2003, Ahn et al., 2006, de Alba et al., 2003, John et al., 2006) – nämlich Disulfidbrücken (Sano et al., 1992, Stevens et al., 1993, Vaccaro et al., 1995b), Helixbündel (Waring et al., 1998) und ein hydrophober Kern. Die Interaktion mit Membranen und Lipiden sind für die SAPLIPs charakteristisch, ohne daß mit der Strukturähnlichkeit unbedingt eine

hohe Sequenzhomologie verbunden sein muß. Spezifität und Mechanismus werden vermutlich durch unterschiedliche Oberflächenpotentiale, Tertiärstrukturen und Oligomerisierungstendenzen moduliert (Bruhn, 2005). Das SAPLIP-Motiv kann auch als Domäne innerhalb eines größeren Enzyms auftreten. Wahrscheinlich benötigt die lysosomale saure Sphingomyelinase keinen separaten Aktivator (Kölzer et al., 2004a, Ponting, 1994), da sie über eine eigene aktivatorähnliche Domäne verfügt.

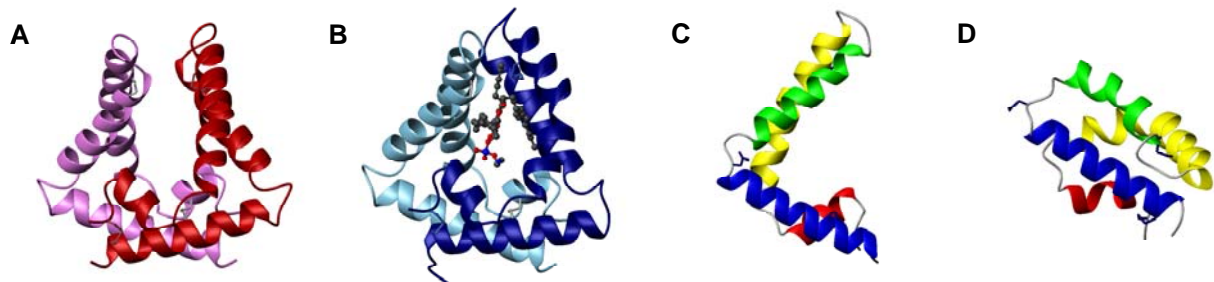


Abb. 2-6 Kristallstruktur von Sap-B: offenes CC-Dimer (A) und geschlossenes AB-Dimer (A ist hellblau, B dunkelblau dargestellt), in der Bindungstasche befindet sich ein gebundenes Phosphatidylethanolamin; Sap-B (C-Monomer) (C) und Sap-C (D) im Vergleich, die Helices 1 bis 4 sind blau, grün, gelb und rot dargestellt, dunkelblau die Disulfidbrücken und der Asparaginrest der potentiellen Glykosylierungssequenz; modifiziert nach Ahn et al. (2003, 2006)

Bei Sap-A, -C und -D sind die Helices 2-4 (oft wird ihre Helix 3 wegen eines konservierten, flexiblen „Knicks“ als zwei Helices interpretiert) halbkugelförmig um Helix 1 angeordnet und bilden so eine geschlossene Form mit kleinem, hydrophobem Kern (Abb. 2-6, C) und mit relativ negativem Oberflächenpotential, das auf die Membranbindung entscheidend Einfluß nimmt. Der Erhalt der kompakten Struktur durch korrekt verknüpfte Disulfidbrücken (Konnektivität: 1. und 6., 2. und 5., 3. und 4. Cystein) verleiht den Saps Stabilität gegenüber hohen Temperaturen, Säuren und Proteasen und ist entscheidend für ihre Funktionalität.

Oligomerisierung ist bei der Membraninteraktion der SAPLIPs eine häufig angewandte Strategie: zwei SP-B-Moleküle (*surfactant protein B*)–Regulatoren der Oberflächenspannung des Lungensurfactants - sind kovalent über eine Disulfidbrücke verknüpft (Cochrane und Revak, 1991, Serrano et al., 2005), während lytische Amöbapore innerhalb der Membran zu ringförmigen Poren aggregieren (Gutsmann et al., 2003).

Auch Sap-B existiert konstitutiv als Dimer (Ahn et al., 2003, John et al., 2006), auch wenn es konzentrationsabhängig, vorallem bei neutralen pH-Werten, zur unspezifischen Aggregation neigt (Fischer und Jatzkewitz, 1975, Fluharty et al., 1992). In den monomeren Bausteinen bilden vier  $\alpha$ -Helices eine offene, V-förmige Struktur mit einer „Basis“ und einer flexibleren „Haarnadel“ aus, die in geringfügig unterschiedlichen Konformationen (A, B und C) vorliegen kann (Abb. 2-6). An der Basis sind die Monomere stabil miteinander verbunden, die Positionen der übrigen Helices ändern sich beim Übergang von der offenen, symmetrischen

## Einleitung

---

(CC) in die geschlossene Form (AB) bei der Bindung eines Lipids. Die konkaven, hydrophoben Innenseiten der Monomere bilden dabei eine Bindungstasche, die größer ist als der hydrophobe Kern der anderen Saps (Ahn et al., 2003).

Das **GM2AP** wird als Liftase (Fürst und Sandhoff, 1992) beschrieben: es bindet das Gangliosid GM2, löst es aus der Membran und präsentiert es in einem wasserlöslichen 1:1-Komplex der  $\beta$ -Hexosaminidase A zum Abbau (Conzelmann und Sandhoff, 1979, Conzelmann et al., 1982). Aufgrund der Strukturaufklärung (Wright et al., 2000) und der Markierung des GM2AP mit Photoaffinitätsliganden (Wendeler et al., 2004a) sind die einzelnen Schritte bekannt. Die offene Form des Aktivators inseriert über hydrophobe Loops in die Membran, bevorzugt an Stellen negativer Ladung. Über die Lipiderkennungsstelle wird der Kohlenhydratanteil des Substrates gebunden und sein Ceramidteil in der hydrophoben Tasche fixiert. Beim Herauslösen des GM2 aus der Membran geht der Aktivator in die geschlossene, hydrophilere Form über. Dieser Komplex ist das eigentliche Substrat für die  $\beta$ -Hexosaminidase A (Meier et al., 1991, Wendeler et al., 2006, Zarghooni et al., 2004). Ein weiteres physiologische Substrat des GM2AP ist GA2 (Bierfreund et al., 1999). Beide Ganglioside GM2 und GA2 werden gespeichert, wenn ein erblicher Defekt des GM2AP vorliegt (Abb. 2-4), der als AB-Variante der GM2-Gangliosidose bezeichnet wird (Chen et al., 1999, Conzelmann und Sandhoff, 1979, Schepers et al., 1996, Schröder et al., 1991, Schröder et al., 1993, Xie et al., 1992). Zusammen mit Sap-B ist das GM2AP auch am Abbau des Gangliosids GM1 durch  $\beta$ -GM1-Galaktosidase beteiligt, im Experiment und wahrscheinlich auch *in vivo* können sich beide Aktivatorproteine gegenseitig ersetzen (Wilkening et al., 2000), denn der Mangel eines der beiden Aktivatoren ruft keine GM1-Speicherung hervor. Gleichzeitiges Fehlen von GM2AP und Sap-B wurde *in vivo* bisher weder beobachtet noch im Mausmodell nachgestellt.

Neben den Gangliosiden GM1 und GM2 kann der GM2-Aktivator - wenn auch mit geringerer Affinität - GM3, GD1a oder GA2 in 1:1-Komplexe binden und transferieren (Conzelmann et al., 1982). Seine Membranaktivität hängt entscheidend von physiologischen Faktoren ab, besonders von Lateraldruck ( $<25$  mN/m, Filmwaagemessung; Giehl et al., 1999) und starker Krümmung der Membran (Kolter und Sandhoff, 1998), der Anwesenheit anionischer Lipide (Werth et al., 2001) - vor allem des lysosomen-spezifischen BMP - und vom pH-Wert (Optimum bei 4,2, Bierfreund et al., 1999), ein Wert, der ebenfalls für Lysosomen typisch ist.

Beim Menschen gibt es mehrere Fälle einer vollständigen Defizienz von **pSap** und folglich auch der einzelnen Saps A-D (Elleder et al., 2005, Harzer et al., 1989, Hulkova et al., 2001, Millat et al., 2003, Schnabel et al., 1992; Abb. 2-5, a, b, j) Sie führt zur einer generalisierten Speicherung aller Sphingolipide mit kurzen Kohlenhydratketten und der Anhäufung von intralysosomalen, multivesikulären Membranstrukturen im Lysosom (Bradová et al., 1993, Harzer et al., 1989), beides kann durch die Fütterung von exogenem Vorläufer an pSap  $-/-$  Fibroblasten in Zellkultur aufgehoben werden (Burkhardt et al., 1997). Im Säuren ist der Vorläufer in der Lage, Ganglioside zu binden und zu transportieren und auch den enzymatischen GSL-Abbau zu stimulieren (Hiraiwa et al., 1992), im sauren bis neutralen liegt pSap als Komplex mit Procathepsin D vor (Gopalakrishnan et al., 2004, Locatelli-Hoops, 2006).

Bei einem pSap  $(-/-)$  Mausmodell (Fujita et al., 1996) wird neben der generalisierten GSL-Speicherung auch ein Defekt der Permeabilitätsbarriere der Haut gefunden (Doering et al., 1999). Die Wasserbarriere ist in der äußersten Schicht der Epidermis, dem *stratum corneum*, lokalisiert und wird aus einer durch Proteine quervernetzten, extrazellulären Lipidmatrix gebildet, die aus Cholesterol und langkettigen, oft  $\omega$ -acylierten Ceramiden (Holleran et al., 2006, Wertz et al., 1985) besteht. Durch die Defizienz des Vorläufers wird kein Sap-C gebildet, verschiedene Glucosylceramidspezies akkumulieren und die Hautmorphologie und -entwicklung werden entscheidend gestört (Doering et al., 1999, Holleran et al., 1994, Schuette et al., 2001).

Sekretiertes pSap hat lipidstoffwechselunabhängige Funktionen bei der Entwicklung und beim Schutz bestimmter Zellen und Organe: so ist es an der Regulation der Spermatogenese und der Entwicklung der männlichen Reproduktionsorgane beteiligt (Morales et al., 2000a, 2000b), und es werden myelinotrophe (Hiraiwa et al., 1999), myotrophe (Rende et al., 2001) neurotrophe oder -protektive (Campana et al., 1998a, 2000, Lapchak et al., 2000, O'Brien et al., 1994, Sano et al., 1994, Sikora et al., 2007, Unuma et al., 2005) Eigenschaften für pSap diskutiert, die es anscheinend über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden ausübt (Campana et al., 1996, 1998b, 1999, Hiraiwa et al., 1997, Koochekpour et al., 2004, 2005, Lee et al., 2004, Misasi et al., 2001, 2004, Morales und Badran, 2003). Zwischen Untersuchungen *in vitro*, in Zellkultur und im lebenden Organismus gibt es bislang allerdings Differenzen (Sun et al., 2002, Kolter et al., 2000).

**Sap-A** ähnelt in seiner Sequenz und Funktion Sap-C, besitzt aber zwei Glykosylierungsstellen. Es ist für den Abbau von Galaktosylceramid durch die

Galaktosylceramid- $\beta$ -Galaktosidase *in vivo* essentiell (Spiegel et al., 2005). Darüberhinaus unterstützt es *in vitro* den Abbau von Galaktosylsphingosin durch das gleiche Enzym (Harzer et al., 2001) und von Glucosylceramid durch die Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase (GlcCerase) (Morimoto et al., 1989). Zusammen mit Sap-C wirkt es synergistisch, aber weniger effektiv und anscheinend über einen anderen Aktivierungsmechanismus (Vaccaro et al., 1997). Die Stimulierung des GSL-Abbaus durch Sap-A wird vermutlich wie bei Sap-C durch direkte Interaktion von Cofaktor und Enzym erreicht, die Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase besitzt eine Bindungsstelle für beide Saps (Weiler et al., 1995).

Die erbliche Defizienz von Sap-A führt zu einer infantilen Variante der Krabbe'schen Erkrankung (Abb. 2-4), die durch die Speicherung von Galaktosylceramid und Galaktosylsphingosin und schwerwiegenden Störungen der Myelinierung gekennzeichnet ist. Als molekulare Ursache wurde bei dem bisher einzigen Patienten eine Deletion festgestellt, die zum Verlust eines hochkonservierten Valins (Abb. 2-5) führte (Spiegel et al., 2005). Im Mausmodell verursacht auch die Zerstörung einer Disulfidbrücke (Cys106Phe) die Ausbildung der Krabbe-Krankheit (Matsuda et al., 2001). Beide Protein-Varianten haben eine dem Wildtyp-Protein gegenüber verminderte Fähigkeit, Lipide aus Membranen zu lösen, die als Bestandteil immobilisierter Liposomen dargeboten werden. Durch fehlende Glykosylierung wird diese Fähigkeit ebenfalls stark beeinträchtigt, die Membran-Anbindung dagegen steigt. Damit konnte für den Kohlenhydrat-Anteil von Sap-A erstmals eine entscheidende Funktion bei dessen Interaktionen mit Membranen gezeigt werden (Locatelli-Hoops et al., 2006).

**Sap-B** wirkt als relativ unspezifisches physiologisches Detergenz (Fischer und Jatzkewitz, 1977, Fürst und Sandhoff, 1992), das *in vivo* den Abbau von Sulfatid durch die Arylsulfatase A und den von Globotriaosyl- und Digalaktosylceramid durch die  $\alpha$ -Galaktosidase A stimuliert (Gärtner et al., 1983, Li et al., 1985, Mehl und Jatzkewitz, 1964, Schlote et al., 1991, Vogel et al., 1987, Wenger et al., 1989), ohne mit den Enzymen selbst zu interagieren (Fischer und Jatzkewitz, 1977) (Abb. 2-4). Mit anderen SAPs zusammen ist es auch am Abbau der Ganglioside GM1 (Wenger und Inui, 1984, Wilkening et al., 2000), GM3 (Wenger et al., 1989) und Laktosylceramid (Li et al., 1985, Sadeghlar et al., 2003, Zschoche et al., 1994) beteiligt, *in vitro* akzeptiert es ein noch breiteres Spektrum an Substraten (Fingerhut et al., 1992, Li et al., 1988, Vogel et al., 1991).

Der größte Teil der bekannten Mutationen des pSap-Gens fällt in den für Sap-B codierenden Bereich. Bis auf einen Fall (Hulkova et al., 2001) – dem Ausfall des gesamten pSaps -



resultiert daraus eine Sap-B-Defizienz, die bei den Patienten das Krankheitsbild der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD) auslöst, die durch die Speicherung von Sulfatid und Globotriaosylceramid charakterisiert ist (Abb. 2-5, d-i). In drei Fällen sind dafür Punktmutationen verantwortlich, die auf Proteinebene die einzige Glykosylierungsstelle von Sap-B eliminieren (Kretz et al., 1990, Rafi et al., 1990, Regis et al., 1999, Wrobe et al., 2000). Sap-A, -C und -D sind in normalen Mengen im Lysosomen vorhanden, also wird der Vorläufer korrekt sortiert und prozessiert. Da aber auch variantes Sap-B detektiert wurde (Wrobe et al., 2000), müssen dessen abweichenden Eigenschaften die Abbaublockade verursachen.

Schon früh wurde erkannt, daß Sap-B als „Substratcarrier“ (Fürst und Sandhoff, 1992) wasserlösliche 1:1-Komplexe mit Lipiden ausbildet (Fischer und Jatzkewitz, 1977, Mitsuyama et al., 1985), daß deren Bildung durch Ceramid, Phosphatidylcholin und -serin kompetitiv gehemmt werden kann, und daß diese Komplexe das Substrat für die lysosomalen Hydrolasen darstellen (Fischer und Jatzkewitz, 1978). Die Extraktion und Bindung der Lipide geht mit dem Übergang von der offenen in die geschlossene Konformation des Sap-B-Dimers einher (Ahn et al., 2003) und wird durch sauren pH-Wert und anionische Lipide begünstigt (Vaccaro et al., 1995a). Ohne Sap-B sind Arylsulfatase A und - in Abwesenheit auch des GM2AP - GM1- $\beta$ -Galaktosidase ihren physiologischen Substraten gegenüber kaum aktiv. Dies ändert sich erst, wenn die Substrate als lyso-Verbindung oder mit kurzen Acylketten vorliegen, die weniger fest in der Membran verankert und besser löslich sind, die also die Membran ohne die Vermittlung von Sap-B verlassen können (Vogel et al., 1991). In Abwesenheit von Enzymen transportiert Sap-B GSL und Phospholipide aus Donor- zu Akzeptor-Membranen (Ciaffoni et al., 2006, Vogel et al., 1991). Sap-B bindet schwächer an Membranen als z.B. Sap-C und -D (Vaccaro et al., 1995a) und es bedarf höherer Konzentrationen, um Membranzustandänderungen zu erreichen (Alattia et al., 2006).

**Sap-C** ist der allosterische Aktivator der Glucosylceramid- $\beta$ -Glucosidase beim Abbau von Glucosylceramid (Ho und O'Brien, 1971, Qi und Grabowski, 1998). Es vermittelt die Anbindung der Glucosidase an anionische, vor allem BMP-haltige Membranen (Chu et al., 2005, Salvioli et al., 2000, 2005, Vaccaro et al., 1993, Wilkening et al., 1998) und bringt so Enzym und Substrat in Kontakt, andererseits scheint Sap-C nur dann an das Enzym zu binden, wenn es selbst membrangebunden ist (Vaccaro et al., 1995a). Fehlen sowohl Sap-C als auch anionischen Lipide, ist das Enzym *in vitro* vollständig inaktiv (Wilkening et al., 1998). Bei den zwei bisher bekannten Sap-C-Defizienzen (Abb. 2-5, k, l) ist auf Proteinebene kein Sap-C

detektierbar und es läuft Glucosylceramid in den Lysosomen auf (Abb. 2-4), in der Folge entwickelt sich eine untypische Form der Gaucher'schen Erkrankung (Christomanou et al., 1989, Rafi et al., 1993, Schnabel et al., 1991).

Eine weitere Funktionen von Sap-C ist zusammen mit Sap-B die Aktivierung des Laktosylceramidabbaus (Zschoche et al., 1994). *In vitro* stimuliert Sap-C außerdem die saure Ceramidase (Klein et al., 1994, Linke et al., 2001b), die Sphingomyelinase (Christomanou et al., 1986, Linke et al., 2001a) und die Galaktosylceramid- $\beta$ -Galaktosidase (Christomanou et al., 1986, Wenger et al., 1982). Glykosylierte und unglykosylierte Proteinspezies zeigen bei diesen Versuchen kein unterschiedliches Verhalten (Qi et al., 1994, Sano und Radin, 1988, Weiler et al., 1993).

Mittels Sap-C-Varianten und abgeleiteter synthetischer Peptide, „Prosaptide“, (Campana et al., 1996, Misasi et al., 1996) konnten bindende und aktivierende Aminosäuresequenzen auf der N-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert werden (Kotani et al., 1996, Weiler et al., 1993, 1995), während sich in der C-terminalen Region der Sap-C-Domäne die Bereiche befinden, die für die neurotrophen Eigenschaften des pSap verantwortlich sind (Qi et al., 1996).

Sap-C ist in der Lage, unterschiedliche Ganglioside, bzw. GSL aus Mizellen oder Donormembranen zu extrahieren, zu binden und zu Akzeptormembranen zu transportieren (Hiraiwa et al., 1992, Soeda et al., 1993). Es bindet unterhalb eines pH-Wertes zwischen 5 und 6 reversibel an Phospholipid-Vesikel (de Alba et al., 2003, Vaccaro et al., 1995a, 1999). Wenn diese anionische Lipide enthalten, werden sie destabilisiert, umstrukturiert und fusionieren (Alattia et al., 2006, Vaccaro et al., 1994, You et al., 2004).

**Sap-D** stimuliert den Abbau von Ceramid durch die lysosomale saure Ceramidase in Zellkulturexperimenten (Klein et al., 1994) und *in vitro* (Azuma et al., 1994, Linke et al., 2001b) (Abb. 2-4), *in vitro* wird darüber hinaus zusätzlich der Abbau von Sphingomyelin durch die saure Sphingomyelinase unterstützt (Linke et al., 2001a, Morimoto et al., 1988). Zwar ist bisher kein Krankheitsfall allein aufgrund einer Sap-D-Defizienz bekannt, allerdings führt ein zu frühes Stop-Codon im Sap-D-codierenden Bereich (Abb. 2-5, m) eines Allels zu einer Halbierung des pSap-mRNA-Levels (Diaz-Font et al., 2005), kombiniert mit dem Ausfall von Sap-C auf dem anderen Allel führt dies zum unter Sap-C bereits erwähnten untypischen Gaucher-Krankheitsfall (Rafi et al., 1993). Die physiologisch relevante Funktion des Sap-D scheint die Aktivierung des Ceramidabbaus zu sein (Abb. 2-4), da eine Sap-D -/- Maus Ceramide mit  $\alpha$ -hydroxylierten Fettsäuren speichert (Matsuda et al., 2004).

Hauptsächlich sind von der Speicherung Nieren und die Purkinje-Zellen des Gehirns betroffen, die im Krankheitsverlauf degenerieren. Die bei der *knock-out* Maus eingeführte Mutation führt auf Proteinebene (C509S) zur Zerstörung einer Disulfid-Brücke, offensichtlich ist diese Variante aber labil und wird abgebaut, da kein variantes Sap-D detektierbar ist. Überraschenderweise stellt diese Maus kein Modell für die humane Farber'sche Erkrankung dar, bei der die Defizienz der sauren Ceramidase zwar ebenfalls zur Speicherung verschiedener Ceramide führt, aber hauptsächlich Haut, Leber und Milz betroffen sind. Wahrscheinlich besitzt noch ein weiteres Sap mit abweichender Fettsäure-Spezifität physiologische Relevanz beim Ceramid-Abbau, wie das in Zellkultur aktive Sap-C (Klein et al., 1994). Bei gleichzeitigem Ausfall von Sap-D und -C im Mausmodell wird Glucosylceramid und Ceramid gespeichert und der Vorläufer falsch sortiert, der Phänotyp ist dabei etwas milder als bei einer pSap-Defizienz (Sun et al., 2007). Sap-D ist in der Lage, bei saurem pH Phospholipid-Liposomen zu solubilisieren (Ciaffoni et al., 2001), die anionischen Lipiden enthalten (Ciaffoni et al., 2003). Die Bindung des Saps an die Membran scheint unabhängig von dessen Glykosylierung zu sein (Tatti et al., 1999) und wird durch Ceramide nicht erhöht (Ciaffoni et al., 2003).

### 2.3 Biophysikalische Methoden zur Charakterisierung von Sap-B und -D

#### 2.3.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS), auch als Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) oder Quasielastische Lichtstreuung (QELS) bezeichnet, ist eine Methode zur Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln in Lösung anhand ihrer Diffusionseigenschaften. Dazu wird das von ihnen gestreute Laserlicht zeitaufgelöst gemessen und analysiert (Berne und Pecora, 2000).

Die Streuintensität ( $I$ ) eines Partikels hängt u.a. von seinem Durchmesser ( $d$ ), der Wellenlänge ( $\lambda$ ) des eingestrahlt Lichts und dem Meßwinkel ab. Findet keine Energieübertragung zwischen Licht und Partikel statt, ändern sich Wellenlänge und Kohärenz durch die Streuung also nicht, wird sie als „elastisch“ bezeichnet. Außerdem muß sich der Brechungsindex des Teilchens von dem der umgebenden Flüssigkeit unterscheiden, da in idealen, homogenen Medien keine Streuung auftritt. Bei der Messung in wäßriger Lösung (Brechungsindex 1,33) sind deshalb Proteine (ca. 1,37) bei gleichzeitiger Anwesenheit von Lipiden (ca. 1,45; Ardhammar et al., 2002) schlecht zu detektieren.

Ist ein Partikel im Verhältnis zur Wellenlänge klein ( $d < \lambda/10$ ), wird das Licht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Die Intensität ist proportional zur sechsten Potenz des Durchmessers ( $I \sim d^6$ ) und hängt außerdem von der Wellenlänge ab ( $I \sim \lambda^4$ ), die

## Einleitung

---

allerdings bei der Messung konstant bleibt. Bei Partikeln, deren Durchmesser in der Größenordnung der Wellenlänge liegt (Mie-Streuung), ist die Winkelabhängigkeit komplizierter, der größte Teil des Lichts wird aber vorwärts, also in die Richtung des eingestrahnten Lichtes gestreut und hängt nicht mehr so stark vom Teilchendurchmesser ab ( $I \sim d^2$ ).

Wenn mehrere Teilchen mit monochromatischem, kohärentem Licht bestrahlt werden, interferiert ihr Streulicht und die detektierte Intensität hängt neben der Anzahl und Größe der Teilchen von ihrer relativen Position ab. Je schneller sich diese räumliche Verteilung durch Diffusion ändert, um so schneller fluktuiert auch die detektierte Intensität (Doppler-Effekt). Die zufällige Bewegung von Partikeln in einer Flüssigkeit (Brown'sche Molekularbewegung) hängt über die Stokes-Einstein-Beziehung mit deren Radius zusammen:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

$R_H$	hydrodynamischer Radius
$k$	Boltzmann Konstante
$T$	Temperatur
$\eta$	Viskosität der Flüssigkeit
$D$	Diffusionskoeffizient

Der hydrodynamische Radius ist dabei nur eine scheinbare Größe, die eine hypothetische harte Kugel mit dem gleichen Diffusionskoeffizienten beschreibt, wie sie das reale, meist unsymmetrische und solvatisierte Teilchen besitzt. Anhand empirischer Kalibrierungskurven kann man für verschiedene Substanzklassen aus dem hydrodynamischen Radius das Molekulargewicht (MW) abschätzen, für globuläre Proteine gilt (Handbuch zur Dynamics Software, Wyatt Technology Corp.):  $MW \text{ (kDa)} = [1,6800 \times R_H \text{ (nm)}]^{2,3398}$ .

Die zeitliche Intensitätsfluktuation wird durch die sogenannte „Autokorrelation“ (Schätzel, 1987) statistisch ausgewertet (Abb. 2-7, A). Dabei werden die Meßwerte zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen: nach kurzen Zeitabständen haben sich die Teilchen nur wenig bewegt, und die Meßwerte sind ähnlich, d.h. sie korrelieren stark (die Identität wird auf 1 normiert). Durch die Diffusion nimmt die Korrelation mit der Zeit aber ab bis sie den Nullwert erreicht, dann sind die Positionen der Teilchen völlig zufällig und nicht mehr von der Ausgangsverteilung ableitbar. Wie lange dieser Prozeß dauert, hängt demnach von der Diffusionsgeschwindigkeit ab. Die exponentiell abfallenden Korrelationskurven jeder Partikelpopulation überlagern sich zur resultierenden Meßkurve (Abb. 2-7, B), die

mathematisch zerlegt wird und dann die gesuchte Größenverteilung bei polydispersen Lösungen wiedergibt (Abb. 2-7, C, D).

In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Größe von Liposomen, die Aggregatbildung von Saps und die Veränderung der Liposomen nach der Zugabe der Saps zu charakterisieren. Die Abbildungen zeigen repräsentative Meßdaten von mindestens 5 Messungen.

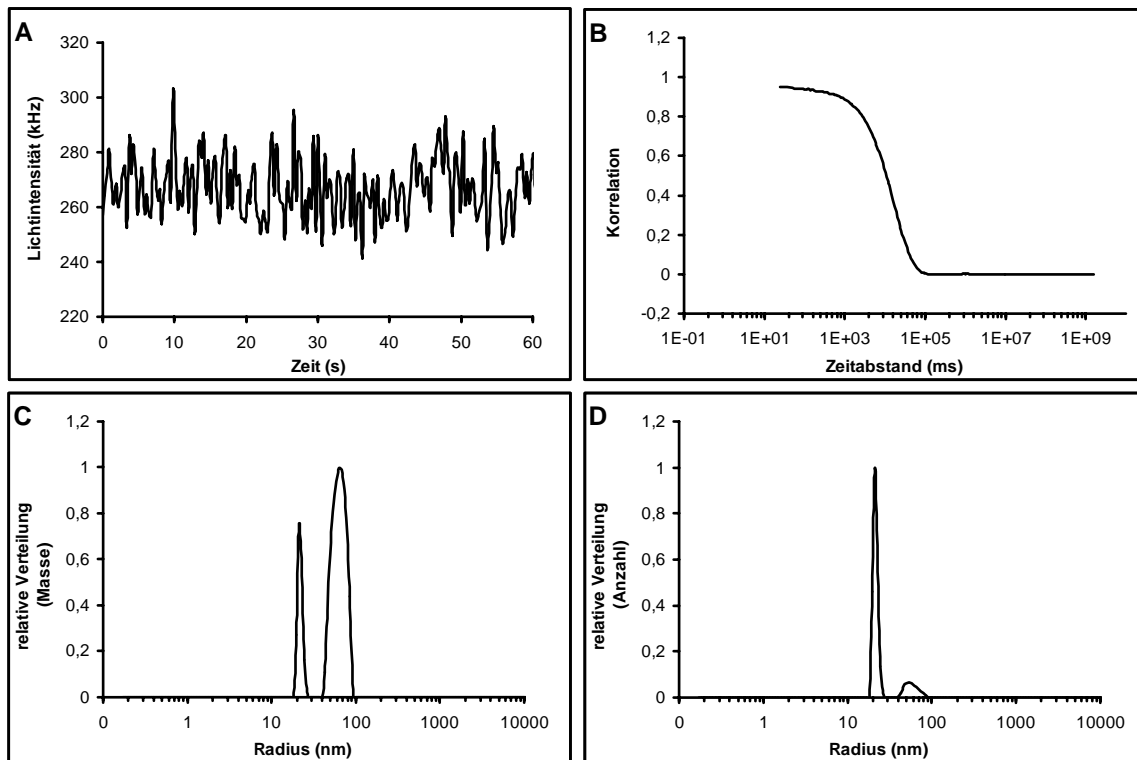


Abb. 2-7 DLS-Messung. Beispiele für die die Fluktuation des Streulichts (A), der daraus berechneten, auf 1 normierten Korrelationskurve (B) und der relativen Verteilung, gewichtet nach Masse bzw. Volumen (C) oder der Anzahl (D). Da Masse  $\sim$  Volumen  $\sim r^3$  gilt, werden größere Teilchen bei der Masseverteilung stärker gewichtet als bei der Anzahlverteilung.

### 2.3.2 Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) bietet die Möglichkeit, unterschiedliche Interaktion von Biomolekülen in Echtzeit zu beobachten, kombiniert mit den Vorteilen, nur kleinsten Mengen zu verbrauchen, unabhängig von der chemischer Natur der Substanzen zu sein und keine Modifikationen, z.B. Label, einführen zu müssen (für eine Beschreibung der Methode und Technologie s. Salamon et al., 1997b, a) und die Homepage des Geräteherstellers <http://www.biocore.com>). Die Meßdaten erlauben die Analyse von Spezifität, Affinität und kinetischen Parametern für die untersuchten Interaktionen. Üblicherweise wird einer der Interaktionspartner, der „Ligand“, kovalent auf einem Biosensorchip immobilisiert, während der „Analyt“ in Lösung darüber geleitet wird. Solche Sensorchips bestehen für das von uns eingesetzte Biacore-System aus einem

## Einleitung

Glasplättchen, das mit einer dünnen Goldschicht versehen ist, die ihrerseits funktionelle Gruppen zur Anbindung der Liganden trägt, z.B. carboxymethyliertes Dextran für die kovalente Immobilisierung von Proteinen (Sensor Chip CM5, Abb. 2-8, A). Die Dextranschicht bildet gleichzeitig eine hydrophile Umgebung für die Stabilisierung gebundener Proteine im nicht-denaturierten Zustand. Für die Untersuchung membrangebundener Prozesse wurden in den letzten Jahren Chips entwickelt, auf denen Membranen modelliert werden können. Entweder werden intakte Liposomen über die Insertion von Alkylketten (C8-C12) auf dem Chip reversibel gebunden (Sensor Chip L1, Abb. 2-8, B), oder die Chipoberfläche ersetzt selbst eine Hälfte der Lipiddoppelschicht - man erhält dann planare Hybrid-Membranen. Eine weitere Möglichkeit ist die Verankerung planare Doppelschichten über relativ bewegliche „Abstandshalter“ (Cooper, 2004).

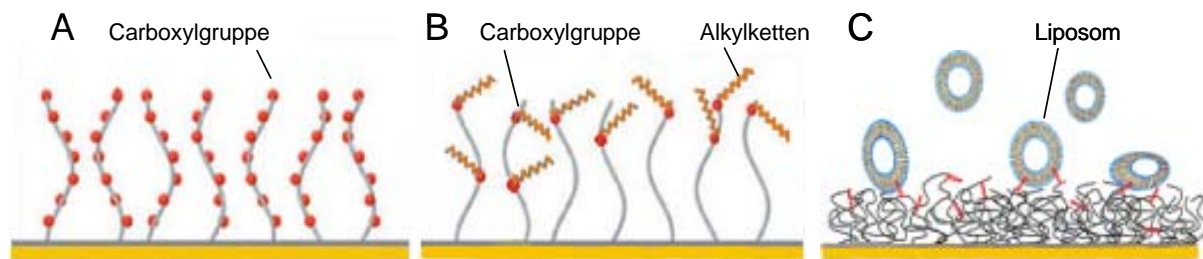


Abb. 2-8 Biacore-Sensor-Chips. Auf der Goldoberfläche befindet sich gebundenes Dextran (Löffäs, 1995), das mit Carboxylgruppen (Chip CM5, A) und Alkylketten (Chip L1, B, C) derivatisiert ist. Die Alkylketten inserieren reversibel in Doppelmembranen und immobilisieren auf diese Weise intakte Liposomen (C). Abb. modifiziert nach [www.biacore.com](http://www.biacore.com).

Die SPR-Meßdaten lassen sich als Masseänderungen interpretieren, die in der Nähe der Chip-Oberfläche stattfinden. Tatsächlich wird allerdings die zur Masseänderung proportionale Änderung des Brechungsindex gemessen (Stenberg et al., 1991). Das Signal wird in relativen Einheiten, *response units* oder RU, in Abhängigkeit von der Zeit angegeben.

Grundlage der Technik ist das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmonen (Stern und Ferrell, 1960): so bezeichnet man eine Ladungsdichtewelle, die sich entlang der Grenzfläche eines Metalls und eines Dielektrikums fortpflanzt und bei der die Leitungselektronen um die Atomrümpfen des Metalls oszillieren. Von den aufgrund ihrer elektromagnetischen bzw. optischen Parameter (Brechungsindex und Extinktionskoeffizient) geeigneten Metallen, wie Gold, Silber, Kupfer oder Aluminium (Homola et al., 1999, Ordal et al., 1983), wird wegen der chemischen Beständigkeit Gold als Sensorenbeschichtung bevorzugt. Die Plasmonen erzeugen ein elektromagnetisches Feld, das exponentiell mit der Entfernung zur Metalloberfläche abnimmt, und unter den gewählten Meßbedingungen nur ca. 300 nm in die

Umgebung hinein reicht. Ändert sich der Brechungsindex in diesem Bereich, ändern sich die Resonanzbedingungen für die Anregung der Plasmonen.

Die Detektion dieser Änderung erfolgt über die Technik der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR, Abb. 2-9, A): Wenn Licht aus einem Medium in ein weniger dichtes übertritt und der Einfallswinkel dabei einen Grenzwert ( $\theta_G$ ) überschreitet, wird das Licht an der Grenzfläche vollständig reflektiert (totale interne Reflexion).

Dabei entsteht ein exponentiell abfallendes elektromagnetisches Feld, das in der Größenordnung der Wellenlänge in das angrenzende, optisch dünnere Medium hineinragt (evaneszente Welle). Befindet sich auf der Grenzfläche ein dünner (50 nm) metallischer Film, kann die evaneszente Welle mit den Elektronen des Metalls interagieren. Im Resonanzfall wird die Energie der Photonen absorbiert und unter Energie- und Impulserhaltung in Oberflächenplasmonen umgewandelt, infolgedessen nimmt die Intensität des reflektierten Lichtes stark ab (Abb. 2-9, B). Diese Art der Kupplung von Photonen und Plasmonen wurde erstmals von Kretschmann und Raether (1968) beschrieben.

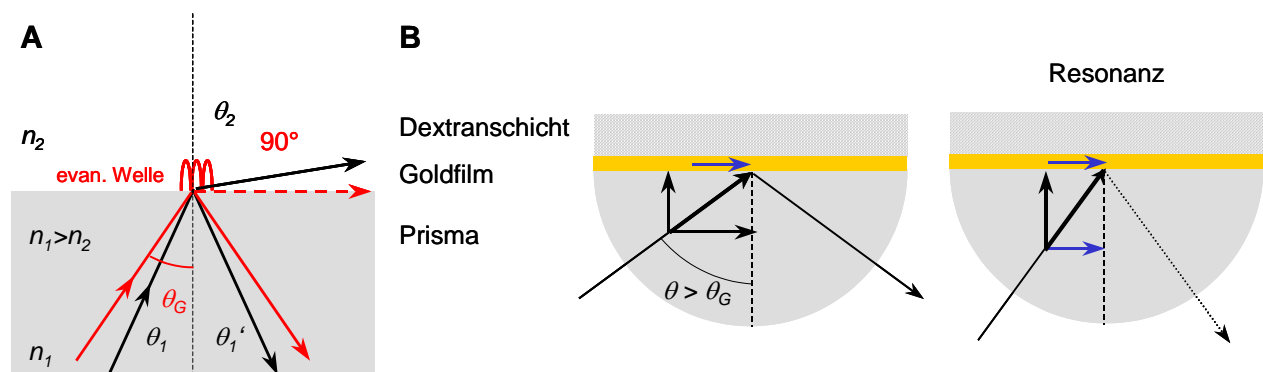


Abb. 2-9 A: Bei der totalen internen Reflexion wird ein Lichtstrahl mit dem Einfallswinkel  $\theta_1 > \theta_G$  beim Übergang von einem optisch dichteren Medium ( $n_1$ ) in ein dünneres ( $n_2$ ) nicht mehr mit  $\theta_2$  gebrochen, sondern nur noch mit  $\theta_1'$  reflektiert. Dabei entsteht eine evaneszierende Welle. B: Bei der Biacore-Meßanordnung wird monochromatisches, polarisiertes Licht unter Variation des Meßwinkels eingestrahlt. Sind die Resonanzbedingungen erfüllt, interagiert die evaneszierende Welle mit den Elektronen der Goldschicht, die Energie wird absorbiert und in ein Plasmon umgewandelt, dadurch zeigt das reflektierte Licht ein Minimum.

Bei der Einstrahlung monochromatischen, zur Einfallsebene parallel polarisierten Lichts wird durch dessen Wellenlänge die Energie vorgegeben, während der Einfallswinkel bestimmt, wie groß die Komponente des Lichts parallel zur Einfallsebene ist, denn nur dieser Anteil (blauer Pfeil in Abb. 2-9, B) kann auf die Plasmonen, die ja ebenfalls auf die Ebene beschränkt sind, übertragen werden. Bei der winkelaufgelösten Messung mit dem Biacore-Gerät ergeben sich so folgende Zusammenhänge: 1000 RU entsprechen der Verschiebung des Reflexionsminimums um  $0,1^\circ$ , der Änderung des Brechungsindex auf dem Sensorchip um 0,001 und der Änderung der Oberflächenkonzentration um ca.  $1 \text{ ng/mm}^2$  für Proteine (Stenberg et al., 1991) oder  $0,9 \text{ ng/mm}^2$  für Lipide (Cooper et al., 1998).

### 2.4 Zielsetzung

Trotz zahlreicher Untersuchungen an den SAPs und der Aufklärung ihrer Struktur, konnten die Gründe für ihre unterschiedliche Spezifität gegenüber Lipiden und Enzymen des GSL-Abbaus und die genauen Mechanismen bei ihrer Interaktion mit Membranen erst in Ansätzen geklärt werden. Insbesondere die Funktion der N-Glykosylierung war unbekannt.

Daraus ergeben sich für diese Arbeit folgende Hypothesen:

- Die spezifische Zusammensetzung der intralysosomalen Membranen und der saure pH sind entscheidend für die physiologische Funktion der Saps. Vor allem bei der Untersuchung von Sap-B, das keine direkte Wechselwirkung mit Enzymen einzugehen scheint, und Lipiden gegenüber relativ unspezifisch ist, sollte der Einfluß der Membranzusammensetzung auf die Membranbindung *in vitro* untersucht werden. Cholesterol und BMP unterscheiden die intralysosomalen Vesikel am deutlichsten von anderen Membranen und sollten daher die Membraneigenschaften in einer Weise modulieren, die sich auf die Bindung von Sap-B und die sich anschließende Membranperturbation auswirken könnte.
- Bisher konnte für die Glykosylierung der Saps keine Funktion festgestellt werden, obwohl die entsprechende Glykosylierungsstelle bei den Saps hochkonserviert ist und ihr Fehlen innerhalb der Sap-B-Domäne beim Menschen zur Erkrankung führt. Es sollte eine Methode gefunden werden, die auch graduelle Unterschiede zwischen glykosylierten und unglykosylierten Sap-Spezies sichtbar macht.

Deshalb war es im Rahmen dieser Arbeit notwendig,

- ein Expressionssystem für funktionelle, glykosylierte Saps zu etablieren, das es ermöglicht, die Saps (B und D) und variante Formen getrennt voneinander und auf einfachem Wege darzustellen; das sich zur Steigerung der Proteinmenge kontrolliert in einen größeren Maßstab umsetzen läßt (Bioreaktor); und das eine schonende Aufreinigung in wenigen Schritten erlaubt; und
- mittels Dynamischer Lichtstreuung und Oberflächenplasmonresonanz die Interaktion von unmodifiziertem Sap-B und -D mit liposomalen Membranen unterschiedlicher Zusammensetzung in Echtzeit qualitativ und quantitativ zu charakterisieren, bzw. zu bewerten, inwieweit die Methoden zur Charakterisierung des Modellsystems geeignet sind.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Expression

#### 3.1.1 Das Expressionssystem *Pichia pastoris*

Für die rekombinante Expression der Aktivatoren wurde ein System benötigt, das eine einfache Aufreinigung präparativer Mengen für materialintensive biophysikalische Untersuchungen mit korrekter Prozessierung – vor allem Glykosylierung - und hoher Homogenität der Präparate verbindet. Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* (*P.pastoris*) erfüllt diese Anforderungen, da sie für die Hochzelldichte-Fermentation geeignet ist und als eukaryontischer, trotzdem einfach handhabbarer Organismus rekombinante Proteine korrekt posttranslational modifizieren und sie in den Überstand sekretieren kann (für eine Übersicht: Cereghino et al., 2001, Macauley-Patrick et al., 2005, Sreekrishna et al., 1997).

*P.pastoris* ist in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Hefe besitzt mit den Peroxisomen spezialisierte Organellen, in denen Methanol mittels molekularem Sauerstoff zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid umgesetzt wird. Die geringe O<sub>2</sub>-Affinität der beteiligten Alkoholoxidase AOX1 wird kompensiert, indem ihre Expression auf über 30% der gesamten Proteinmasse gesteigert wird, wenn Methanol wachstumslimitierender Faktor ist. Dieser Phänotyp wird als Mut<sup>+</sup> (*methanol utilisation wild type*) bezeichnet. Die Hefe besitzt ein zweites Isoenzym zur Umsetzung von Methanol, die Alkoholoxidase AOX2, die in wesentlich geringerem Maße exprimiert wird. Ist nur diese funktionstüchtig, bezeichnet man den entsprechenden, langsam wachsenden Phänotyp als Mut<sup>s</sup> (*methanol utilisation slow*) (Cregg et al., 1989).

Die Regulation der *AOX1*-Expression erfolgt zweistufig über einen Repressions-/ Derepressions- und Induktionsmechanismus auf Transkriptionsebene. Glucose hemmt dabei den *AOX1*-Promoter, selbst wenn Methanol zur Verfügung steht. Beim Wechsel der Kohlenstoffquelle, z.B. zu Glycerol, wird die Repression aufgehoben, Methanol bleibt aber für die Induktion zwingend notwendig.

*Pichia* sekretiert kaum native Proteine ins Medium (Cregg et al., 1993). Um so effektiver lassen sich rekombinante Proteine exportieren, denen die  $\alpha$ -Faktor-Propeptid-Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* vorgeschaltet ist. N-Glykosylierungsstellen werden dabei meist erkannt und mit Kohlenhydratstrukturen des *high mannose*-Typs versehen. Im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* findet keine Hyperglykosylierung statt (Gemmill und Trimble, 1999), die funktionsrelevante Strukturen des Proteins maskieren kann, sondern die Anzahl an

Mannoseresten ist auf ca. 8-14 begrenzt und kommt damit der Modifikation höherer Eukaryonten nahe.

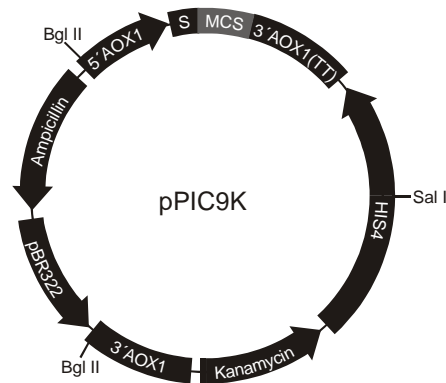


Abb. 3-1 Plasmid pPIC9K: *AOX1*, *HIS4* – Sequenzabschnitte des Alkoholoxidase 1- bzw. des Histidinoldehydrogenase-Gens, pBR322 - Replikationsursprung, Kanamycin, Ampicillin – Resistenzgene gegen die entsprechenden Antibiotika, MCS – *multiple cloning site*, S – Sekretionssequenz, TT – Transkriptionsterminationssequenz, *Bgl* II, *Sal* I - Restriktionsschnittstellen (modifiziert nach dem Invitrogen-Manual).

Für die rekombinante Expression wurde der *P.pastoris*-Stamm GS115 zusammen mit dem Vektor pPIC9(K) (Abb. 3-1) eingesetzt. Der Stamm GS115 ist aufgrund einer Mutation im Histidinoldehydrogenase-Gen (*his4*) histidin-defizient und damit auf Minimalmedium, also ohne Supplementation von Aminosäuren, nicht lebensfähig. Durch erfolgreiche Transformation mit dem Plasmid erfolgt die Komplementierung des *HIS4*-Gens. Der entstehende His<sup>+</sup>-Phänotyp wird auf Minimalmedium selektioniert.

Für die Vermehrung in *E.coli* besitzt das Plasmid den Replikationsursprung aus Plasmid pBR322 und eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Die Expressionskassette besteht aus dem *AOX1*-Promotor, dem Sekretionssignal (S), der Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS), in die das gewünschte Gen inkloniert wird, und der Transkriptionsterminationssequenz (TT). Die Integration dieser Expressionskassette ins Hefegenom erfolgt über die Rekombination der auf Plasmid und Genom homologen *AOX1*-Abschnitte. Sie erfolgt bevorzugt mit linearisiertem Vektor in der Nähe der Schnittstellen. Über die Restriktion läßt sich so der Integrationsort und damit der Phänotyp wählen: Findet die Insertion am Ort des *AOX1*- oder *his*-Gens statt (Abb. 3-2), bleibt die Alkoholoxidase erhalten, der Phänotyp des entstehenden Klons ist Mut<sup>+</sup>.

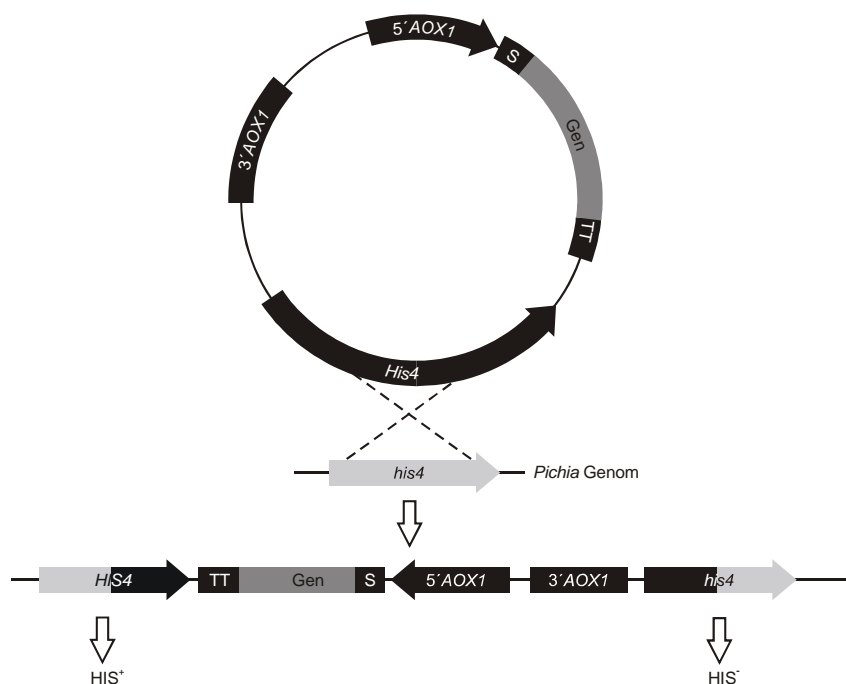


Abb. 3-2 Insertion des Zielgens durch einfache homologe Rekombination und Komplementierung des *HIS4*-Gens (modifiziert nach dem Invitrogen-Manual)

Durch zwei gleichzeitige *cross over*-Reaktionen kann es aber auch zum Verlust der Alkoholoxidase 1 kommen (Abb. 3-3) der resultierende Phänotyp ist dann  $Mut^S$ . Die Phänotypen können sich in der Ausbeute und der Qualität des exprimierten Proteins unterscheiden.

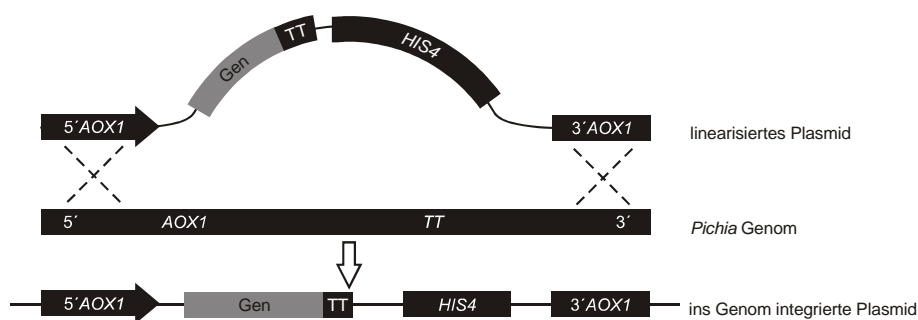


Abb. 3-3 Genaustausch durch zwei homologe Rekombinationsreaktionen, *AOX1* wird durch das Zielgen ersetzt (modifiziert nach dem Invitrogen-Manual)

In 1-10% der Fälle werden spontan bis zu 30 Kopien der Expressionskassette an der gleichen Position im Genom aufgenommen (*multi copy integrants*). Über einen Gen-Dosis-Effekt kann dadurch auch die Expression an rekombinantem Protein gesteigert werden. Durch die Kopplung der Expressionskassette mit dem bakteriellen Kanamycin-Resistenz-Gen (das in *Pichia* pro Kopie eine Resistenz gegen ca. 0,25 mg/ml Geneticin vermittelt) besteht die einfache Möglichkeit, die ungefähre Anzahl der Kopien und damit das Expressionsvermögen des jeweiligen Klons abzuschätzen.

### 3.1.2 Darstellung der Vektoren

Die cDNA des humanen Sap-Vorläufers (0er-Splicevariante, 7.2) und deren Varianten lagen im Vektor pBHE (Artelt et al., 1988) als Templat vor (Henseler et al., 1996a, Wrobe et al., 2000). Beide Mutanten unterscheiden sich auf der Proteinebene durch eine Aminosäure, bei der das glykosylierte Asparagin des nativen Sap-B durch das chemisch ähnliche Glutamin (A643C, C645G; N215Q) oder durch Histidin (A643C; N215H (Patient)) ersetzt ist (7.2). Dieser Austausch führt bei betroffenen Patienten zu einer Form der Metachromatischen Leukodystrophie.

Die Vervielfältigung der einzelnen Sap-Sequenzen erfolgte mittels PCR, dabei wurde durch die Wahl der Primer (7.1) die cDNA der Sap-Domänen zum gezielten Klonieren und zur späteren Expression modifiziert: z.B. erhielten alle Saps einen Histidin-*tag*, der die Affinitätsaufreinigung über NiNTA-Matrix ermöglichte. Da sich dieser Affinitätsrest am C-Terminus befindet, wurden bei der Aufreinigung nur vollständig exprimierte Proteine erhalten.

Die PCR- und Restriktions-Produkte wurden elektrophoretisch gereinigt, photometrisch quantifiziert, zur Ligation eingesetzt und dann in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert und vermehrt. Die Kontrolle der Transferplasmide erfolgte über Restriktionsanalyse (über die Klonierungsschnittstellen), PCR (mit den ursprünglichen oder plasmidspezifischen Primern, (7.1) und Sequenzierung.

#### 3.1.2.1 pPIC9K-Sap-B und Varianten

Das PCR-Produkt codiert für Sap-B und einen C-terminalen Tetrahistidinrest, dem ein Transkriptions-Stopcodon folgt. Das Fragment wird auf beiden Seiten von *EcoR* I- und *Pst* I- bzw. *BamH* I-Schnittstellen begrenzt. Da sich die direkte Ligation zwischen dem relativ großen pPIC9K-Vektor (9,3 kbp) und dem PCR-Fragment (ca. 300 bp) anfangs als schwierig herausstellte, eventuell aufgrund zu geringer Schnitteffizienz der Enzyme an den endständigen Schnittstellen auf dem PCR-Fragment, wurde das PCR-Fragment über *Pst* I und *BamH* I in pUC19 (2,7 kbp) zwischenkloniert, durch *EcoR* I-Restriktion herausgeschnitten, über Elektrophorese isoliert und erst dann in den mit *EcoR* I linearisierten pPIC9K-Vektor ligiert.

Durch effizientere Restriktionsenzyme und Materialien zur DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen gelang bei den Sap-B-Varianten die direkte, gerichtete Einfügung des mit *SnaB* I und *Avr* II geschnittenen PCR-Fragments in pPIC9K. Die varianten Formen enthielten einen C-terminalen Hexahistidinrest.

### 3.1.2.2 pPIC9K-Sap-D

Die Sap-D-Sequenz - ebenfalls mit zusätzlichen Basenpaaren versehen, die für einen C-terminalen Hexahistidinrest codieren - wurde zuerst in eine ältere Version des Hefepiasmids, pPIC9, über die Restriktionsstellen *Xho* I und *Eco*R I eingefügt. *Xho* I liegt außerhalb der MCS vor der Exportsequenz. Es war also möglich, durch den *forward* PCR-Primer diese Sequenz zu rekonstruieren, so daß Sap-D keine überzähligen Basenpaare aus den Restriktionsstellen enthielt und auf Proteinebene damit nach Abspaltung des Signals (S in Abb. 3-4) seinen nativen N-Terminus besaß. Mit dem neueren Vektor pPIC9K war diese Strategie nicht mehr möglich, da gegenüber pPIC9 eine weitere *Xho* I Schnittstelle hinzukommen war. Der Vorteil der Kanamycin-Kassette für die Auswahl effizienter Klone konnte aber durch Kombination der Plasmide pPIC9-Sap-D und pPIC9K beibehalten werden (Abb. 3-4).

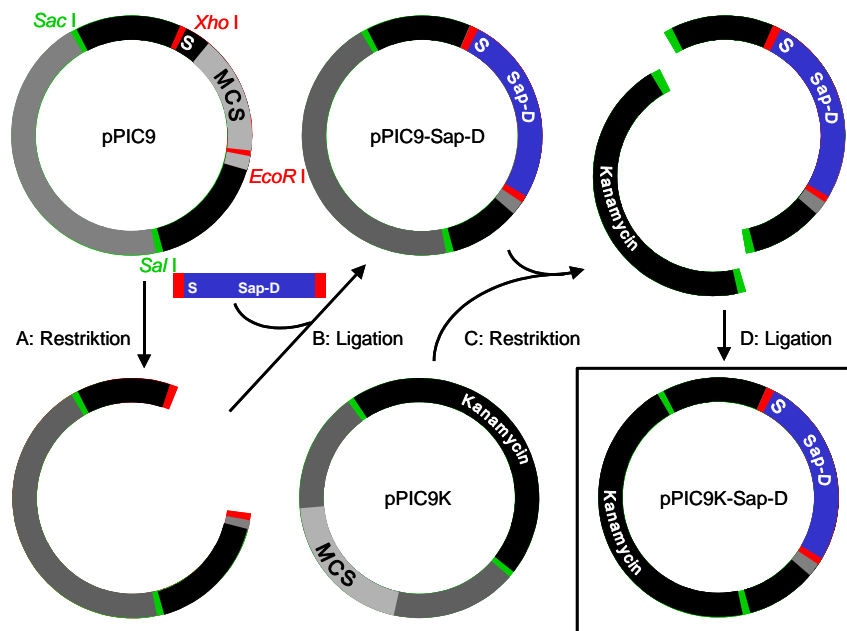


Abb. 3-4 Klonierungsstrategie für den Vektor pPIC9K-Sap-D. Das PCR-Produkt mit rekonstruierter Signalsequenz (S) wurde zuerst über *Xho* I und *Eco*R I in pPIC9 eingefügt (A, B), dann wurden das so erhaltene Plasmid pPIC9-Sap-D und pPIC9K mit *Sal* I und *Sac* I geschnitten (C), die Fragmente aufgetrennt und in neuer Kombination zu pPIC9K-Sap-D religiert (D).

### 3.1.3 Darstellung der rekombinanten Hefestämme

Um unterschiedliche Phänotypen bezüglich der Methanolverwertung zu erhalten und ihr Expressionsvermögen vergleichen zu können, wurde das Transferplasmid auf verschiedene Weisen linearisiert und anschließend durch Elektroporation in die Hefezelle geschleust, wo es in das Hefegenom integrierte. Mit der Restriktionsendonuklease *Sal* I erfolgte der Schnitt auf der *HIS4*-Sequenz (Abb. 3-1), was zur bevorzugten Insertion an diesem Ort des Hefegenoms führte (Abb. 3-2). Dabei bleibt die Alkoholoxidase 1-Aktivität unbeeinflusst, folglich ist der entstehende Phänotyp His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>. Mit der Restriktion durch das Enzym *Bgl* II wurde die

Rekombination zum genomischen *AOX1*-Genort gelenkt (Abb. 3-3). Da sich auf der für Sap-B codierenden Sequenz bereits eine *Bgl* II-Schnittstelle befand, wurden die Sap-B-Konstrukte alternativ über die ähnlich platzierten *Dra* I-Erkennungssequenzen linearisiert. Die entstehenden Klone können bezüglich der Methanolverwertung Mut<sup>+</sup> (Insertion) oder Mut<sup>S</sup> (Genaustausch) sein.

Zuerst wurden auf Minimalmedium His<sup>+</sup>-Klone selektioniert. Die Transformation mit dem *Dra* I-geschnittenen Vektor war erfolglos, dagegen lieferte der *Bgl* II- (Sap-D) bzw. *Sal* I-Ansatz (Sap-D und alle Sap-B-Varianten) zahlreiche Kolonien, die auf mehrfache Kopienzahl der Expressionskassette getestet wurden. Von allen erfolgreichen Transformationsansätzen ließen sich Klone isolieren, die gegen 4 mg/ml Geneticin/Medium resistent waren, also 7-12 Kopien des gewünschten Gens besaßen. Durch PCR mit isolierter genomischer Hefe-DNA wurde die Anwesenheit der Sap-Sequenzen ebenfalls bestätigt. Gleichzeitig wurde ihr Phänotyp als Mut<sup>+</sup> bestimmt. Zuletzt wurden jeweils zwischen 5 bis 10 dieser Klone in 5 ml-Kulturen auf ihr Expressionsrate getestet und diejenigen mit der größten Proteinausbeute für die weiteren Versuche ausgewählt.

### 3.1.4 Schüttelkolben-Expression

Um geeignete Bedingungen für die präparative Expression der Saps mit möglichst hoher Ausbeute und hohem Glykosylierungsgrad zu finden, wurden einige Parameter - wie Induktionsdauer, Methanolzugabe, Medium, pH - in kleinen Ansätzen (5-250 ml) variiert und später auf Kulturvolumina von bis zu 1 l übertragen.

Für die Expression wurden die *P.pastoris*-Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase bei einem OD<sub>600</sub> von 2-6 durch Zentrifugation geerntet und durch Medienwechsel die Induktion gestartet. Vor der Induktion durch Methanol war kein heterologes Protein detektierbar, wie die strenge Regulation der heterologen Expression erwarten ließ. Danach stieg die Rate bis zum dritten, manchmal auch fünften Tag an, um dann konstant zu bleiben. Alle getesteten Stämme vertrugen die tägliche Zugabe von 1% Methanol.

Da *P.pastoris* nur sehr wenig eigene Proteine in den Kulturüberstand exportierte, andererseits die  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz effektiv erkannt wurde, fand sich hauptsächlich rekombinantes Protein im Medium. Dessen Konzentrationsbestimmung war allerdings aufgrund der starken Färbung des Mediums nur sehr ungenau möglich. Deshalb wurde der Einfluß der Expressionsbedingungen anhand von silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen abgeschätzt (Abb. 3-6).

Bei Sap-B wurden gleichzeitig glykosylierte (rgSap-B) und unglykosylierte (ruSap-B) Spezies im Mengenverhältnis von ca. 1:1 gebildet, erstere ließen sich mit PNGase F oder Endo H vollständig deglykosylieren (Abb. 3-5). Die Sap-B-Varianten (rvSap-B N215H (Patient) oder N215Q) lagen unglykosyliert vor (Abb. 3-10). Bei der Sap-D-Expression entstand neben der Hauptbande bei etwas über 7 kDa auch schlecht reproduzierbare, schwache Banden bei 17 bis etwas über 23 kDa (Abb. 3-5), die sich durch die Behandlung mit PNGase F nicht veränderten (Abb. 3-5). Da sie vorallem in hochkonzentrierten Lösungen auftraten (z.B. auch im Fermentationsüberstand Abb. 3-7) könnte es sich um Sap-D-Oligomere handeln.

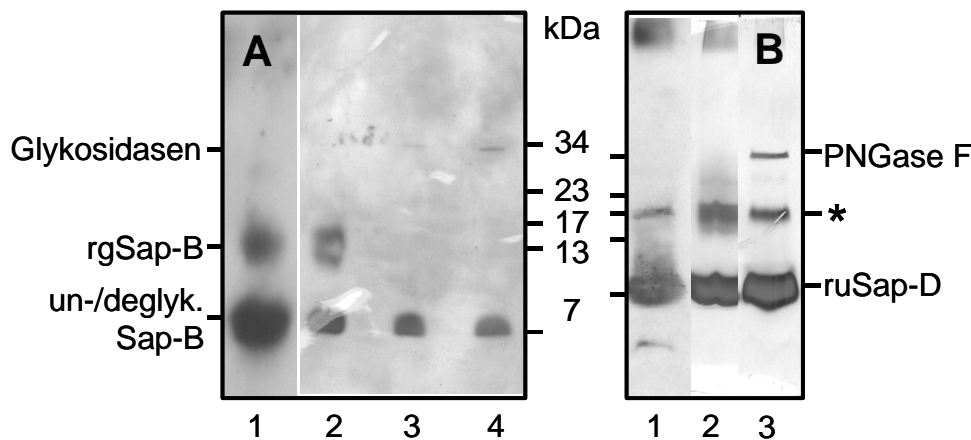


Abb. 3-5 Enzymatische Deglykosylierung von rSap-B (A) und rSapD (B) mit PNGase F (A3, B3) oder Endo H (A4); bei der 17 kDa-Bande im rSap-D-Gel/-Blot (B,\*) handelt es sich wahrscheinlich um Sap-D-Oligomere. Jeweils ca. 3 µg Protein wurden im reduzierenden SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt (2-4), bzw. auf Membran gebロットet und immunochemisch detektiert (1); PNGase F und Endo H haben apparente Molekulargewichte von 36 bzw. 29 kDa.

Durch die Wahl der Klone oder die Variation der Wachstumsbedingungen waren nur graduelle, schlecht reproduzierbare Veränderungen im Mengenverhältnis der Glyko-Formen möglich, wie die Expression in verschiedenen Medien zeigt (Abb. 3-6): Während der pH-Wert beim ungepufferten Medium in der Induktionsphase auf 3 absank, blieb er in den gepufferten Medien bei konstant 6; das komplexe Medium war darüberhinaus mit Hefeextrakt und Pepton angereichert. Es gelang nicht, die Expression bei Sap-B zugunsten der vollständig prozessierten, also glykosylierten Form zu verschieben oder glykosyliertes Sap-D zu erhalten. Die Ausbeuten lagen bei allen Medien in einer ähnlichen Größenordnung (Abb. 3-6), die beobachteten Unterschiede ergaben sich vorallem aus Schwankungen bei der Zelldichte der Starterkulturen. Da kein eindeutiger Vorteil für gepufferte oder komplexe Medien zu erkennen war, wurden die weiteren Schüttelkolbenexpressionen bei pH 3 in Minimal Methanol Medium durchgeführt.

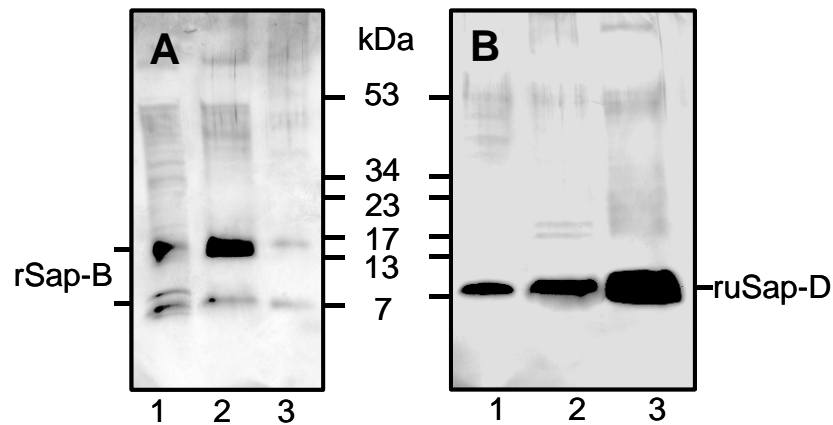


Abb. 3-6 rSap-B (A) und rSap-D (B) zeigen nach 4 Tagen Induktion mit 0,5% Methanol ähnliche Expressionsmuster unabhängig vom verwendeten Medium, 1: Minimal Methanol Medium (MM), 2: auf pH 6,0 gepuffertes MM, 3: gepuffertes, komplexes MM. Je 24  $\mu$ l Medium pro Bahn wurden im reduzierenden SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert.

### 3.1.5 Hochdichte-Zell-Fermentation im Bioreaktor

Nachdem die Aktivatoren in *P.pastoris* erfolgreich dargestellt werden konnten, wurde das Expressionsverfahren in einen größeren Maßstab übertragen. Die Möglichkeit dazu bot der Einsatz eines Bioreaktors, in dem große Kultur-Volumina (3 l, im Vergleich zu 1 l verteilt auf mehrere Schüttelkolben) über Tage bei kontrollierten und genau definierten Bedingungen gehandhabt werden können. Dies spielt vorallem für die ausreichende und gleichmäßige Sauerstoffversorgung eine entscheidende Rolle: Während im Schüttelkolben nur eine begrenzte Oberfläche für den Austausch mit der Raumluft zur Verfügung steht und damit Sauerstoff wachstumsbegrenzend wirkt, kann im Fermenter mit Sauerstoff angereicherte Luft durch die Kultur geleitet werden. Außerdem ist eine kontinuierliche Methanolzufuhr im Medium während der Induktion vorteilhaft, da sowohl toxische Methanolkonzentrationen als auch Methanolmangel vermieden werden; bei Schüttelkolben-Expressionen dagegen schwankt die Methanolkonzentration zwischen fast 0% vor und 1% (v/v) nach der Fütterung. Bei der Expression im Bioreaktor ließen sich vier Abschnitte unterscheiden, die durch Probennahme und  $OD_{600}$ -Bestimmung verfolgt wurden. Während der *Batch*-Phase wurde vorallem Zellmasse produziert und das im Medium vorhandene Glycerol verbraucht. Diese erste Phase dauerte ungefähr einen Tag, danach war der  $OD_{600}$  auf ca. 70 angestiegen. In der zweiten Phase (*fed-batch*) wurde Glycerol in wachstumsbegrenzender Menge gefüttert. Dadurch wurden die Hefen gezwungen, als weitere Kohlenstoffquelle gespeicherte Glucose zu verbrauchen, die ein starker Suppressor des *AOX1*-Promotors ist. Der Verbrauch der Glucose bereitete die Hefen so auf die Induktion mit Methanol vor. Der  $OD_{600}$  stieg innerhalb von 4 h auf über 100. Der Verbrauch der Glucose (und später des Methanols) wurde über die Messung des Sauerstoffgehalts (DO) des Mediums bestimmt: wenn die Hefen nach



Unterbrechung der Nahrungszufuhr den Stoffwechsel einstellen müssen, verbrauchen sie auch keinen Sauerstoff mehr. Wenn der Sauerstoffgehalt infolgedessen in weniger als einer Minute um 10% steigt (*DO spike*), befindet sich die Konzentration der Kohlenstoffquelle im wachstumslimitierenden Bereich.

In der Adaptionsphase wurden die Hefen über einen Zeitraum von bis zu 12 h an Methanol als Kohlenstoffquelle gewöhnt, indem die Methanolzufuhr langsam von 3,5 ml pro Stunde und Liter Medium auf 12 ml/h x l erhöht wurde. Gleichzeitig wurde der pH-Wert auf 3,0 eingestellt, und begonnen, der Luft steigende Sauerstoffkonzentrationen zuzusetzen. Die Hefen vergrößerten ihre Masse in dieser Phase kaum noch. Die höchste Fütterungsrate wurde während der nun folgenden Induktion beibehalten. Diese dauerte einige Tage und wurde durch Probenentnahme verfolgt. Der Überstand der Expressionen von Sap-B und -D wurde nach 5 bzw. 3 Tagen geerntet (Abb. 3-7).

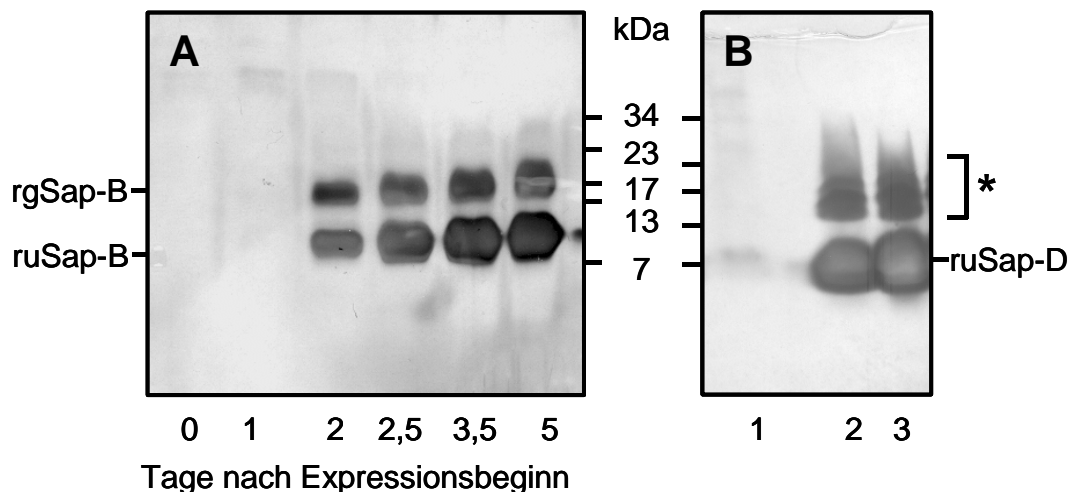


Abb. 3-7 Expressionsverlauf der Fermentation für Sap-B (A) und Sap-D (B); für \* siehe die Legende von Abb. 3-5. Je 15 µl Medium pro Bahn wurden im reduzierenden SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert.

### 3.2 Aufreinigung

Die Grundlage des Aufreinigungsschemas bildeten folgende Schritte:

- Abtrennung der Zellen vom Überstand
- Pufferwechsel zur Abtrennung von Medienbestandteilen, die Chromatographieschritte erschweren, indem sie z.B. die Säulenkapazität stark vermindern
- Abtrennung von Fremdproteinen und Aggregaten (je nach Expressionsmethode)
- Trennung der unterschiedlich glykosylierten Proteine (nur bei Wildtyp-Sap-B).

Die Reinheit und Identität der Proben wurden durch elektrophoretische Auftrennung und immunochemische Detektion bestätigt.

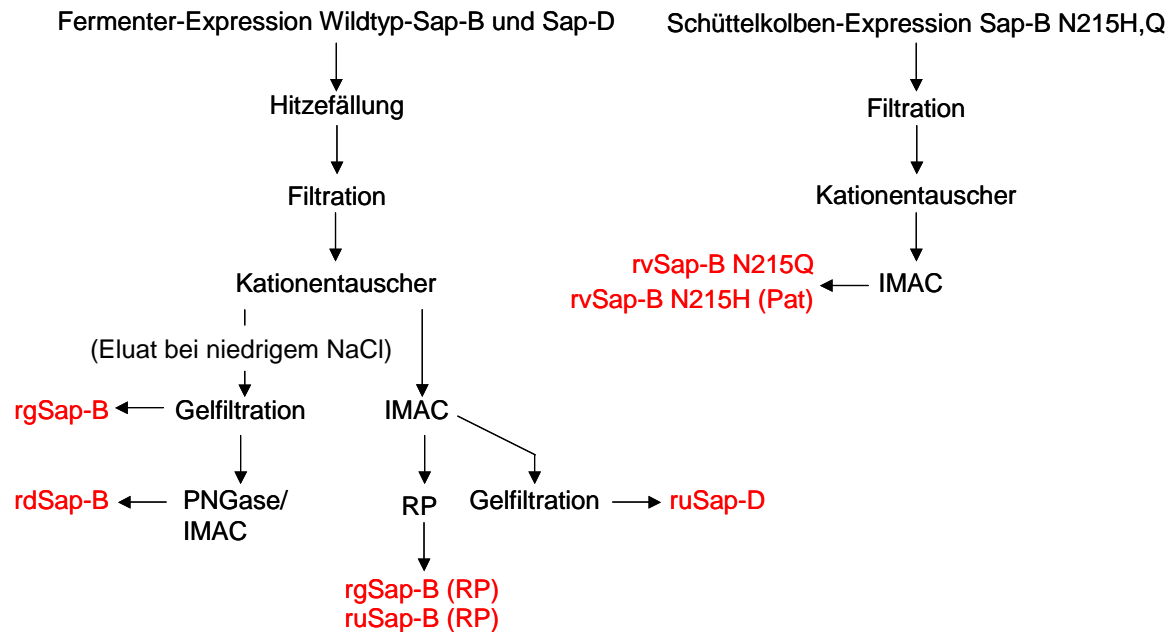


Abb. 3-8 Aufreinigungsschema für die verschiedenen Sap-Präparate, IMAC – Affinitätschromatographie an immobilisierten Nickelionen, RP – Reversed-Phase-Chromatographie

Während bei der Schüttelkolbenexpression einmalige Zentrifugation und Filtration zu einem partikelfreien Überstand führten, war es notwendig, den Bioreaktoransatz in mehreren Zentrifugationsschritten zu klären. Durch Hitze-fällung und mehrtägige Inkubation bei 4°C wurden Fremdproteine und Salze als Niederschlag entfernt, erst danach ließ sich der Filtrationsschritt (Transversalfiltration) problemlos durchführen (Abb. 3-8).

Während der Expression wurden nur sehr geringe Mengen an endogenem Protein sezerniert, deshalb enthielt der Überstand hauptsächlich rekombinantes Protein. Die direkte Reinigung über IMAC war aber nur schlecht möglich, da Bestandteile des Mediums mit dem Chromatographie-Material interagierten und dabei dessen Kapazität für die Aktivatoren sank. Als weniger empfindlich erwies sich ein starker Kationentauscher (POROS 20 HS) bei pH 4,0, über den sich die Proben so gut wie ohne Ausbeuteverlust erst binden und dann mit Hochsalzpuffer eluieren ließ (Abb. 3-8).

Bei Sap-B war es darüberhinaus möglich, über einen Salzgradienten Fraktionen zu erhalten, die sich in ihrer Zusammensetzung aus glykosylierten und unglykosylierten Spezies unterschieden: die erste Fraktion, die bei 250 mM NaCl eluierte, enthielt hauptsächlich glykosylierte Form (80-90%, Abb. 3-9, A1). Bei der Aufreinigung des Fermentationsüberstandes reichte die Menge, um diese Fraktion alleine weiterzuverarbeiten, sie wurde deshalb nicht wieder mit den restlichen Mischfraktionen vereint. Da sie außerdem kaum noch Fremdproteine enthielt, wurde sie nicht über Affinitätschromatographie gereinigt, sondern der Gelfiltration unterzogen, wo Aggregate von Oligomeren (Dimere bis Tetramere)

getrennt wurden. Letztere wurden in den folgenden Messungen als rgSap-B eingesetzt (Abb. 3-9, A6 und Abb. 3-8). Die ausreichende Anreicherung der unglykosylierten Form gelang mit der Kationentauscher-Chromatographie jedoch nicht.

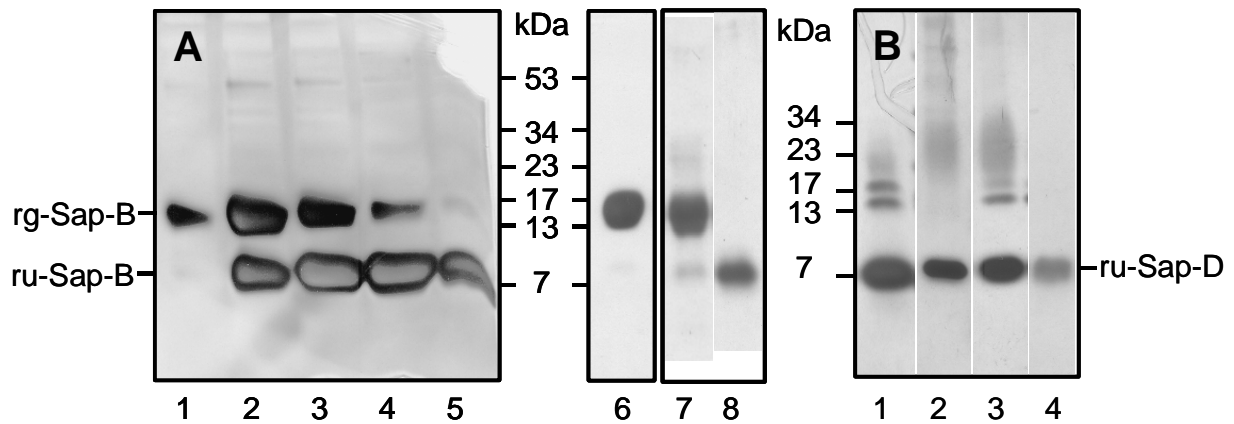


Abb. 3-9 Aufreinigung von rSap-B (A) und rSap-D (B). Bei der Kationentauscher-Chromatographie konnte Sap-B mit unterschiedlichem Glykosylierungsgrad durch die Elution mit steigenden Salzkonzentrationen angereichert werden (A1: 250, 2: 500, 3:700, 4: 800, 5:1000 mM NaCl; Auftrag jeweils 20  $\mu$ l der Eluate), die erste Fraktion wurde nach der weiteren Aufreinigung - der letzte Schritt ist die Gelfiltration (A6) - als rgSap-B für alle SPR-Messungen eingesetzt. Durch Reversed-Phase-Chromatographie konnten rSap-B ebenfalls in die glykosyliert (A7) und unglykosylierte (A8) Form getrennt werden. ruSap-D wurde durch Kationentauscher-Chromatographie (B1: Auftrag auf die Säule, 2: Eluat), Affinitäts-Chromatographie (B3) und Gelfiltration (B4) gereinigt. Alle Proben wurden im reduzierenden SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert.

Für die Affinitätsreinigung über NiNTA-Agarose wurde der pH der Kationentauscher-Eluate auf 7,0 eingestellt. Bei diesem pH liegen die Histidinreste deprotoniert vor und interagieren mit den Metallionen. Der Rest an Fremdproteinen wurde durch Waschschritte bei pH 6,0 entfernt, die rekombinanten Proteine selbst eluierten bei noch niedrigerem pH ( $\sim$ 4). Die varianten Sap-B-Formen lagen danach, abgeschätzt anhand des silbergefärbten Proteingels, rein vor (Abb. 3-10). Bei Sap-D wurden Banden zwischen 13 und 23 kDa angereichert, möglicherweise wieder Sap-D-Aggregate (Abb. 3-9 B3), sie konnten aber in einem weiteren Reinigungsschritt über Gelfiltration (Superdex 75) abgetrennt werden (Abb. 3-9 B4 und Abb. 3-8).

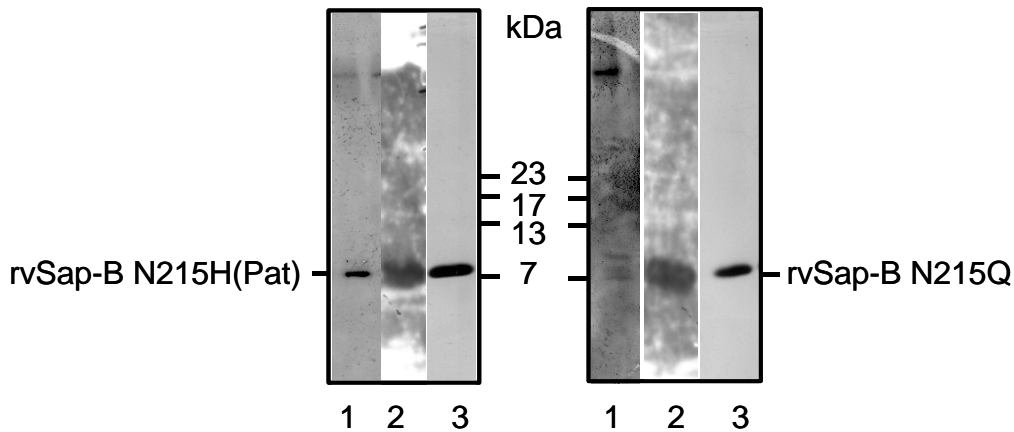


Abb. 3-10 rvSap-B vor (1, 2) und nach (3) der Aufreinigung über Kationentauscher- und Affinitätschromatographie. Die Proben wurden im reduzierenden SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert (1, 3), bzw. auf Membran geblottet und immunochemisch detektiert (2).

Im Gegensatz zu Sap-D wurde Sap-B in *P.pastoris* teilweise glykosyliert. Da Sap-B als Dimer, aber wahrscheinlich auch als höheres Oligomer vorlag, gab es die unterschiedlichsten Kombinationen von glykosylierten und nicht glykosylierten Formen, deren Trennung nur möglich war, wenn gleichzeitig die Oligomere aufgelöst wurden. Unter milden Bedingungen, z.B. durch Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) oder über Lektin-Affinitätschromatographie (Concanavalin A), gelang die Aufreinigung nicht: im ersten Fall band die Probe nicht an das Säulenmaterial, im zweiten Fall war nur eine ungenügende Anreicherung der zuckerhaltigen Formen im Eluat (der zuckerfreien im Durchlauf) möglich, außerdem verlor das Säulenmaterial kontinuierlich Lektin, das alle Sap-B-Fractionen verunreinigte. Inzwischen gelang es allerdings mit einer neuen Charge des Concanavalin A-Materials, die Glykoformen besser zu trennen. Über Kationentauscher-, NiNTA-, Lektinchromatographie und Gelfiltration gereinigtes ruSap-B aus einer Schüttelkolben-Expression konnte deshalb bei den Funktionalitätsstudien eingesetzt werden (3.4.1).

Durch Reversed-Phase-Chromatographie an C4-Material ließen sich glykosyliertes und unglykosyliertes rSap-B dagegen relativ sauber trennen (Abb. 3-9, A7, 8). Das durch die Zucker stärker polare rgSap-B eluierte erwartungsgemäß vor der unglykosylierten Form. Die Ausbeute betrug für rgSap-B ca. 30%, für ruSap-B ca. 20%; der jeweilige Rest eluierte in gemischten Fraktionen, da die Trennleistung der Säule unter den gewählten Bedingungen nicht optimal war oder aber Sap-B als „gemischtes“ Dimer aus glykosyliertem und unglykosyliertem Protein vorlag. Bei der Entfernung des Laufmittels durch Abdampfen fiel ein Teil des Proteins als unlöslicher Niederschlag aus, auch nach der Gefriertrocknung konnte das Präparat nicht wieder vollständig in Lösung gebracht werden. Darüberhinaus verhielten sich die so gewonnenen Proben (Abb. 3-8), ruSap-B(RP) und rgSap-B(RP) in den

nachfolgenden Versuchen abweichend zu den Gelfiltrationspräparationen, sie zeigten z.B. anderes Bindungsverhalten gegenüber Liposomen.

rekombinantes Sap	gereinigtes Protein/Medium (mg/l)
rSap-B	12,3
rgSap-B (Bioreaktor)	~150
rvSap-B N215H (Patient)	3,9
rvSap-B N215Q	1,9
ruSap-D	10,5
ruSap-D (Bioreaktor)	~100

Tabelle 3-1 Ausbeuten nach der Aufreinigung, hochgerechnet auf 1 l Medium.

In Tabelle 3-1 sind einige typische Ausbeuten für Schüttelkolben- und Fermentationsansätze angegeben.

### 3.3 Charakterisierung

Die N-terminale Sequenzierung der Proteine erfolgte durch die Firma TopLab mit dem Verfahren des schrittweisen, modifizierten Edman-Abbaus.

Die Exportsequenz der rekombinanten Proteine wird von *P.pastoris* in zwei Schritten während der Sekretion entfernt: die Kex2-Protease schneidet nach LysArg bzw. ArgArg, die Ste13-Dipeptidylaminopeptidase entfernt sequenziell sich wiederholende GluAla-Reste. Danach erwartet man rekombinante Proteine, die mit ihrem nativen N-Terminus vorliegen (rSap-D), bzw. mit den durch die Klonierung eingefügten Aminosäuren beginnen (rSap-B).

Die Daten der Sequenzierung ergaben, daß Sap-B zum großen Teil vollständig prozessiert vorlag, weniger häufig wurde zusätzlich eine weitere (nicht native) N-terminale Aminosäure (Tyr) entfernt oder nur ein GluAla-Motiv erkannt. Eine Sap-B-Form mit beiden GluAla-Reste wurde bei der Sequenzierung nicht gefunden und war auch im MALDI-Spektrum nicht detektierbar. Die häufigste Form von Sap-D begann mit GluAlaGluAla. In Abhängigkeit vom Protein oder den Expressionsbedingungen nutzte die Ste13-Peptidase ihre Schnittstellen also nicht immer vollständig.

Mittels MALDI-MS konnten die bei der Sequenzierung gefundenen Formen ebenfalls bestätigt werden (Abb. 3-11 und Abb. 3-13). Die Mengenverhältnisse der unterschiedlichen Spezies wichen je nach Methode leicht voneinander ab, wobei die Signalintensität der MALDI-Messungen bei verschiedenen Ionen kein zuverlässiges Maß für deren relative Konzentrationen darstellt.

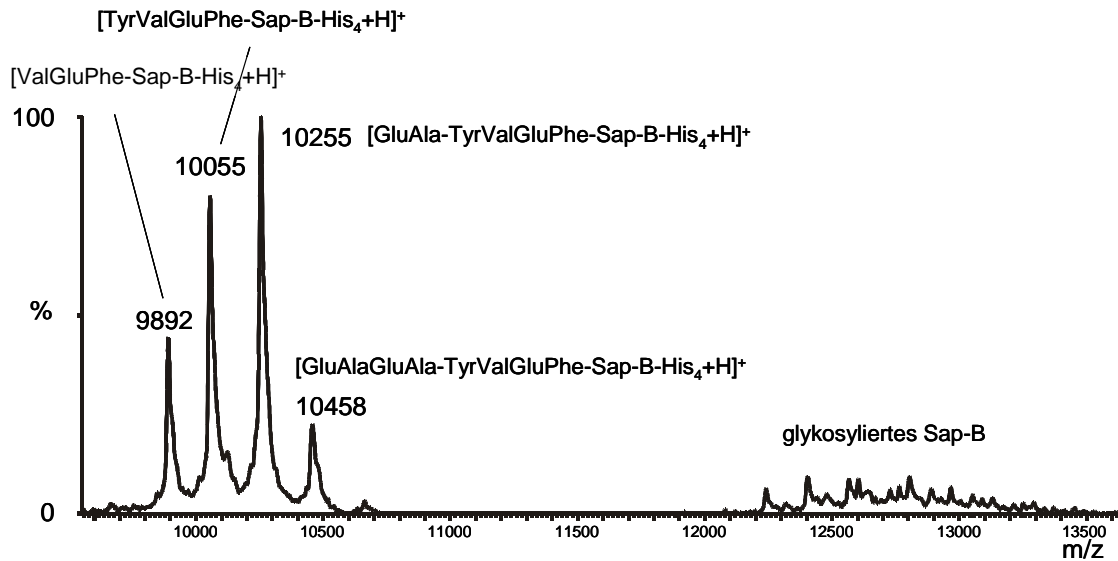


Abb. 3-11 MALDI-MS Spektrum von rSap-B (nach Kationentauscher-Chromatographie). Die unglykosylierten Formen sind gut aufgelöst, die glykosylierten befinden sich im Bereich von 12200 bis 13500 Da.  $[\text{GluAlaGluAla-TyrValGluPhe-Sap-B-His}_4+\text{H}]^+$  steht für das durch Protonierung einfach geladene Sap-B-Molekül mit nicht-prozessierter Signalsequenz (GluAlaGluAla), durch die Klonierungsstrategie künstlich eingeführten Aminosäuren (TyrValGluPhe) und vollständigem Tetrahistidinrest ( $\text{His}_4$ ), die anderen Bezeichnungen sind entsprechend zu verstehen; die Abweichung zwischen gemessenen und theoretischen Werten liegen bei maximal  $\pm 2$  Da (7.3).

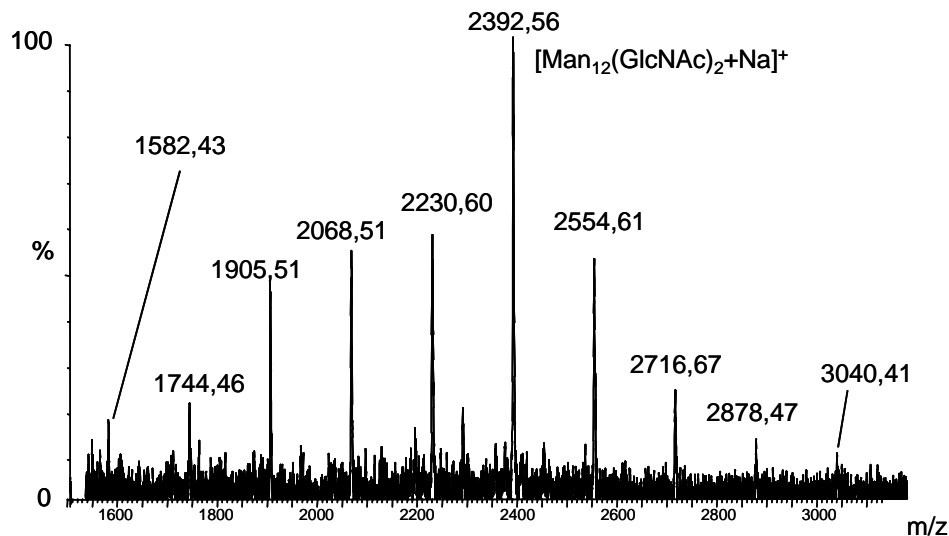


Abb. 3-12 MALDI-MS Spektrum der rSap-B-Glykane, zwei N-Acetylglucosamine (GlcNAc) sind mit 7 bis 16 Mannosen (Man) verknüpft, am häufigsten wird  $\text{Man}_{12}(\text{GlcNAc})_2$  gefunden, die Abstände zwischen den Signalen betragen jeweils 162 Da, was der Masse einer Hexose, hier der Mannose, entspricht; rgSap-B wurde mit PNGase F deglykosyliert, die freigesetzten Zucker wurden über Graphitsäulchen gereinigt; die Abweichung zwischen gemessenen und theoretischen Werten liegen bei maximal  $\pm 0,9$  Da (7.3).

Die glykosylierten Formen von Sap-B ließen sich im MALDI-MS nicht eindeutig auflösen, da sich die Signale von Proteinen mit inhomogenen N-Termini und mit verschiedenen Glykanstrukturen überlagerten. Deshalb wurden die Kohlenhydratreste abgespalten und separat charakterisiert. Dabei zeigte sich das für die Hefe *P.pastoris* typische, mannosereiche

Glykosylierungsmuster. Die Glykane enthielten zwischen 7 und 16 Mannosen, das am häufigsten gefundene Motiv war  $\text{Man}_{12}(\text{GlcNAc})_2$ , (Abb. 3-12).

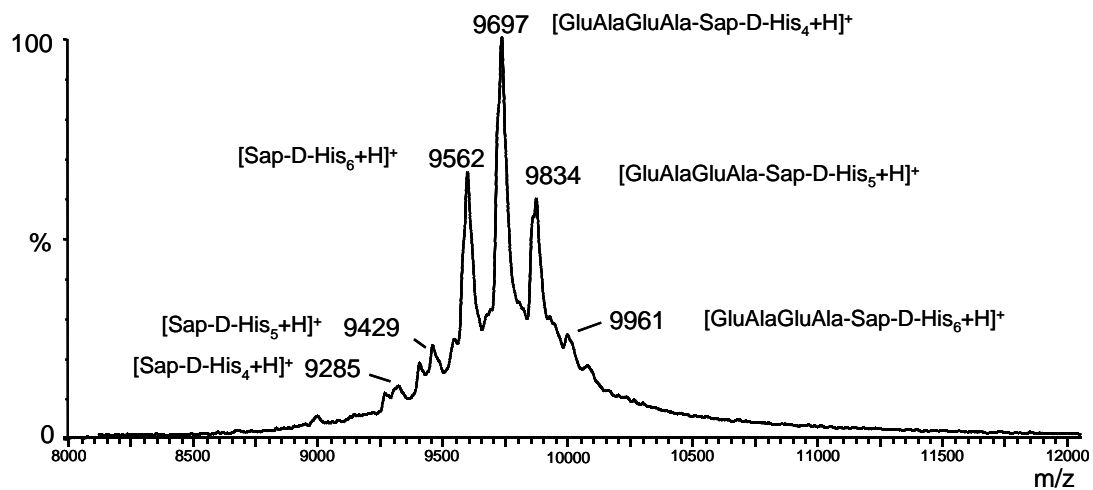


Abb. 3-13 MALDI-MS Spektrum von ruSap-D,  $[\text{GluAlaGluAla-Sap-D-His}_6+\text{H}]^+$  steht für das durch Protonierung einfach geladene Sap-D-Molekül mit nicht-prozessierter Signalsequenz (GluAlaGluAla) und vollständigem Hexahistidinrest ( $\text{His}_6$ ), die anderen Bezeichnungen sind entsprechend zu verstehen; im Bereich zwischen 12000 bis 14000 Da (nicht abgebildet), wo glykosylierte Formen erwartet würden, wurden keine Signale gefunden; die Abweichung zwischen gemessenen und theoretischen Werten liegen bei maximal  $\pm 7$  Da (7.3).

Sap-D besaß genau wie Sap-B einen inhomogen prozessierten N-Terminus, darüberhinaus wurden auch verkürzte Formen detektiert, die durch den partiellen Abbau einiger Histidinreste am C-Terminus entstanden sein müssen (Abb. 3-13).  $[\text{Sap-D-His}_6+\text{H}]^+$  und  $[\text{GluAlaGluAla-Sap-D-His}_3+\text{H}]^+$  haben eine Massendifferenz von nur 11 Da, deshalb ist nicht zu unterscheiden, welche der beiden Spezies tatsächlich auftrat.

### 3.4 Funktionalitätsstudien

#### 3.4.1 Untersuchungen zur Stimulierung des von Arylsulfatase A katalysierten Sulfatid-Abbaus durch Sap-B im mizellaren und liposomalen *in vitro* Assay und in Zellkulturstudien mit pSap-defizienten Fibroblasten

Die verschiedenen Sap-B-Präparate wurden *in vitro* und *in vivo* verglichen, um festzustellen, welchen Einfluß die Variation der Aminosäure in Position 215, die Glykosylierung und die Aufreinigung auf die Fähigkeit zur Stimulierung des durch die Arylsulfatase A katalysierten Sulfatidabbaus besaßen.

*In vitro* benötigte die Arylsulfatase A für den Abbau von Sulfatid zu Galaktosylceramid entweder ein Detergenz wie Taurodesoxycholat (TDC) oder Sap-B, unabhängig davon, ob das Substrat als Mizelle oder Bestandteil von Liposomen vorlag. TDC machte fast das gesamte Sulfatid aus Mizellen und 77% aus Liposomen für die Hydrolyse zugänglich, wie die entstandene Menge an Galaktosylceramid zeigte (Abb. 3-14). Dagegen wurden nur 50% (mizellar) oder 5% (liposomal) des vorhandenen Sulfatids abgebaut, wenn statt des Detergenz

## Ergebnisse

glykosyliertes, aus der Milz von Gaucher-Patienten aufgereinigtes hgSap-B eingesetzt wurde. In den Assays waren alle rekombinanten Sap-B-Präparate ebenfalls aktiv (Abb. 3-14), im Vergleich mit hgSap-B war ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Arylsulfatase aber geringer. Die unglykosylierten rekombinanten Formen, darunter auch die Variante, erreichten im mizellaren Assay 80-90%, im liposomalen immerhin 55-65% der Abbaurrate von hgSap-B; die glykosylierten rekombinanten Formen kamen dagegen nur auf 15-30% bzw. 25-40% dieser Rate. Die Aufreinigung über Reversed-Phase-Chromatographie verminderte die Aktivität bei den rekombinanten Formen geringfügig; ob dies auch für aus Gewebe aufgereinigtes hgSap-B gilt, ließ sich nicht überprüfen, da kein Vergleichspräparat ohne den Reversed-Phase-Schritt zur Verfügung stand: Die Reversed-Phase-Chromatographie gehört zum Standardreinigungsprotokoll aus Gewebe, da sie für die Trennung der einzelnen Saps voneinander entscheidend ist.

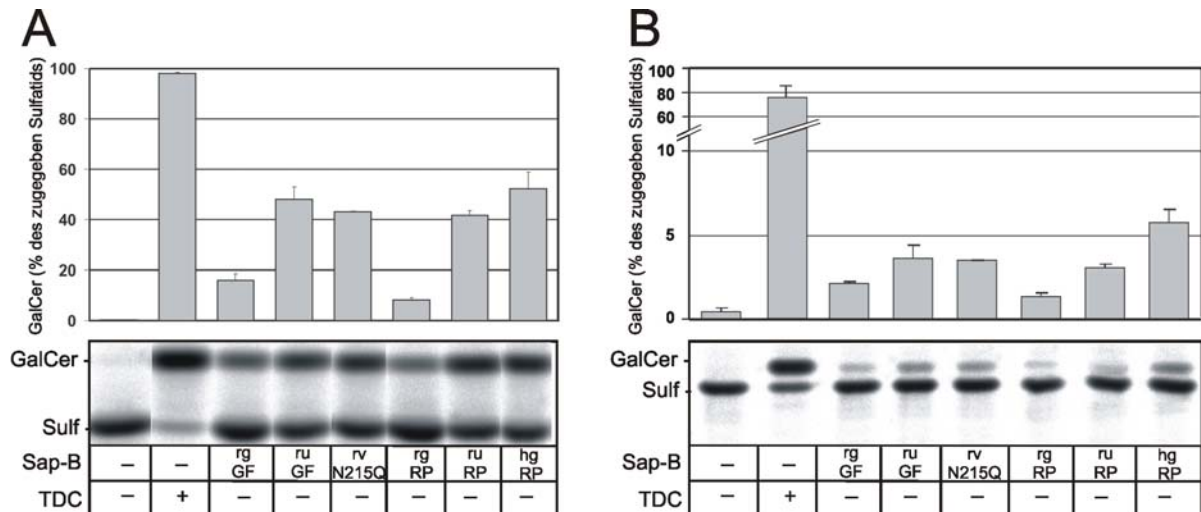


Abb. 3-14 Bestimmung der Aktivität verschiedener Sap-B-Präparate durch die Hydrolyse von [ $^{14}\text{C}$ ]-Sulfatid im mizellaren (A) und liposomalen (B) *in vitro* Assay. Die Ansätze (0,5 nmol [ $^{14}\text{C}$ ]-Sulfatid (A) oder Liposomen, 5 nmol PC/Chol/[ $^{14}\text{C}$ ]-Sulfatid, 80:10:10 mol% (B), 30 mU = 0,5 nkat Arylsulfatase A, 0,33 nmol Sap-B oder als Kontrolle 100 nmol Taurodesoxycholat, in 50  $\mu\text{l}$  (A) oder 100  $\mu\text{l}$  (B) 50 mM NaCit, pH 4,2) wurden für 2 h bei 37°C inkubiert, die Lipide über Dünnschichtchromatographie getrennt und quantifiziert. Angegeben ist der Mittelwert einer Doppelbestimmung mit einer Abweichung von weniger als  $\pm 10\%$ . Cer - Ceramid, GalCer - Galaktosylceramid, Sulf - Sulfatid, TDC - Taurodesoxycholat, d - deglykosyliert, g - glykosyliert, h - human, r - rekombinant, u - unglykosyliert, v - variant, GF/ RP - über Gelfiltration/ Reversed-Phase-Chromatographie gereinigtes Sap-B.

Während in den beiden betrachteten *in vitro* Systemen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Sap-B-Präparaten nur gradueller Natur waren, zeigten sie sich unter *in vivo* Bedingungen deutlicher (Abb. 3-15). So wurde in Kontrollfibroblasten ein Teil des radioaktiv markierten Sulfatids zu Galaktosylceramid und Ceramid abgebaut und dann weiter im Stoffwechsel eingesetzt, während bei pSap-defizienten Fibroblasten das Sulfatid gespeichert wurde. Der metabolischen Block konnte an dieser Stelle nur durch glykosyliertes Sap-B aufgehoben werden, das aus dem Sulfatid entstehende Galaktosylceramid lief dann seinerseits



wegen des Fehlens von Sap-A wieder auf. Bei der Stimulierung des Sulfatidabbaus erreichte rgSap-B 78% der Sulfatid-Abbaurates des aus Gewebe aufgereinigten hgSap-B, während bei keiner der unglykosylierten Formen das Reaktionsprodukt Galaktosylceramid detektierbar war, unabhängig davon, welche Aminosäure sich in Position 215 befand (N bei ruSap-B, D bei rdSap-B und Q bei rvSap-B).

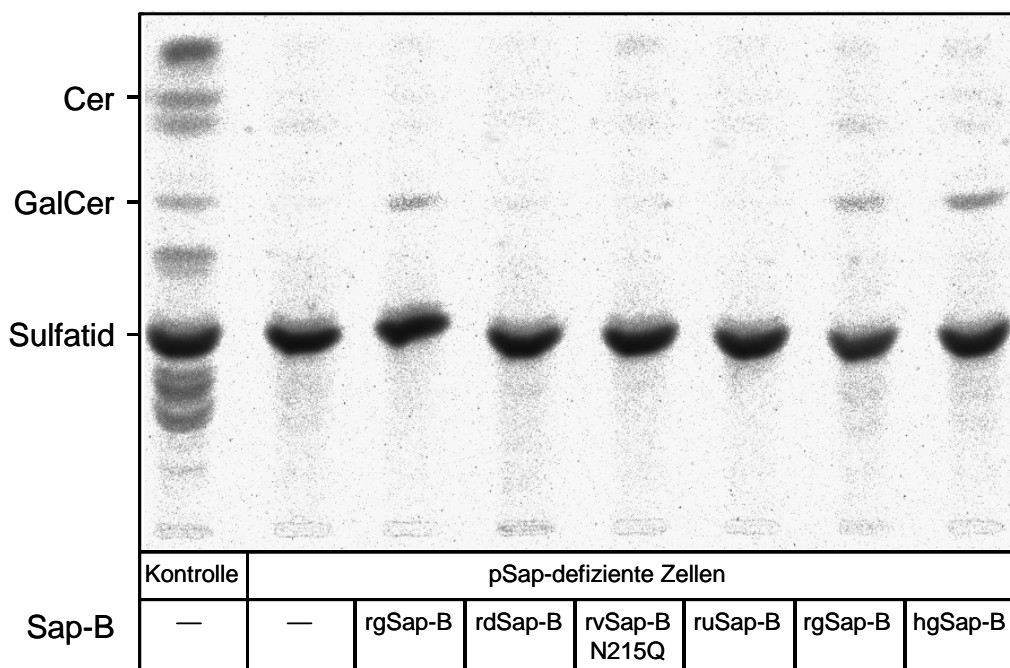


Abb. 3-15 Einfluß unterschiedlicher Sap-B-Präparate auf den Abbau von radioaktiv markiertem Sulfatid in pSap-defizienten und gesunden Kontrollfibroblasten. Die Zellen wurden mit Sap-B (25 µg/ml Medium) vorinkubiert, nach 24 h mit [<sup>14</sup>C]-Sulfatide (0,33 nmol/ml Medium) gefüttert, in Sap-haltigem Medium weitere 48 h inkubiert und dann geerntet. Die Lipide wurden anschließend dünnschichtchromatographisch getrennt (Laufmittel: Chloroform/Methanol/0,22% CaCl<sub>2</sub> in Wasser, 60:35:8, v/v/v) und mittels Phosphoimager visualisiert. Die Abbildung zeigt ein typisches DC, die Doppelbestimmungen zeigte eine Abweichung von weniger als ±10%; Cer – Ceramid, GalCer – Galaktosylceramid, d - deglykosyliert, g - glykosyliert, h – human, r – rekombinant, u – unglykosyliert, v – variant.

### 3.4.2 Untersuchungen zur Stimulierung des von der sauren Ceramidase katalysierten Ceramid-Abbaus durch Sap-D im liposomalen Assay

Die Fähigkeit des rekombinanten Sap-D, *in vitro* den Abbau von Ceramid zu Sphingosin und Fettsäure durch die lysosomale saure Ceramidase zu stimulieren, wurde in einen detergentenfreien, liposomalen Assay nachgewiesen. Als Substrat wurde das synthetische C18/12-Ceramid eingesetzt, dessen Abbaurates aufgrund der verkürzten (C12) Acylkette relativ hoch ist. Zwei varianten Sap-D-Formen, Sap-C und -B wurden ebenfalls untersucht.

Die eingesetzte Ceramidase, ein rekombinantes Präparat aus Insektenzellen, und ruSap-C aus *P.pastoris* stammten aus unserer Abteilung und wurden von Heike Schulze bzw. Silvia Locatelli-Hoops präpariert. Die varianten Sap-D-Formen, ruSap-D R15E und ruSap-D K8E, wurden von unseren Kooperationspartnern (Timm Maier und Maksim Rossocha, AG Prof. Wolfram Saenger, Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um

## Ergebnisse

unglykosylierte, rekombinante Proteine aus *P.pastoris*, die über Affinitätschromatographie (über ihren C-terminaler Hexahistidinrest) aufgereinigt wurden. Durch den Austausch der basischen Aminosäuren Arginin 15 und Lysin 8 durch ein saures Glutamat sollte festgestellt werden, ob - in Analogie zu den Befunden an Sap-C (Liu et al., 2005, Qi und Chu, 2004) - die Fähigkeit zur Membranbindung und Umstrukturierung beeinträchtigt wird (3.5.2.4), während gleichzeitig die Stimulierung beim Abbau des Ceramids erhalten bleibt, ob also die verschiedenen Funktionalitäten unterschiedlich lokalisiert sind.

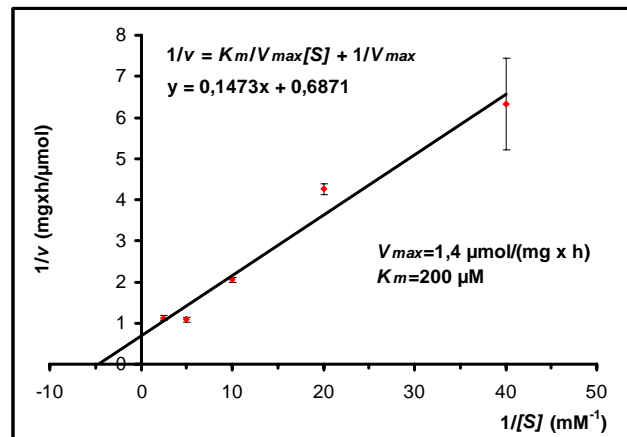


Abb. 3-16 Kinetische Analyse der rekombinanten sauren Ceramidase. Die spezifische Aktivität wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von C18/12-Ceramid (Cer) in den Liposomen gemessen (PC/C18/12-Cer/Chol/BMP, 60-x:x:20:20 mol%, x = 2,5/5/10/20/40), in 50 mM NaCit-Puffer bei pH 4,2 und unter Zugabe von 10 μM ruSap-D. Die Daten wurden reziprok aufgetragen (Lineweaver und Burk, 1934), die lineare Regression erfolgte mit Microsoft Excel.

Die kinetischen Parameter der rekombinanten Ceramidase wurden im liposomalen Assay mit einer konstanten Konzentration von ru-SapD (10 μM) bestimmt (Abb. 3-16). Die apparenten Werte betragen  $V_{max} = 1,4 \mu\text{M}/(\text{mg} \times \text{h})$  und  $K_m = 200 \mu\text{M}$ .

Die Ceramidase war auch ohne Stimulierung durch die Saps in geringem Maße in der Lage, das in den Liposomen dargebotene Ceramid abzubauen, BMP und ein niedriger pH-Wert waren dagegen notwendig (Abb. 3-17). Bei BMP-freien Liposomen oder neutralem pH-Wert erfolgte auch keine nennenswerte Stimulierung der Ceramidase durch ruSap-D. Erst durch BMP konnte ein bis zu viermal höherer Ceramidabbau abhängig von der Konzentration des Aktivators erreicht werden.

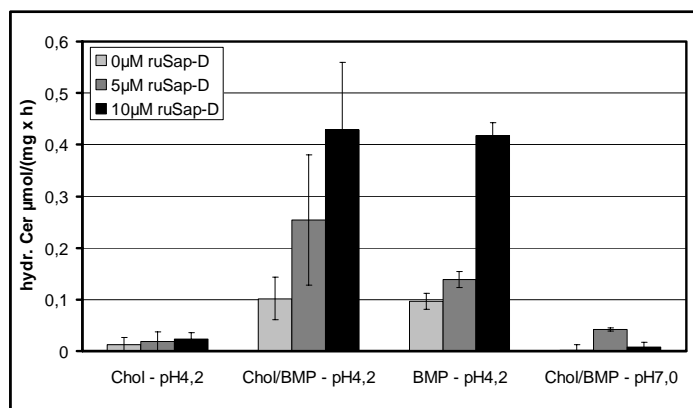


Abb. 3-17 Der Abbau von Ceramid durch die saure Ceramidase wird durch ruSap-D stimuliert und benötigt sowohl BMP als auch einen sauren pH-Wert. Der Reaktionsansatz des liposomalen Assays (Liposomen mit 1 mM Lipidgesamt-konzentration, 0/5/10 µM ruSap-D, 3 µg Ceramidase, in 100 µl 50 mM NaCit) wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Es wurden folgende Liposomenarten eingesetzt: Chol - PC/Chol/ C18/12-Ceramid (Cer), 70:20:10 mol%; Chol/BMP - PC/Chol/BMP/ C18/12-Cer, 50:20:20:10 mol%; BMP - PC/BMP/ C18/12-Cer, 70:20:10 mol%. Die Detektion des gebildeten Sphingosins erfolgte über sein fluoreszierendes Derivat, die Quantifizierung anhand interner Standards. Alle Bestimmungen erfolgten mindestens zweifach, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

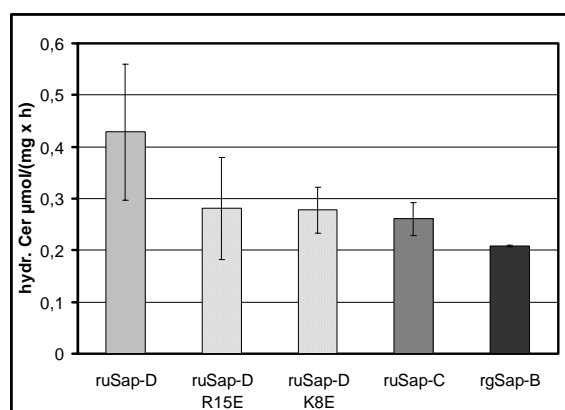


Abb. 3-18 ruSap-D stimuliert den Abbau von Ceramid mehr als die variante Formen, ruSap-C oder rgSap-B. Der Reaktionsansatz des liposomalen Assays (Liposomensuspension: 1 mM Lipidgesamt-konzentration, PC/Chol/BMP/ C18/12-Ceramid (Cer), 50:20:20:10 mol%, 10 µM Sap, 3 µg Ceramidase, in 100 µl 50 mM NaCit, pH 4,2) wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion des gebildeten Sphingosins erfolgte über ein fluoreszierendes Derivat, die Quantifizierung anhand interner Standards. Alle Bestimmungen erfolgten mindestens zweifach, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die varianten Sap-D-Formen und ruSap-C, aber auch rgSap-B stimulierten die Ceramidase ebenfalls (Abb. 3-18). Der Austausch jeweils einer Aminosäure in Sap-D führte in beiden Fällen zur Abnahme des Reaktionsumsatzes auf etwa 60%. Anscheinend beeinflussten sowohl R15 als auch K8 die Stimulierung des Ceramidabbaus, aber in keiner der beiden Positionen ist die ursprüngliche Aminosäure unbedingt notwendig. Sap-C stimuliert die Ceramidhydrolyse erwartungsgemäß weniger als Sap-D (Linke et al., 2001b); Sap-B stimuliert die saure Ceramidase weniger (Azuma et al., 1994, Klein et al., 1994).

### 3.5 Biophysikalische Untersuchungen

#### 3.5.1 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

##### *Charakterisierung der Aktivatoren mittels DLS*

Durch Gelfiltration (6.4.5) ließ sich feststellen, ob die Saps als Monomere, Dimere oder höhere, oft irreversibel denaturierte Aggregate vorlagen. Diese Informationen sind interessant für die Untersuchung möglicher Reaktionsmechanismen aber auch für die geeignete Wahl von Puffern und Lagerungsbedingungen. Sie sollten sich auch aus der Partikelgröße ableiten lassen, so daß eine DLS-Messung die aufwendigere Chromatographie hätte ersetzen können. Leider lieferte die Vermessung der Proteine aber keine auswertbaren Ergebnisse, da die Streuintensität zu schwach war, die Saps mit einer Größe von ca. 10 kDa an der unteren Grenze des Meßbereich lagen, und so die Auflösung nicht ausreichte, um zwischen Mono- und Dimeren zu unterscheiden.

##### *Charakterisierung der Liposomen mittels DLS*

Da für die Charakterisierung der Membranaktivität der Saps Liposomen mit definierten Eigenschaften benötigt wurden, wurde nicht nur ihr tatsächlicher Lipidgehalt analysiert (6.5.2), sondern auch ihre Größe, Form und die Zeit, über die sie stabil waren.

Liposomen, die mit der Extruder-Methode (6.5.1) unter Verwendung einer Membran mit 100 nm-Poren („100 nm“) hergestellt wurden, hatten sowohl bei der DLS-Messung als auch im Mikroskop den erwarteten, einheitlichen Durchmesser von 100 nm. Die BMP-haltigen Liposomen waren etwas kleiner als die reinen PC/Chol-Liposomen, und erschienen im DLS einheitlicher: das Signal für BMP-haltige Liposomen war an der Basis 14 nm (von 86 bis 100 nm) breit, das für BMP-freie 44 nm (Tabelle 3-2). Deutlich kleinere Liposomen ließen sich mit der Extruder-Methode nicht darstellen, denn die Unterschiede zwischen der Verwendung einer Membran mit 100 oder 50 nm-Poren waren gering (Abb. 3-19, Abb. 3-20 und Tabelle 3-2; die Auswertung durch die Software des DLS-Gerätes läßt nur die Angabe des Radius in den Abbildungen zu, im Text werden aber alle Werte in den Durchmesser umgerechnet, da dieser Wert für Liposomen üblicher ist). Auch nach einer Woche Lagerung bei 4°C blieb die Größenverteilung der Liposomen stabil (Abb. 3-19).

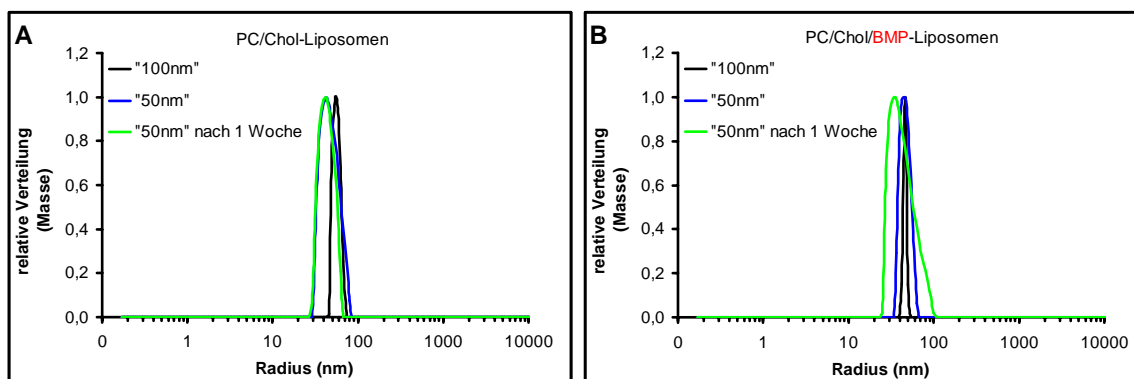


Abb. 3-19 Größenverteilung der Liposomen (Lipidkonzentration 0,5 mM in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5 bei 25°C), in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung (A: PC/Chol, 77:23 mol% oder B: PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol%), von der Porengröße der zu ihrer Darstellung verwendeten Membran (in nm) und von der Dauer der Aufbewahrung.

Liposomenart	DLS		Mikroskopie	
	D (nm)	Mittelwert (nm)	D (nm)	Mittelwert (nm)
PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol% „100 nm“	86-100	92±4	68-124	94
PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol% „50 nm“	54-126	89±4	70-110	81
PC/Chol, 77:23 mol% „100 nm“	92-136	112±6	96-130	115
PC/Chol, 77:23 mol% „50 nm“	62-158	9±4	80-116	93

Tabelle 3-2 Liposomen-Durchmesser (D), jeweils kleinster und größter gemessener Wert und Mittelwert

Neben der reinen Größenverteilung lieferten die Mikroskopieaufnahmen zusätzliche Informationen über das Aussehen der Liposomen. Die Liposomen ohne BMP zeigten eine gleichmäßige Kugelform und waren überwiegend unilamellar (Abb. 3-20 A), während die BMP-haltigen Liposomen unregelmäßig verformt (Abb. 3-20 B), teilweise als Aggregate mit multilamellaren Strukturen (Abb. 3-20 C) oder auch fusioniert vorlagen (Abb. 3-20 D).

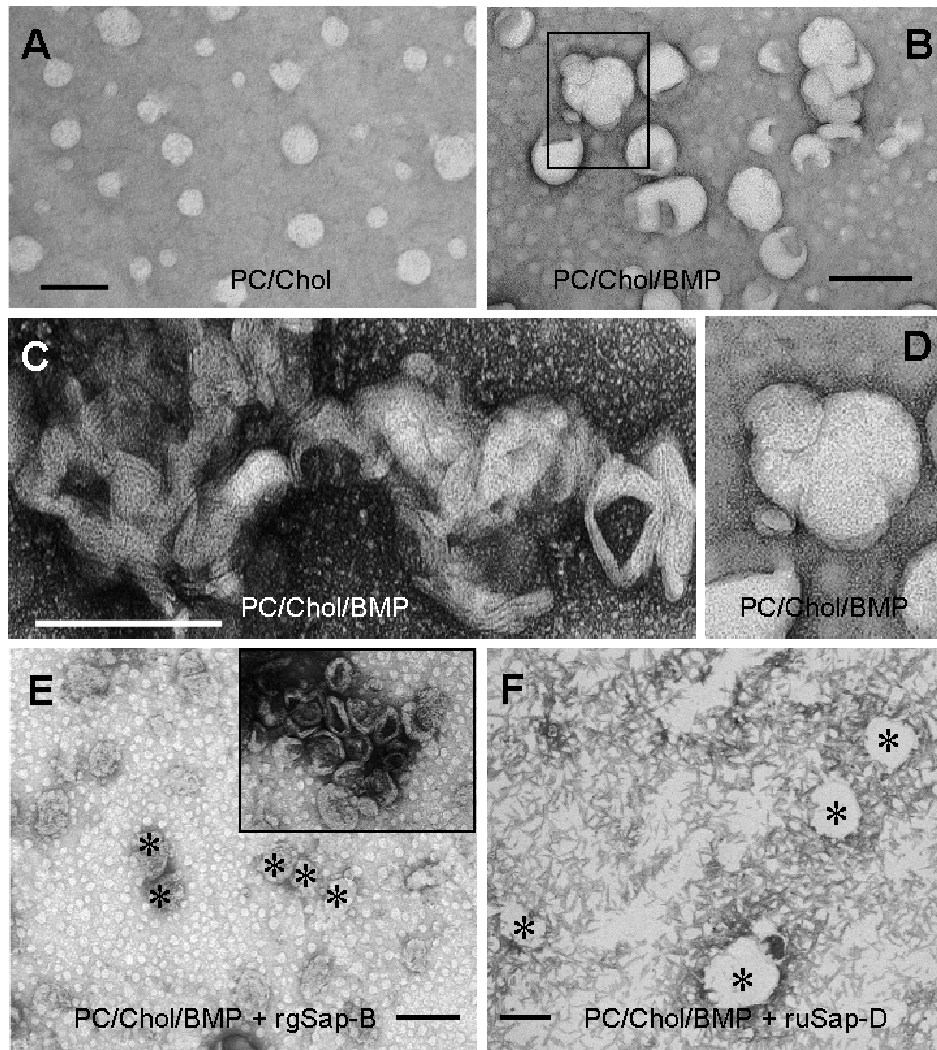


Abb. 3-20 Elektronentransmissionsmikroskopie an uranylacetatfixierten Liposomen; zu ihrer Darstellung wurden Membranen mit einer Porengröße von 50 nm verwendet. Während BMP-freie Liposomen (PC/Chol, 77:23 mol%) die erwartete, gleichmäßige Form besaßen (A), traten bei BMP-haltigen Liposomen (PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol%, B-D) auch multilamellare (C), aggregierte oder fusionierte Strukturen (D, Vergrößerung aus B) auf; die Zugabe von rgSap-B (16  $\mu$ M) zu BMP-haltigen Liposomen (0,5 mM Lipidgesamtgehalt, in 50 mM NaCit, pH 4,5) führte zu keiner Veränderung der Liposomengröße (E), auch die multilamellaren Strukturen blieben erhalten (Insert von E); unter den gleichen Versuchsbedingungen führte die Zugabe von ruSap-D nach ca. 5 min zur Vergrößerung der Liposomen (F). Der Balken entspricht 200 nm; Liposomen sind teilweise mit \* gekennzeichnet; die hellen, kleinen Punkte in E sind Artefakte, die durch eine ungleichmäßige Beschichtung des Grids verursacht wurden.

Sowohl die reinen PC/Chol-Liposomen, als auch die BMP-haltigen waren gegenüber einer spontanen Fusion relativ stabil, da beide Arten bei pH 4,5 auf ihrer Oberfläche Ladungen trugen: PC hat einen pI von ca. 6-7 (Chain und Kemp, 1934) und lag demnach kationisch vor, BMP dagegen anionisch. Während PC ein guter Liposomenbildner war, neigte BMP dazu, die Liposomen zu verformen und multilamellare Strukturen zu bilden, diese Eigenschaft wurde bereits beschrieben (Matsuo et al., 2004).

**Die Liposomen veränderten sich bei Zugabe von rgSap-B nicht, anionische Liposomen wurden dagegen durch Zugabe von ruSap-D vergrößert und bildeten Aggregate.**

Nach der Charakterisierung der Liposomen wurde untersucht, welchen Einfluß die Zugabe verschiedener Sap-Präparationen auf ihre Größe und Struktur hatte.

Die Zugabe von rgSap-B bei pH 4,5 zu Liposomen mit oder ohne anionischen Lipiden (20 mol% BMP, PA) führte zu keiner Veränderung der Liposomengröße (Abb. 3-21). Auch die Mikroskopaufnahme zeigte kaum eine Veränderung der Größe (im Durchschnitt  $r_{\text{Mikroskopie}} = 48,5 \text{ nm}$  zu vorher  $r_{\text{Mikroskopie}} = 40,5 \text{ nm}$  bzw.  $r_{\text{DLS}} = 44,5 \text{ nm}$ ), die Liposomen waren heterogen und häufig multilamellar (Abb. 3-20 E und Insert).

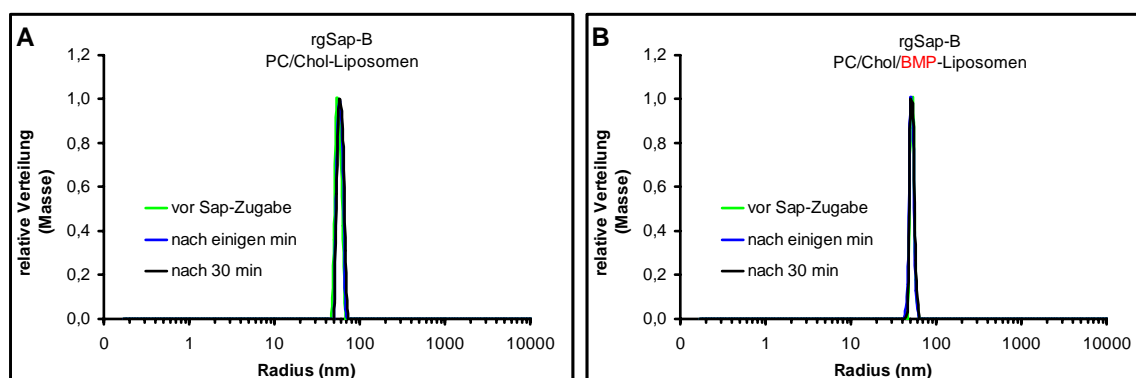
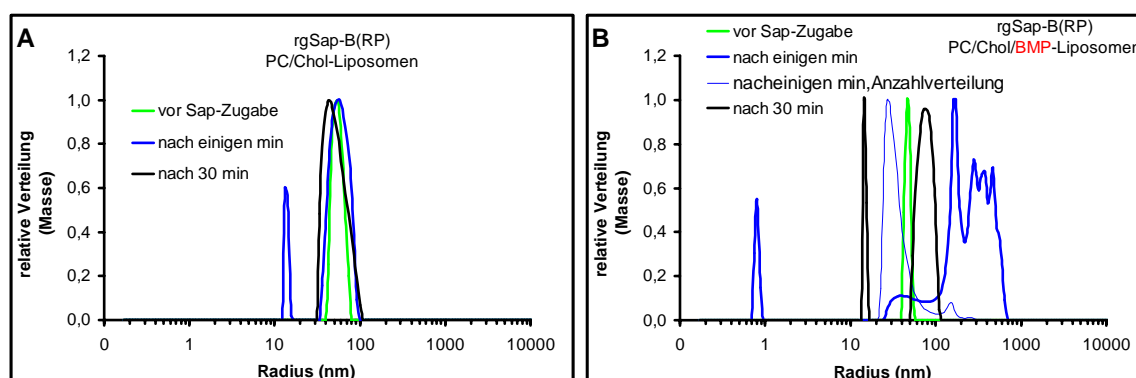


Abb. 3-21 Die Zugabe von rgSap-B veränderte den Durchmesser der Liposomen nicht. Die Lipidgeamtconzentration der Liposomensuspension (A: PC/Chol, 77:23 mol%, B: PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol%) betrug 0,5 mM, die von rgSap-B 16  $\mu\text{M}$  in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5 bei 25°C.

Die über Reversed-Phase-Chromatographie gereinigten Sap-B-Präparate - ruSap-B(RP) und rg-Sap-B(RP) – verbreiterten das Liposomensignal und verschoben es - bei BMP-haltigen Liposomen - zu höheren Werten, ein Teil der Liposomen bildete Aggregate, die eine leichte Trübung der Suspension verursachten, kurzfristig erschienen auch Strukturen von nur einigen nm Radius (Abb. 3-22).



## Ergebnisse

Abb. 3-22 Die Zugabe von über Reversed-Phase-Chromatographie gereinigtem rgSap-B führte bei reinen PC/Chol-Liposomen zu einer leichten Verbreiterung der Größenverteilung, bei BMP-haltige Liposomen dagegen zur Vergrößerung des Durchmessers und zur Aggregatbildung. Die Lipidgesamtkonzentration der Liposomensuspension (A: PC/Chol, 77:23 mol%, B: PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol%) betrug 0,5 mM, die von rgSap-B(RP) 16µM in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5 bei 25°C. Die Daten für ruSap-B(RP) sind ähnlich.

Im Vergleich dazu trübte sich die Liposomensuspension nach Zugabe von ruSap-D stärker: das Signal lag an der Obergrenze des DLS-Meßbereichs, da die Liposomen, die anionische Lipide enthielten, fast vollständig ausfielen. In den dadurch entstehenden Strukturen befand sich der größte Teil der ursprünglichen Masse, dagegen lag der Radius der häufigsten Partikel bei einigen hundert nm (Abb. 3-23, B). Im Mikroskop fanden sich 10 min nach Sap-Zugabe Liposomen mit 88 bis 157 nm Radius, im Mittel 113 nm, die keine ungleichmäßige Oberfläche mehr hatten sondern rund aussahen (Abb. 3-20 F). Bei PC/Chol-Liposomen verbreiterte sich der Radius auf einen Bereich zwischen 25-100 nm (Abb. 3-23, A), zwischenzeitlich traten auch hier Aggregate auf.

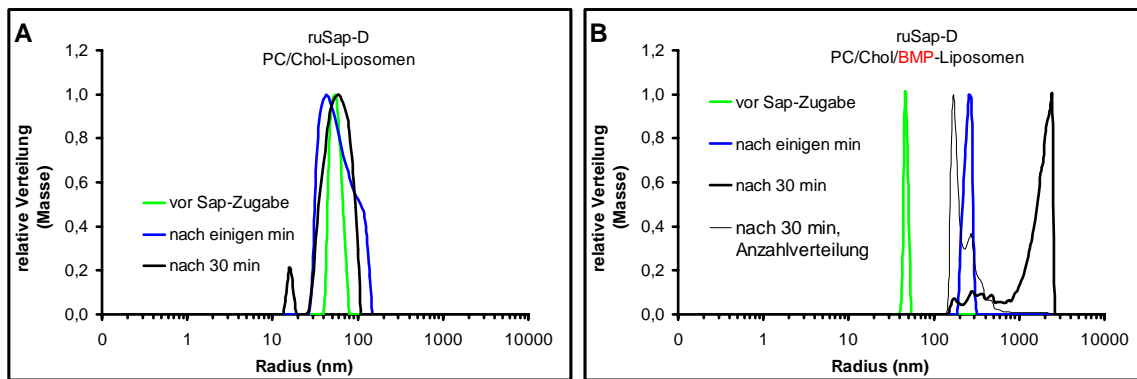


Abb. 3-23 Die Zugabe von ruSap-D führte bei reinen PC/Chol-Liposomen zu einer deutlichen Verbreiterung der Größenverteilung, bei BMP-haltigen Liposomen dagegen zur Vergrößerung des Durchmessers und zur Aggregatbildung. Die Lipidgesamtkonzentration der Liposomensuspension (A: PC/Chol, 77:23 mol%, B: PC/Chol/BMP, 57:23:20 mol%) betrug 0,5 mM, die von ruSap-D 16µM in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5 bei 25°C.

Die Ergebnisse waren im Rahmen der Meßgenauigkeit der Methode unabhängig vom „nominalen“ Durchmesser (50 und 100 nm, entsprechend der zur Darstellung verwendeten Membran) der Liposomen, der Art des anionischen Lipids (BMP oder PA) und vom Mengenverhältnis Aktivator zu Lipid (gemessen im Bereich 1:10 bis 1:1000, die dargestellten Messungen lagen dazwischen bei ca. 1:30).

### 3.5.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR)

#### 3.5.2.1 Immobilisierung von Sap-D

Über die direkte Wechselwirkung zwischen Sap-D und der Ceramidase wird spekuliert, da es häufig zu deren Co-Aufreinigung aus Gewebe kommt (Azuma et al., 1994). Üblicherweise wird für SPR-Messungen der kleinere (potentielle) Interaktionspartner immobilisiert, weil die Bindung des größeren dann höhere Signale proportional zur Molekülmasse liefert. Die



reversible Bindung von Sap-D über seinen Histag an eine Affinitätsmatrix eignete sich nicht für die relevanten, niedrigen pH-Werte, deshalb wurde Sap-D kovalent auf einem CM5-Chip immobilisiert, um dann die Ceramidase als Analyt zu injizieren.

An einem Teil der primären Aminogruppen (N-Terminus und Aminosäureseitenketten) von Sap-D wurden Sulfhydrylgruppen eingefügt, während die Carboxylgruppen auf der Chipoberfläche durch die Einführung von Disulfiden mit guten Abgangsgruppen aktiviert wurden (6.7.2.1). Nach der Kupplung wurden überzählige Bindungsstellen auf dem Chip mit Cystein deaktiviert. Die Kupplung von ruSap-D an den Biacore CM5-Chip lieferte proportional zur injizierten Proteinmenge Beladungen (um den RU-Wert der Negativkontrolle korrigiert) von ca. 550 RU (Zelle Z2), 1070 RU (Z3) und 35670 RU (Z4), die allerdings sehr stark absanken, nachdem der Chip für einige Tage in Meßpuffer (50 mM NaCit, 200 mM NaCl, pH 4,2) gelagert worden war (Z2: nicht mehr meßbar, Z3: 500 RU, Z4: 20000 RU). Auch die Regeneration, das heißt die Wiederherstellung der Ausgangsbedeckung des Chips nach der Injektion eines Analyten (saure Ceramidase, BSA) und der Überleitung verschiedener Puffer, Lösungsmittel, Detergenzien, u.a., verlief nur unvollständig (Z3) oder unter weiterem Materialverlust (Z4). Diese Befunde deuteten darauf hin, daß ein großer Teil des Saps nicht kovalent immobilisiert, sondern nur adsorbiert war, und daß der Analyt unspezifisch an freie Stellen auf der Chipoberfläche band. Die Bedeckung des Chips mit Sap-D war weder stabil noch homogen.

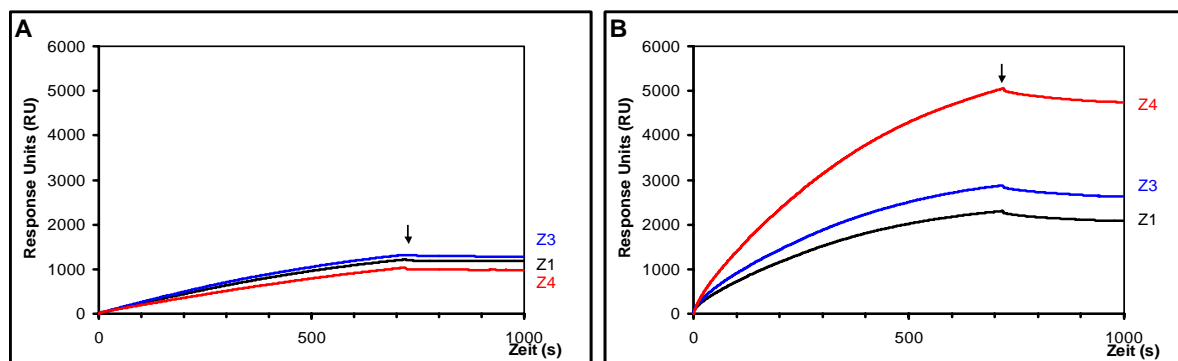


Abb. 3-24 Nach der Immobilisierung von ruSap-D auf dem CM5-Chip wurden rekombinante saure Ceramidase (A) oder BSA (B), beide 100 nM in Puffer (50mM NaCit, 200 mM NaCl, pH 4,2), für 720 s mit einer Flußrate von 10  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 180 s über den Chip geleitet. Auf dem Chip in Flußzelle 1 (Z1) war kein ruSap-D immobilisiert (Negativkontrolle), in Z3 waren ca. 500 RU, in Z4 ca. 20000 RU (entsprechend ca. 0,5 ng/0,05 pmol oder 20 ng/2 pmol ruSap-D pro  $\text{mm}^2$ ) gebunden.

Der Vergleich von von BSA und saurer Ceramidase ließ keine Spezifität für letztere gegenüber Sap-D erkennen (Abb. 3-24), während die Anbindung von BSA anscheinend proportional zur Menge an ruSap-D auf dem Chip war.

Der Ansatz, über Immobilisierung der Saps ein geeignetes System für die Messung ihrer Interaktion mit Enzymen zu entwickeln, erschien nach diesen ersten Meßdaten nicht erfolgversprechend. Außerdem hätte man ein Verfahren finden müssen, um festzustellen, ob das modifizierte, gebundene Sap-D überhaupt noch funktional ist, also in der Lage, den Ceramidabbau zu stimulieren. Die Methode wurde deshalb nicht weiterverfolgt.

### 3.5.2.2 Immobilisierung von Liposomen und Kontrollmessungen

Das Verhalten der Saps gegenüber Membranen und ihre Spezifität gegenüber verschiedenen Lipiden sollte an immobilisierten Liposomen untersucht werden. Die Bindung der Liposomen erfolgte reversibel durch Insertion der Alkylketten des L1-Chips in die Lipiddoppelschicht und erforderte keine bestimmte Zusammensetzung oder Modifikation der Lipide.

Als Standard für die SPR-Messungen wurde folgende Vorgehensweise gewählt, da sie eine reproduzierbare Immobilisierung der Liposomen auf dem Chip und dessen Regeneration nach der Messung gewährleistete:

- Immobilisierung der Liposomen (Liposomensuspension mit einer Lipidgesamtkonzentration von 0,5 mM in PBS-Puffer) auf einem L1-Chip;
- Messung mit einer Analyt-Konzentration (der Analyt ist der nicht immobilisierte Interaktionspartner bei einer Biacore-Messung) von 5  $\mu$ M: Injektion von 60  $\mu$ l der Analyt-Lösung bei einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min (entsprechend 180 s), dann Injektion des reinen Puffers mit identischer Flußrate für 220 s, der Übergang ist in den Abbildungen durch einen Pfeil gekennzeichnet;
- Regeneration, d.h. Entfernung aller gebundenen Liposomen, Lipide oder Proteine durch 20 mM CHAPS und 50 mM NaOH
- Raumtemperatur, kontrolliert während der gesamten Messung.

Die Beladung des Sensorchips mit Liposomen lieferte für gleiche Liposomenzusammensetzung reproduzierbare Werte im Bereich zwischen 4000-10000 RU. Die Beladungsdichte sollte von der elektrostatischen Abstoßung der Liposomen durch den Gehalt an geladenen Lipiden und der Membranfluidität bzw. -permeabilität abhängen (Anderluh et al., 2005, Baird et al., 2002). Ein höherer Cholesterolgehalt förderte anscheinend die Insertion der chip-gebundenen Alkylketten in die Lipiddoppelschicht der Liposomen, während die negative Ladung des BMP durch die gegenseitige Abstoßung der Liposomen zu einer verminderten Beladungsdichte führte (Abb. 3-25).

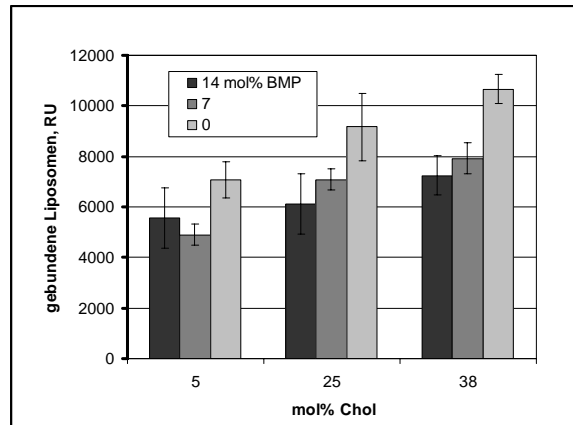


Abb. 3-25 Immobilisierung der Liposomen auf dem Bioacore-Chip, gebundene Menge in Abhängigkeit von der Zusammensetzung (PC-Gehalt: 100 mol%-x mol% BMP-y mol% Chol; x, y wie angegeben); die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Ist eine einzelne Zelle des Chips (Fläche:  $1,2 \text{ mm}^2$ , Volumen:  $0,02 \mu\text{l}$ ) mit einer Lipid-Monoschicht bedeckt, entspricht das ca. 2200 RU (Cooper et al., 1998), eine Doppelschicht ergibt demnach ein Signal bei 4400 RU, ab etwa 6000 RU liegt eine homogene Bedeckung mit intakten Liposomen vor (Cooper et al., 2000), und für die Werte dazwischen eine Mischung aus intakten und fusionierten Liposomen oder multilamellaren Strukturen, abhängig von der Zusammensetzung der Liposomen. Nach der Beladung mit Liposomen wurde der RU-Wert auf Null gesetzt, um die Messungen besser vergleichen zu können, die Grundlinie des leeren Chip liegt also einige Tausend RU (entsprechend der gebundenen Liposomenmenge) unterhalb der Nulllinie. Die Liposomenbeladung war stabil und reversibel: bei Pufferüberleitung änderte sich die Grundlinie nicht, durch das Detergenz CHAPS (20 mM) konnten die Lipide innerhalb von Sekunden wieder vollständig entfernt und der Chip regeneriert werden (Abb. 3-26, A), d.h. die Absolutwerte (in RU) vor der Beladung des Chips mit Liposomen und nach der Injektion von CHAPS und reinem Puffer sind identisch. Der Abfall des CHAPS-Signals bei 120 s gibt die Änderung des Brechungsindex beim Übergang von CHAPS-haltigem zu reinem Puffer wieder. Er fällt wahrscheinlich deshalb stärker aus als der übliche Effekt beim Pufferwechsel, weil sich CHAPS auf der hydrophoben Chip-Oberfläche anreichern kann.

Die Standard-Meßparameter und deren Variationen (in eckigen Klammern, s.u.) ergaben sich aus der zugrundeliegenden Modellvorstellung (Abb. 2-2) zur Funktionsweise der Saps. Die Liposomenzusammensetzung und -größe wurde gewählt, um die intralysosomalen Vesikel nachzustellen, der pH-Wert und die Konzentration der Saps sollten möglichst den Zuständen im Lysosol nahekommen. Im Einzelnen:

## Ergebnisse

- 50 [109/ 150] mM Natriumcitrat (NaCit), pH 4,2 [5,5/ 7,0];
- Liposomen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm und der Zusammensetzung  
Phosphatidylcholin (PC)/Cholesterol (Chol)/Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP),  
61:25:14 mol% [Chol 5, 25, 38 mol%, BMP 0, 7, 14 mol%];
- Zugabe von anionischen Lipiden bzw. den Substraten der von Sap-B und -D stimulierten Reaktionen: Phosphatidsäure(PA), Sulfatid (Sulf) oder Ceramid (Cer).

BSA und Cytochrom c (Cyt c) als Kontrollsubstanzen zeigten unter allen untersuchten Bedingungen starke Anbindung in der Assoziationsphase (Überleitung von Puffer mit Analyt für 180 s bei 20  $\mu$ l/min), die während der Dissoziationsphase (Überleitung des reinen Puffers, ab dem Zeitpunkt 180 s für 220 s bei 20  $\mu$ l/min) nur langsam und unvollständig zurückging (Abb. 3-26, A).

Die Chip-Oberfläche selbst war ebenfalls in der Lage, Proteine zu binden, allerdings gelangt die anschließende Entfernung der Proteine nicht mit Puffer (Abb. 3-26, B), sondern nur unter denaturierenden Bedingungen mit Detergenzien (SDS).

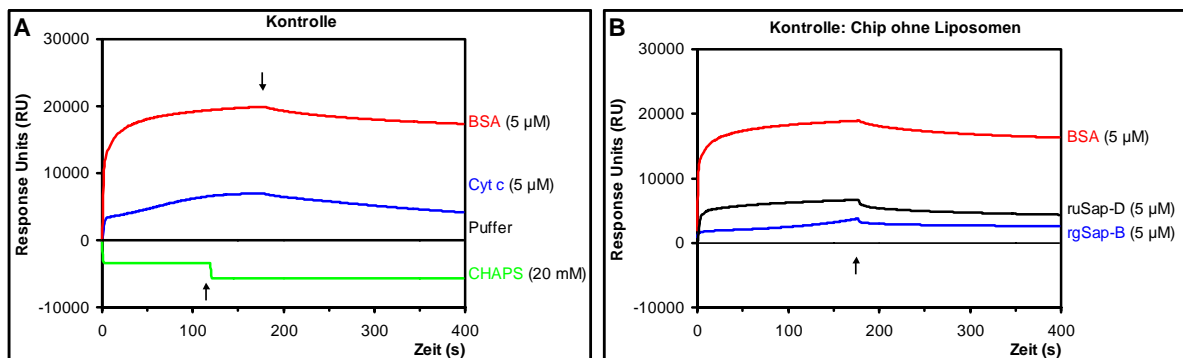


Abb. 3-26 Kontrollen. A: Nach der Immobilisierung von Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) auf dem L1-Chip wurden BSA, Cyt c, CHAPS in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständige Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht, BSA und Cyt c banden an die immobilisierten Liposomen und dissoziierten nur langsam wieder ab, während CHAPS die Liposomen vollständig vom Chip entfernte (zur Schonung des Chip wurde eine kürzere Injektionszeit von 120 s gewählt). B: Ohne Immobilisierung der Liposomen, nach Injektion der Proteinlösung (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s bei 20  $\mu$ l/min gefolgt von reinem Puffer, war der Chip ebenfalls in der Lage, Protein zu binden.

Erst nach ca. 50 Messungen summierten sich Lipid- und Protein-Rückstände, aber wahrscheinlich auch Degenerationseffekte des Chipmaterials, zu einer irreversiblen, meßbaren Änderung der Absolutwerte (10% Abweichung des Leersignals) und zu einer verminderten Bindungskapazität für die Liposomen, der Chip wurde dann ausgetauscht. Als Folge wichen die Meßkurven beim direkten Vergleich leicht voneinander ab, aber gleiche Veränderungen der Meßparameter lieferten weiterhin gleichgerichtete Änderungen der

Meßwerte. Erst bei späteren Chip-Chargen sank die Bindungskapazität für Liposomen deutlich, so daß die Vergleichbarkeit eingeschränkt war (Abb. 3-32, C, ruSap-B). Die Messungen wurden bis zu viermal wiederholt, abgebildet sind jeweils repräsentative Kurven einer Messung.

### 3.5.2.3 Sap-B

***rgSap-B mobilisiert Lipide aus immobilisierten Liposomen, dieser Effekt und die Bindung an Liposomen ist konzentrationsabhängig.***

Das Verhalten von rgSap-B unter Standard-Bedingungen wich deutlich von den Kontrollen ab: nach einem kurzen Anstieg des Signals fiel die Kurve steil ab und unterschritt noch während der Assoziationsphase die Nulllinie, das Überleiten von reinem Puffer ließ das Signal dann noch weiter absinken (Abb. 3-27). Es wurde kein Signalplateau erreicht, das der Absättigung der Liposomen mit Sap entsprechen hätte. Je mehr Sap mit den Liposomen interagieren kann, desto höher ist die Bindung, desto so steiler fällt die Kurve ab und desto größer ist die Differenz zwischen maximalem und minimalem Signal.

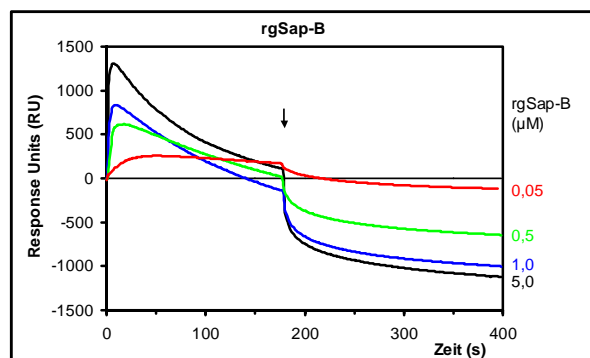


Abb. 3-27 Konzentrationsabhängigkeit. Nach der Immobilisierung von Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) auf dem L1-Chip, wurde rgSap-B in den angegebenen Konzentrationen (in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20 µl/min injiziert, danach (↓) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. rgSap-B band konzentrationsabhängig an Liposomen. Die Bindung erreichte kein Sättigungsniveau, sondern das Signal fiel schon in der Anbindungsphase bis unter die Nulllinie ab, entsprechend einem Materialverlust auf der Chipoberfläche durch die Mobilisierung von Lipiden aus den immobilisierten Liposomen.

Die Behandlung mit CHAPS führte zur vollständige Entfernung der Liposomen. Die RU-Differenz zwischen Nulllinie (vollständige Beladung mit Liposomen) und RU-Wert am Endpunkt der Messung entsprach in diesem Fall einem Masseverlust auf dem Chip. Analog kann man das Phänomen bei rgSap-B als Mobilisierung von Lipiden aus den Liposomen oder Solubilisierung der Liposomen und anschließende „Abschwemmung“ erklären. Da man einen kontinuierlichen Prozeß hinter dem Kurvenverlauf vermuten kann, beginnt der Materialverlust auf dem Chip vermutlich schon vor der Unterschreitung der Nulllinie mit dem Abfallen des Signals und überschneidet sich mit der Anbindung. Da die Meßkurven des Saps also offensichtlich nicht dem üblichen Prozeß der Assoziation und Dissoziation entsprechen,

sondern eine Überlagerung mehrerer Prozesse darstellen, ist eine quantitative Auswertung der Meßdaten zur Extraktion kinetischer Parameter nicht sinnvoll. Stattdessen wurden die Daten qualitativ interpretiert.

Die Zusammensetzung und Struktur des auf dem Chip verbleibenden Materials – Protein oder Lipid als Liposom oder undefinierte Membranstruktur – konnte von der Methode nicht erfaßt werden. Die vollständige Verdrängung von Liposomen bzw. Lipiden durch Sap direkt auf der Chipoberfläche ist allerdings unwahrscheinlich: während sich ein Chip nach der Immobilisierung von Liposomen und der anschließenden Injektion von Sap durch CHAPS und NaOH regenerieren ließ, waren für die Regeneration eines nur mit Sap beladenen Chips (Abb. 3-26, B) denaturierende Reagenzien notwendig (s.o.). Die üblichen Verfahren der Lipidanalytik (DC, MS) scheiterten an der Nachweisgrenze und der Konstruktionsweise des Biacoregerätes: weder die durchgeleiteten Meßlösungen noch die Substanzen auf dem Chip ließen sich vollständig zurückgewinnen, darüberhinaus ist die Größe der Meßzelle mit 0,02 µl sehr gering und damit auch die unter günstigeren Umständen gewinnbare Materialmenge. Der Einsatz von radioaktiv markierten Lipiden oder die alternative Untersuchung der Chipoberfläche mittels Mikroskopie waren leider nicht möglich.

Um Meßartefakte, z.B. durch die Strukturumwandlung der Liposomen auf der Chipoberfläche, auszuschließen, mußte das Prinzip der Lipidextraktion aus Liposomen durch rgSap-B mit einer unabhängigen Methode bewiesen werden. Dazu wurde die Situation auf der Oberfläche des Biacore-Chips nachgestellt, indem Liposomen an Octylsepharosematerial in einer kleinen Glassäule immobilisiert wurden. Die Liposomen enthielten radioaktiv markiertes [<sup>14</sup>C]-PC oder [<sup>14</sup>C]-Cholesterol, die durch die Zugabe von rgSap-B freigesetzt werden sollten, und deren Radioaktivität im Eluat der Säule detektierbar war (Abb. 3-28).

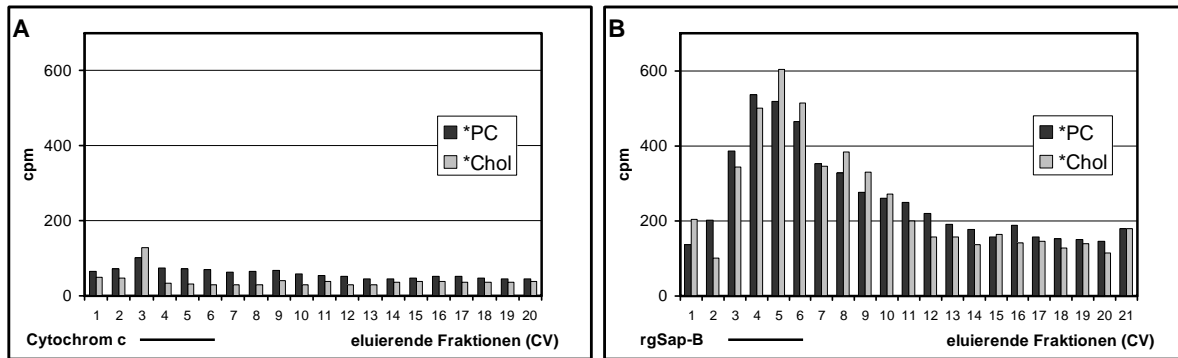
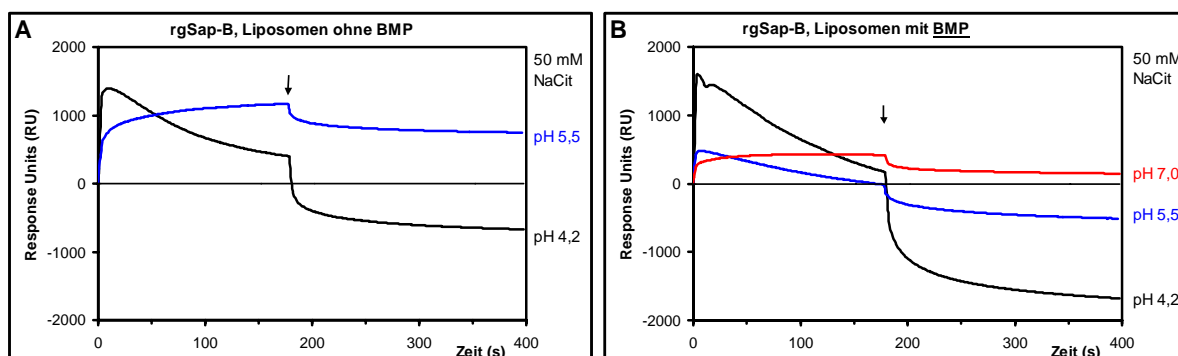


Abb. 3-28 rgSap-B mobilisiert radioaktiv markierte Membranlipide aus octylsepharose-gebundenen Liposomen. Die Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) wurden unter Verwendung von markierten Lipiden ( $[^{14}\text{C}]$ -PC oder  $[^{14}\text{C}]$ -Cholesterol) dargestellt und an Octylsepharose gebunden. Nach dem Auftrag von vier Säulenvolumen (CV) Cytochrom c (A) oder rgSap-B (B) ( $5\ \mu\text{M}$  in  $50\ \text{mM}$  NaCit,  $\text{pH}\ 4,2$ ) wurde die Säule mit reinem Puffer gewaschen. Die markierten (\*)Lipide wurden in den Elutionsfraktionen mittels Flüssigszintillationsmessung detektiert (angegeben in cpm, Zählpulse pro Minute). Die Abbildung zeigt repräsentative Daten aus zwei oder drei Messungen.

Cytochrom c setzte bei  $\text{pH}\ 4,2$  nur geringe Mengen des markierten Lipids aus den gebundenen Liposomen frei ( $<0,1\%$ ), wohingegen rgSap-B ca.  $1,1\%$  des gebundenen  $[^{14}\text{C}]$ -PC und ca.  $1,4\%$  des gebundenen  $[^{14}\text{C}]$ -Cholesterol aus den Liposomen mobilisierte (Abb. 3-28). Entsprechende Versuche mit Dodecylagarose statt Octylsepharose – der L1-Chip trägt - Alkylketten mit einer Länge von C8 bis C12 – bestätigten ebenfalls die Lipidmobilisierung durch Sap-B. Das Material hatte eine höhere Bindungskapazität für die Liposomen, allerdings war der Bruchteil an freigesetztem Lipid noch geringer als bei Octylsepharose.

***Ein niedriger pH-Wert fördert die Bindung von rgSap-B an Liposomen und ist für die Extraktion von Lipiden aus Liposomen notwendig.***

Die gewählten pH-Werte ( $\text{pH}\ 7,0/ 5,5/ 4,2$ ) spiegeln in etwa die sukzessive Azidifizierung des Endozytoseweges des Sap-Vorläufers vom Extrazellulärraum über das Endosomen zum Lysosom wieder. Mit sinkendem pH-Wert stieg für rgSap-B der Anteil, der an die Liposomen band. Die Fähigkeit von rgSapB, Lipide aus immobilisierten Liposomen zu extrahieren, stieg ebenfalls mit sinkendem pH-Wert (Abb. 3-29, A, B). Sie war bei  $\text{pH}\ 4,2$  optimal und verschwand bei  $\text{pH}\ 7,0$  ganz, wie weit sie bei  $5,5$  bereits eingeschränkt war, hängt von der Zusammensetzung, z.B. dem BMP-Gehalt (s.nächster Paragraph), der Liposomen ab.



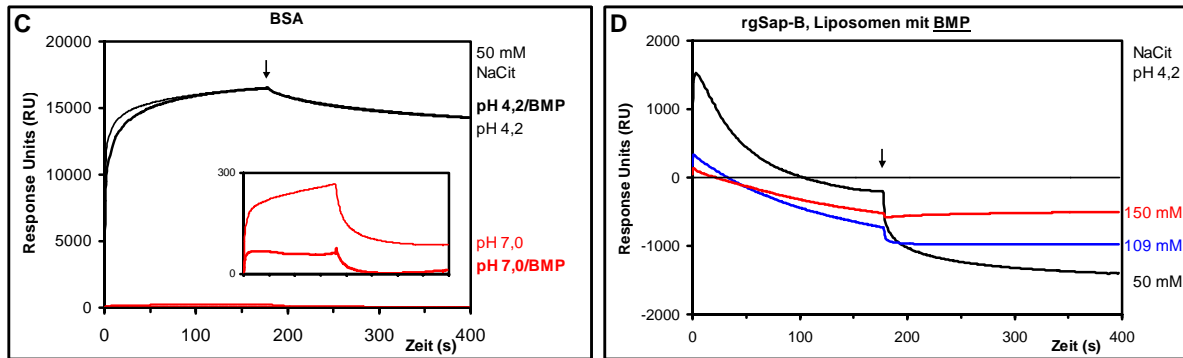


Abb. 3-29 Niedriger pH-Wert und niedrige Ionenstärke fördern die Lipidextraktionskapazität von rgSap-B. Nach der Immobilisierung von Liposomen mit BMP (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) oder ohne (PC/Chol, 75:25 mol%) auf dem L1-Chip, wurden rgSap-B (A, B, D) oder BSA (C), 5  $\mu$ M, in NaCit-Puffer von unterschiedlichem pH-Wert (A, B, C) oder unterschiedlicher Konzentration (D) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. Bei gleicher Liposomenart war sowohl die Anbindung von rgSap-B als auch die Lipidmobilisierung um so stärker, je niedriger der pH-Wert und die Ionenstärke waren. BMP als Bestandteil der Liposomen verstärkte diesen Effekt zusätzlich. BSA band im Neutralen kaum, im Sauren aber stärker als rgSap-B und wurde kaum vom BMP-Gehalt der Liposomen beeinflusst.

BSA wurde von der Zusammensetzung der Liposomen kaum beeinflusst, durch den pH-Wert dagegen deutlich (Abb. 3-29, C). Während BSA bei pH 4,2 sowohl an Phospholipidvesikel als auch die Chipoberfläche stark gebunden wurde, war die Bindung bei pH 7,0 an Vesikel kaum detektierbar. Diese Tatsache war zusätzlich ein Hinweis, daß die Bedeckung des L1-Chip mit Liposomen vollständig war, da BSA bei neutralem pH nach wie vor stark an die Dextranmatrix der Oberfläche binden kann, wenn diese zugänglich ist (Anderluh et al., 2005). Die Kapazität zur Lipidmobilisierung wurde darüberhinaus durch eine abnehmende Ionenstärke günstig beeinflusst (Abb. 3-29, D).

### ***BMP destabilisiert, Cholesterol stabilisiert die Liposomen gegenüber der Lipidmobilisierung durch rgSap-B.***

Die intralysosomalen Vesikel als Wirkort der Aktivatoren sind durch eine hohe Konzentration an BMP (Kobayashi et al., 1998, Möbius et al., 2003), dem „Markerlipid“ dieser Membranstrukturen, gekennzeichnet, während der Cholesterol-Gehalt sowohl dort als auch in der limitierenden Membranen gering ist. Deshalb wurde der Einfluß beider Substanzen in verschiedenen Kombinationen untersucht. Außerdem wurde BMP mit anderen anionischen Lipiden (PA) verglichen, sowie mit dem ebenfalls anionischen Sulfatid, einem der Substrate, dessen Abbau durch Arylsulfatase A von Sap-B stimuliert wird.

Weder die Liposomen-Assoziation noch die Dissoziation der Kontrollsubstanz BSA wurde durch diese Substanzen beeinflusst. Dagegen konnte rgSap-B die Liposomen am effektivsten unter lysosomalen Bedingungen, also hoher BMP-, niedriger Cholesterol-Konzentration, angreifen und, zumindest teilweise, solubilisieren (Abb. 3-30). Der Effekt von BMP und



Cholesterin auf die Bindung wurde in den Meßkurven dadurch nivelliert, daß sofort die Abschwemmung von Lipiden einsetzte. Die maximal erreichten Meßwerte stiegen von durchschnittlich 1400 RU bei Liposomen ohne BMP auf 1900 RU für solche mit 14 mol%, vermutlich förderte also BMP die Anbindung. Da bei pH 4,2 Sap-B positiv geladen vorliegt wirkten wahrscheinlich vorallem elektrostatische Kräfte. Der ungewöhnliche Verlauf der Kurve für Liposomen ohne BMP, mit 5 mol% Cholesterin (Abb. 3-30, A), könnte daher rühren, daß die Beladung des Chips so niedrig war, daß nach der Abschwemmung von soviel Lipid der Chip-Oberfläche frei wurde, daß rgSap-B dort und nicht nur an die Liposomen band, das Signal also wieder stieg.

Die maximale Lipidmobilisierung (unter den vermessenen Lipidzusammensetzungen) beobachtete man bei Liposomen mit 14 mol% BMP und 5 mol% Cholesterin. Wenn man den Materialverlust auf die Masse an ursprünglich gebundenem Lipid bezieht (und dabei den Anteil von gleichzeitig abgeschwemmtem Protein vernachlässigt), besaß rgSap-B die Kapazität, über 50% der Lipide abzuschwemmen.

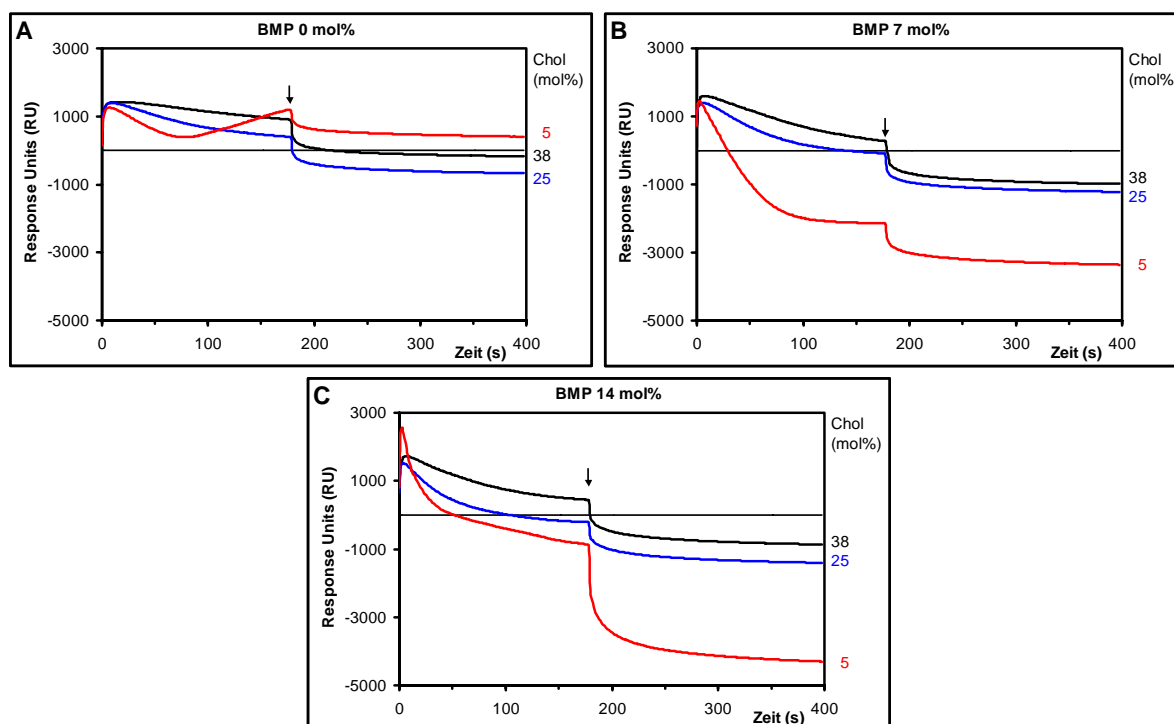


Abb. 3-30 Abb. Steigender BMP-Gehalt und sinkender Cholesterin-Gehalt der Liposomen destabilisieren sie gegenüber der Lipidextraktion durch rgSap-B. Nach der Immobilisierung von Liposomen auf dem L1-Chip, mit unterschiedlichem Gehalt an BMP und Chol, wie angegeben, und mit PC auf 100 mol% ergänzt, wurde rgSap-B ( $5 \mu\text{M}$  in  $50 \text{ mM NaCit}$ , pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von  $20 \mu\text{l/min}$  injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

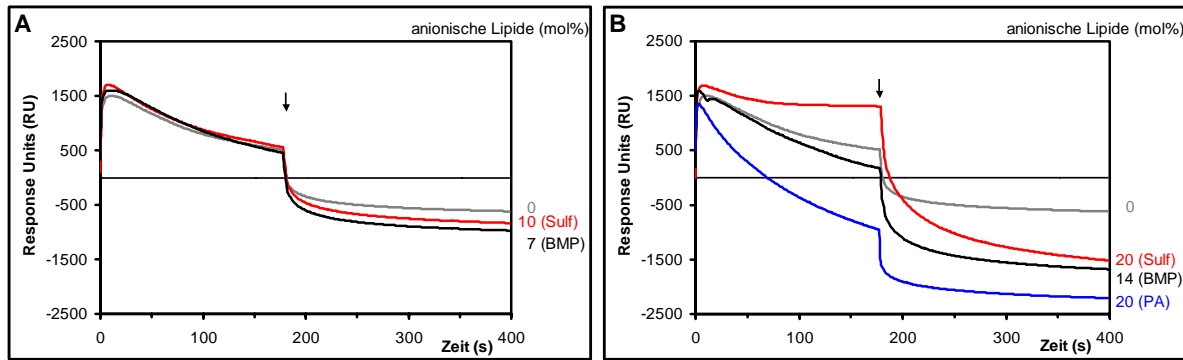


Abb. 3-31 Außer BMP destabilisieren auch Sulfatid und Phosphatidsäure die immobilisierten Liposomen gegenüber der Lipidextraktion durch rgSap-B. Nach der Immobilisierung auf dem L1-Chip von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an BMP, Sulfatid (Sulf), oder Phosphatidsäure (PA) wie angegeben, mit 25 mol% Chol und mit PC auf 100 mol% ergänzt, wurde rgSap-B (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. Bei niedriger Konzentration von BMP und Sulfatid verhielten sich beide annähernd gleich (A), verdoppelte man die Konzentration, waren beide Lipide weiterhin ähnlich effektiv in Bezug auf die Abschwemmung, allerdings schienen sulfatidhaltige Liposomen rgSap-B etwas besser zu binden. Phosphatidsäure stimulierte die Abschwemmung stärker als BMP oder Sulfatid (B).

Andere anionische Lipide als BMP führten ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Destabilisierung der Liposomen gegenüber rgSap-B, dabei war Phosphatidsäure etwas effektiver, während Sulfatid und BMP bezüglich der Abschwemmung nicht sehr unterschiedlich waren. Sulfatidhaltige Liposomen konnten jedoch etwas mehr rgSap-B binden (Abb. 3-31).

### ***Die Glykosylierung von Sap-B fördert die Destabilisierung von Liposomen.***

Die varianten Sap-B-Formen, rvSap-B N215Q, bzw. N215H (Pat) besaßen aufgrund der fehlenden Glykosylierungs-Konsensussequenz keine Glykanstrukturen. Im Vergleich zu rgSap-B banden sie deutlich mehr an die immobilisierten Liposomen, außerdem war die Bindung fester, da in der Dissoziationsphase das Signal nur bis auf ca.  $\frac{1}{3}$  des Maximums abfiel. Keine der Varianten schwemmte Lipide vom Chip (Abb. 3-32, A).

Der Vergleich mit ruSap-B war erst am Ende der Arbeit mit einem neuen Chip möglich (3.2), auf dem sich nur geringere Liposomenmengen immobilisieren ließen, was die Vergleichbarkeit der Messungen einschränkte. Zum Vergleich wurde mit PNGase F deglykosyliertes rSap-B (rdSap-B) eingesetzt. Durch die Reaktion wird Asparagin in Aspartat umgewandelt (N215D), und das Protein erhielt eine zusätzliche negative Ladung. Die Probe war im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel homogen. Die unter Standardbedingungen gemessene Kurve (Abb. 3-32) glich in der gebundenen Menge den varianten Saps, fiel dann aber doch unter die Nulllinie ab. Ähnlich verhielt sich eine ca. 1:1-Mischung aus ruSap-B und rgSap-B (nach Aufreinigung über Kationentauscher- und NiNTA-Chromatographie). Die Sap-B-Varianten banden besser an BMP-haltige Liposomen (Abb. 3-32). Die Unterschiede zwischen

der pathogenen (N215H) und der künstlichen (N215Q) Variante waren gering, obwohl die künstliche Variante einen leichten Abfall des Signals in der Assoziationsphase zeigte.

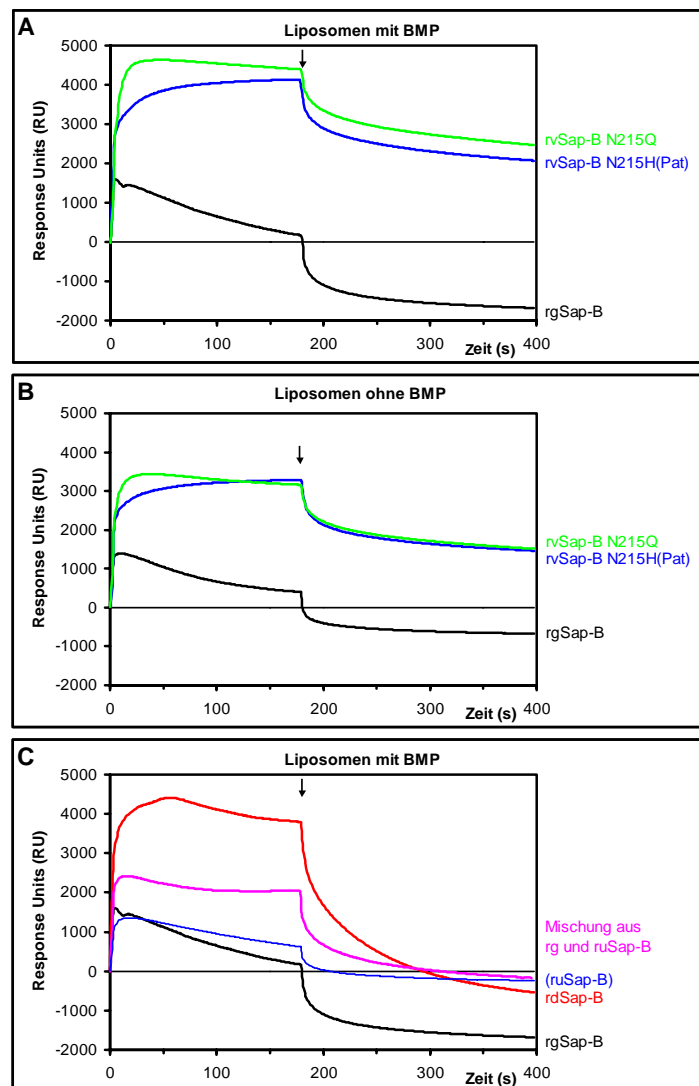


Abb. 3-32 Glykosyliertes Sap-B ist effizienter in der Lage, Lipide aus immobilisierten Liposomen zu lösen als variantes, de- oder unglykosyliertes Sap-B. Nach der Immobilisierung auf dem L1-Chip von A, C: Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) oder B: (PC/Chol, 75:25 mol%), wurden die verschiedenen rSap-B-Proben (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

Der Vergleich der unterschiedlich gereinigten Präparate zeigte den entscheidenden Einfluß, den die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln auf das Verhalten der Proben zumindest bei der Untersuchung mit SPR hatte. Die Eigenschaften von glykosyliertem und unglykosyliertem rSap-B waren nach der Reversed-Phase-Chromatographie vertauscht (Abb. 3-33).

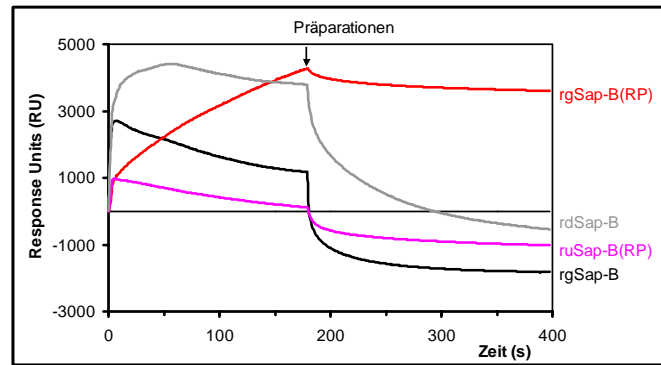


Abb. 3-33 Die Reinigung über Reversed-Phase-Chromatographie (RP) verändert das Verhalten der Proben vollständig. Nach der Immobilisierung auf dem L1-Chip von Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%), wurden die verschiedenen rSap-B-Proben (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

### *Arylsulfatase A bindet ebenfalls bevorzugt an anionische Liposomen und fördert die Anbindung von rgSap-B.*

Rekombinante Arylsulfatase A (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Gieselmann, Universität Bonn) interagiert ebenfalls mit immobilisierten Liposomen. BMP förderte dabei die Bindung, aber Sulfatid war wesentlich effizienter (600 zu 250 RU). Gebundenes Enzym verstärkte die Bindung von rgSap-B, ohne allerdings die Abschwemmung zu beeinflussen.

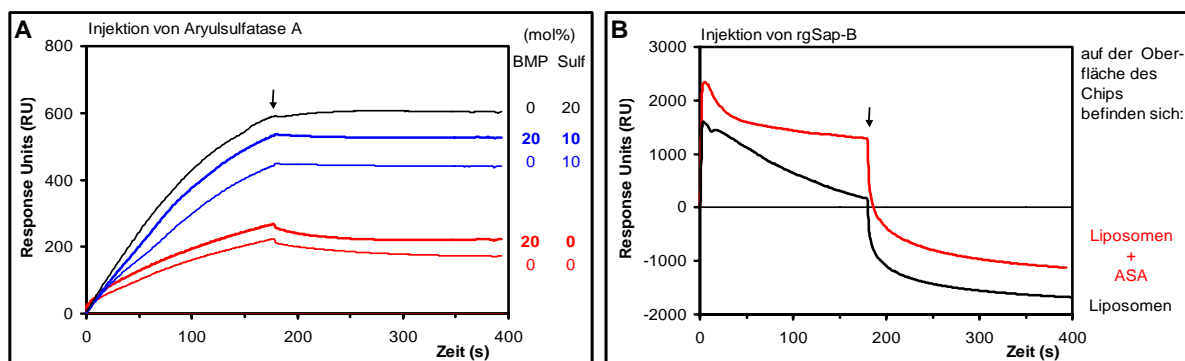


Abb. 3-34 Arylsulfatase A (ASA) bindet an immobilisierte Liposomen und fördert die Anbindung von rgSap-B. A: Nach der Immobilisierung auf dem L1-Chip von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an anionischen Lipiden wie angegeben, mit 20 mol% Chol und mit PC auf 100 mol% ergänzt, wurde ASA (100 nM in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. B: rgSap-B (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) wurde unter den üblichen Bedingungen in eine Zelle mit immobilisierten Standard-Liposomen injiziert (Liposomen) oder in die Zelle aus A, die Standard-Liposomen mit gebundener ASA enthielt.

### 3.5.2.4 Sap-D

#### *ruSap-D zeigt kaum Lipid-Mobilisierung.*

Im Unterschied zu Sap-B unterschritt die Meßkurve von ruSap-D unter Standardbedingungen die Nulllinie nicht, obwohl bei höheren Konzentrationen (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M) das Signal in der Assoziationsphase leicht absinkt (Abb. 3-35). Die Bindung von ruSap-B an die Liposomen ist konzentrationsabhängig und ca. fünf mal höher als bei rgSap-B (Abb. 3-27).

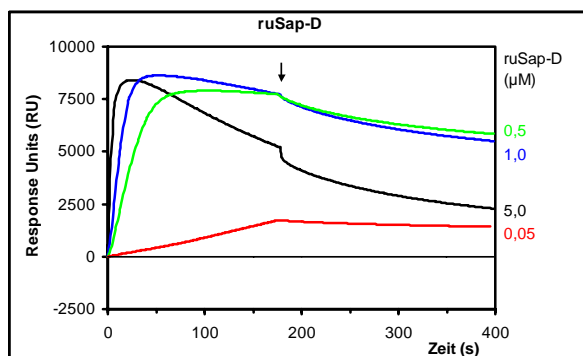


Abb. 3-35 Konzentrationsabhängigkeit. Nach der Immobilisierung von Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%) auf dem L1-Chip, wurde ruSap-D in den angegebenen Konzentrationen (in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20 µl/min injiziert, danach (↓) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

**Die Bindung von ruSap-D an Liposomen wird durch einen niedrigen pH-Wert und anionische Lipide gefördert, durch Cholesterol dagegen vermindert.**

Der Einfluß verschiedener Parameter auf die Assoziation von ruSap-D an Liposomen konnte durch das nur langsame Abfallen der Meßkurve in dieser Phase genauer bestimmt werden als bei rgSap-B. Bei einem lysosomalem pH-Wert von 4,2 band ruSap-D am besten, schon bei pH 5,5 sank der maximale RU-Wert auf ca.  $1/10$  ab, während bei pH 7,0 die Nulllinie kaum überschritten wurde (Abb. 3-36).

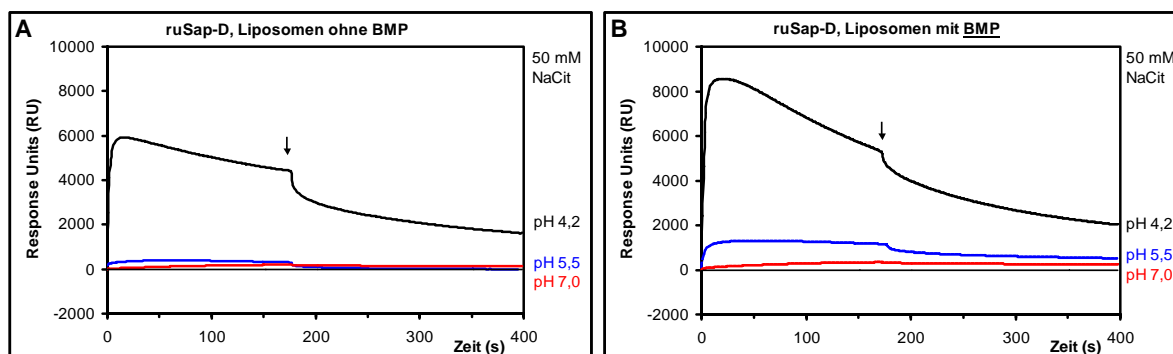


Abb. 3-36 Niedriger pH-Wert fördert die Assoziation von ruSap-D an Liposomen. Nach der Immobilisierung von Liposomen ohne (PC/Chol, 75:25 mol%, A) oder mit BMP (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%, B) auf dem L1-Chip, wurden ruSap-D, 5 µM, in NaCit-Puffer von unterschiedlichem pH-Wert für 180 s mit einer Flußrate von 20 µl/min injiziert, danach (↓) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

BMP förderte die Bindung, während sie von Cholesterol abgeschwächt wurde. Nur in einem Fall, bei Liposomen ohne Cholesterol aber mit einer hohen BMP-Konzentration, wurde die Nulllinie unterschritten, also Lipide mobilisiert, sonst beeinflussten diese Komponenten lediglich die Geschwindigkeit, mit der das Signal in der Assoziationsphase abfiel (Abb. 3-37, A-C).

BMP und PA wirkten ähnlich, Ceramid beeinflusste das Verhalten von ruSap-D kaum (Abb. 3-37, D).

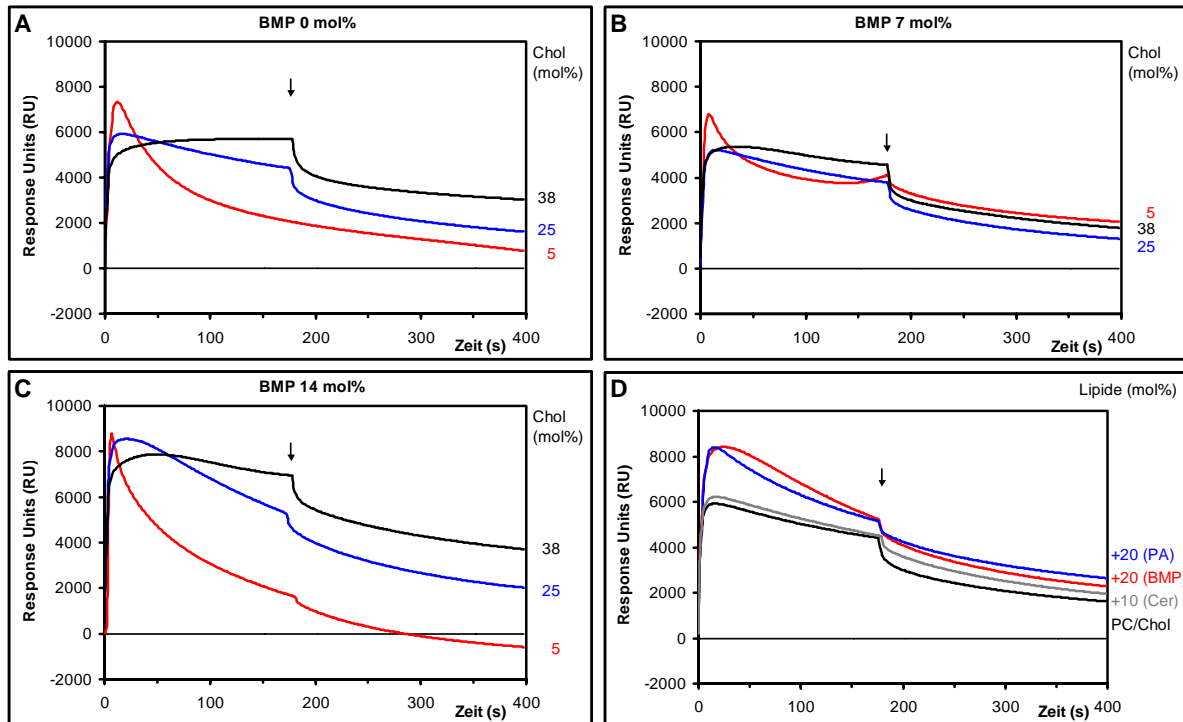


Abb. 3-37 Steigender Gehalt an anionischen Lipiden und Ceramid so wie ein sinkender Cholesterolgehalt der Liposomen fördern die Anbindung von ruSap-D. Nur aus stark destabilisierten Liposomen kann auch ruSap-D Lipide extrahieren (C). Nach der Immobilisierung von Liposomen auf dem L1-Chip, mit unterschiedlichem Gehalt an BMP und Chol (A, B, C) oder mit 20 mol% Chol und den angegebenen Lipiden (D), und mit PC auf 100 mol% ergänzt, wurde ruSap-D ( $5 \mu\text{M}$  in  $50 \text{ mM NaCit}$ ,  $\text{pH } 4,2$ ) für 180 s mit einer Flußrate von  $20 \mu\text{l/min}$  injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

**Das Variante ruSap-D K8E verhält sich ähnlich wie ruSap-D, die Liposomen-Assoziation von ruSap-D R15E ist fast unabhängig von der Liposomenzusammensetzung.**

ruSap-D K8E verhielt sich sehr ähnlich zu ruSap-D, die Bindung war nur etwas geringer und langsamer, die Lipidmobilisierung war auch mit destabilisierten - also cholesterolarmen und BMP-haltigen - Liposomen uneffizient (Abb. 3-38). ruSap-D R15E verhielt sich eher wie die Kontrollsubstanzen BSA oder Cytochrom c, da es nur pH-abhängig an die Liposomen assoziierte oder - bei  $\text{pH } 7,0$  - nicht assoziierte. Selbst das leichte Abfallen des Meßsignals, dessen Ausmaß und Geschwindigkeit bei allen anderen Saps von BMP positiv, von Cholesteroll negativ beeinflusst wurden, fand bei dieser Variante nicht statt (Abb. 3-38).

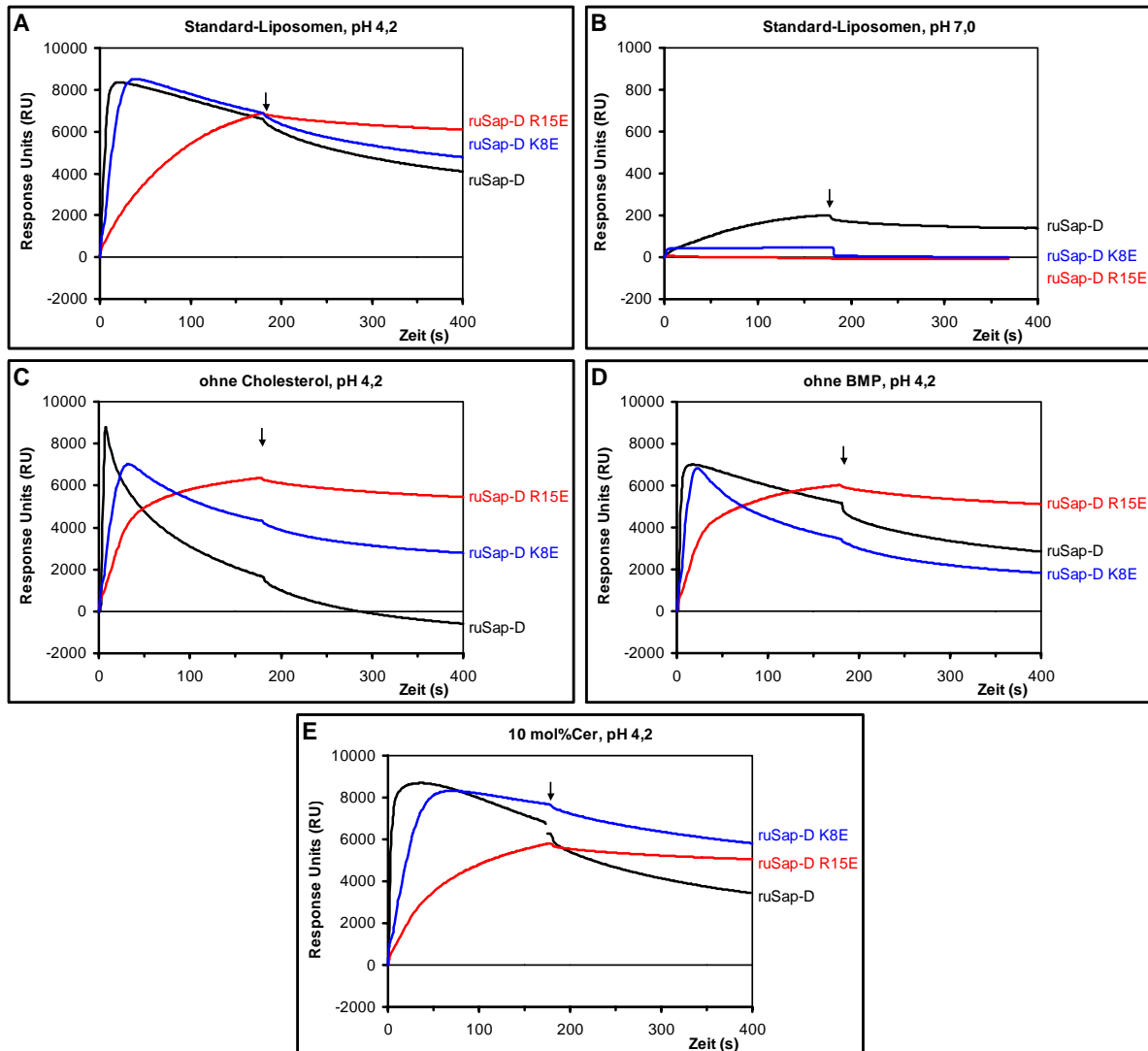


Abb. 3-38 Vergleich von ruSap-D und den varianten Formen ruSap-D R15E und ruSap-D K6E unter verschiedenen Bedingungen, A: Standard-Liposomen (PC/Chol/BMP, 61:25:14 mol%), pH 4,2; B: Standard-Liposomen, pH 7,0; C: Liposomen ohne Cholesterol (PC/BMP, 86:14 mol%), pH 4,2; D: Liposomen ohne BMP (PC/Chol, 75:25 mol%), pH 4,2; E: Liposomen mit Ceramid (PC/Chol/BMP/Cer, 51:25:14:10 mol%). Nach der Immobilisierung von Liposomen auf dem L1-Chip, wurden die verschiedenen Sap-D-Varianten (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet.

***Saure Ceramidase bindet stark an immobilisierte Liposomen, die BMP enthalten, und destabilisiert sie gegenüber ruSap-D.***

Die saure Ceramidase band bevorzugt an BMP-haltige immobilisierte Liposomen und zeigte keine Präferenz für Ceramid (Abb. 3-39, A). Es band durchschnittlich dreimal mehr Ceramidase als Arylsulfatase. Wurde ruSap-D über einen Chip injiziert, an dessen immobilisierten Liposomen bereits Ceramidase gebunden war, konnte ruSap-D ähnlich effektiv wie rgSap-B Lipide mobilisieren und vom Chip schwemmen (Abb. 3-39, B).

## Ergebnisse

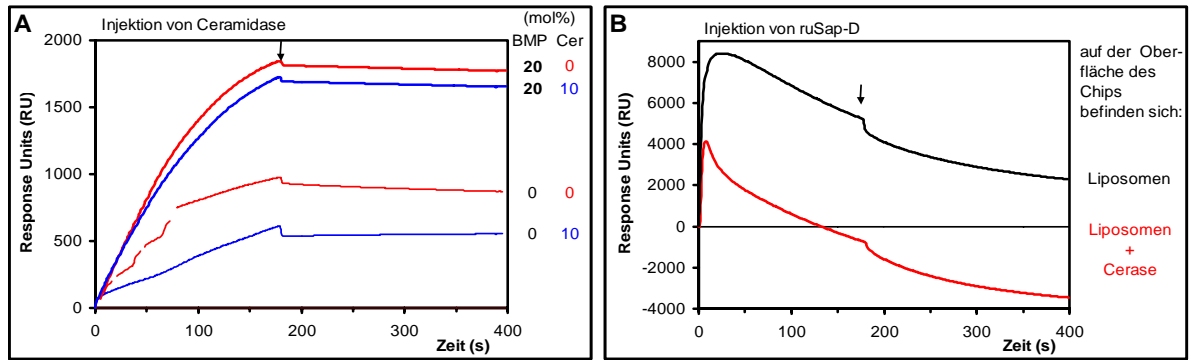


Abb. 3-39 Saure Ceramidase (Cerase) bindet an immobilisierte Liposomen und destabilisiert die Liposomen gegenüber ruSap-D. A: Nach der Immobilisierung auf dem L1-Chip von Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an BMP und Ceramid (Cer) wie angegeben, mit 20 mol% Chol und mit PC auf 100 mol% ergänzt, wurde Cerase (100 nM in 50 mM NaCit, pH 4,2) für 180 s mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min injiziert, danach ( $\downarrow$ ) wurde reiner Puffer mit der gleichen Flußrate für 220 s über den Chip geleitet. B: ruSap-D (5  $\mu$ M in 50 mM NaCit, pH 4,2) wurde unter den üblichen Bedingungen in eine Zelle mit immobilisierten Standard-Liposomen injiziert (Liposomen) oder in die Zelle aus A, die Standard-Liposomen mit gebundener Ceramidase enthielt (A, oberste rote Kurve).



## 4 Diskussion

### 4.1 Expression und Reinigung

Die heterologe Expression in der Hefe *P.pastoris* ist eine geeignete Methode für die Darstellung von funktionellem Sap-B und Sap-D im Maßstab von einigen mg/l im Schüttelkolben und bis zur 10fachen Menge im Bioreaktor. Ungefähr die Hälfte des Sap-B ist glykosyliert. Die Sekretion des relativ sauberen, rekombinanten Proteins in den Überstand erlaubt eine effektive Reinigung in wenigen Schritten. Da nur jeweils ein humanes Sap exprimiert wird, können Kreuzkontaminationen mit seinen Homologen ausgeschlossen werden.

Hinweise auf hefeeigene Saps gibt es bisher nicht: die charakteristischen, komplexen Sphingolipide der Hefen, Inositolphosphorylceramid und dessen mannosehaltigen Derivate, werden durch eine membranständige Inositol-Phosphosphingolipid-Phospholipase C abgebaut (Sims et al., 2004); diese interagiert zwar mit mehreren Proteinen, von denen aber keines Aktivatoreigenschaften zu besitzen scheint (Ito et al., 2001). Kaum eines der wenigen Hefepoteine, das anhand seiner Sequenz als saposinähnlichen eingestuft werden kann, wurde bisher charakterisiert (Struktur-Datenbank des European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI-InterPro, [www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)).

Die meisten der in bisherigen Untersuchungen eingesetzten Saps wurden aus unterschiedlichen humanen oder tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten aufgereinigt (Fischer und Jatzkewitz, 1975, Fluharty et al., 1999, Morimoto et al., 1988), synthetisiert (Weiler et al., 1993) oder rekombinant in *E.coli* (Whitelegge et al., 2003) dargestellt. Bei den aufgereinigten Präparaten ist trotz aller Sorgfalt bei der Darstellung eine Verunreinigung der Saps untereinander nicht ausgeschlossen, sondern eher wahrscheinlich, da sie aufgrund ihrer Homologie fast identische physikochemische Eigenschaften besitzen. Auch genaue Analytik (MALDI-MS, Elektrophorese und Anfärbung, etc.) kann nur die Hauptkomponenten der Mischung detektieren, während sich Mengen von einigen Prozent unterhalb der Nachweisgrenze der genannten Methoden befinden. Da ein Sap potentiell von drei anderen begleitet werden kann, summieren sich diese Effekte.

Ein üblicher Schritt bei der Aufreinigung aus Gewebe ist die Trennung der einzelnen Saps voneinander durch Reversed-Phase-Chromatographie, gefolgt von der Gefriertrocknung der Proben zur Abtrennung des Laufmittels. Nach der Behandlung mit organischen Lösungsmitteln (Acetonitril, Isopropanol) sind die Saps weiterhin aktiv, z.B. im liposomalen

Assays. Allerdings sinkt, wie wir beobachtet haben, ihre Löslichkeit, und die nicht-kovalente Assoziation von Sap-B wird zumindest zeitweise aufgehoben: nur über Reversed-Phase-Chromatographie gelang die effiziente Trennung der Glykoformen, die nach der Fermentation als gemischte Dimere (und Oligomere in hochkonzentrierten Lösungen) vorlagen. Möglicherweise war dabei der Eingriff in die Struktur gravierend, so daß es zur Denaturierung eines Teils der Probe kam.

Bei der Kristallisation von Sap-B (Ahn et al., 2003) wurden neben reinem Protein auch Sap-B-Dimere mit gebundenem Phospholipid (Phosphatidylethanolamin mit unterschiedlichen Kettenlängen) gefunden. Die dünnschichtchromatographische Analyse einer hochkonzentrierten Lösung zeigte in unserem Sap-B-Präparat ebenfalls mitaufgereinigte Lipide (die hefespezifisch sein müssen und deshalb bisher nicht identifiziert wurden; persönliche Mitteilung von Michaela Wendeler). Die beobachtete Co-Aufreinigung und Co-Kristallisation läßt vermuten, daß sich Sap-B nicht nur über die Dimerenbildung, sondern auch über Lipidassoziation stabilisiert, wenn auch nicht in dem Maße wie integrale Membranproteine. Durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln werden die Präparationen demnach unkontrolliert delipidiert. Diese unphysiologischen Veränderungen scheinen die Resultate von *in vitro*-Assays normalerweise nur wenig zu beeinflussen, da in den Versuchsansätzen genügend Lipide zur Verfügung stehen, um den Verlust auszugleichen. Erst bei Echtzeitmessungen mit der SPR-Methode (s.Abb. 3-33) zeigten sich präparationsbedingte Unterschiede im Verhalten gegenüber Membranen.

Beide Probleme, gegenseitige Kontamination und Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, lassen sich mit der rekombinanten Expression der Saps umgehen. Dabei ist ein prokaryontisches Expressionssystem wie *E.coli* nur eingeschränkt geeignet, da die korrekte Faltung und die Ausbildung von Disulfidbrücken oft problematisch sind. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, daß die in *E.coli* dargestellten Präparate schlecht löslich sind (Henseler, 1993, Hermann, 1997, Rimmel, 1996). Außerdem kann *E.coli* keine komplexen, posttranslationalen Modifikationen ausführen. Daß aber gerade die Glykosylierung wichtig für die Funktion zumindest von Sap-B ist, zeigt ein MLD-Patient (Wrobe et al., 2000), dessen Phänotyp und früher Tod im Alter von ca. 6 Jahren auf dem Verlust der Glykosylierungssequenz (N215H) in einem ansonsten stabilen, normal konzentrierten und lokalisierten Sap-B zurückzuführen ist. Die Sulfatid-Speicherung in den Zellen des Patienten konnte durch Fütterung des glykosylierten Vorläufers aufgehoben werden, der unglykosylierte Vorläufer zeigte dabei kaum Aktivität (Wrobe et al., 2000). Dieser Befund

läßt sich nicht mit den Untersuchungen vereinbaren, die zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem Sap-B keine Unterschiede feststellen können (Whitelegge et al., 2003).

Für die Darstellung glykosylierter Saps bieten sich also eukaryontische Expressionssysteme an. So gelang die Darstellung von GM2AP (Wendeler et al., 2003), einiger Saps (Nettersheim, 2001) und pSap (Locatelli-Hoops, 2006) mit baculovirus-transfizierten Insektenzellen. In *P.pastoris* konnten bereits GM2AP (Wendeler et al., 2004b) und Sap-A (Locatelli-Hoops et al., 2006, Yamada et al., 2004) erfolgreich exprimiert werden, dieses System ist darüberhinaus einfach in der Handhabung und in der Vergrößerung des Ansatzes.

Die Fähigkeit, die Glykosylierungsstelle effizient zu nutzen, variiert bei *P.pastoris* mit dem exprimierten Protein (Cereghino und Cregg, 2000), was sich sogar bei den homologen Saps bestätigte: Während Sap-A zweimal unabhängig voneinander als Mischung von zuckerhaltigen und -freien Formen exprimiert werden konnte (Locatelli-Hoops et al., 2006, Yamada et al., 2004), sind Sap-C (Klingenstein, 2002) und Sap-D (diese Arbeit und persönliche Mitteilung von Maksim Rossocha) gar nicht oder nur in Spuren glykosyliert, Sap-B dagegen ähnlich stark wie Sap-A. Das Gleichgewicht zwischen glykosylierten und unglykosylierten Sap-B-Formen ließ sich nur in geringem Maße durch die Variation von Expressionparametern wie Puffer und Temperatur verändern. Außerdem waren die Ergebnisse der Schüttelkolben-Expression schlecht reproduzierbar, da die Methanolzufuhr nicht kontinuierlich erfolgte und der Sauerstoffgehalt des Mediums weder gemessen noch reguliert werden konnte. Dadurch variierte die Zelldichte und die Versorgung mit Nährstoffen war unregelmäßig.

Im Fermenter dagegen lassen sich die Wachstumsbedingungen kontrollieren. Dort nahm das Verhältnis von endogenen Hefeproteinen zu Sap-B ab, gleichzeitig verschlechterte sich aber das Verhältnis von gewünschtem glykosylierten Protein zu unglykosyliertem mit fortschreitender Induktionsdauer. Anscheinend überfordert die hohe Expressionsrate den Prozessierungsapparat der Hefen, während die hohe Konzentration an Sap-B im Überstand zur Aggregatbildung führt, die wiederum die Aufreinigung erschwert. Es könnte also sinnvoll sein, durch geringere Zelldichte und eine langsamere Methanolzufuhr die Expressionsrate zu senken. Außerdem könnte mit Mut<sup>S</sup>(*methanol utilization slow*)-Hefeklonen, die durch ihre eingeschränkte Fähigkeit zur Methanolverarbeitung langsamer wachsen, oder durch die Wahl von Klonen mit geringerer Kopienzahl der Expressionskassette (s. 3.1.1) ein Kompromiß zwischen Gesamtausbeute und Ausbeute an glykosyliertem Sap-B erreicht werden.

Die Trennung glykosylierter und unglykosylierter Formen gestaltete sich bei dimerem Sap-B schwieriger als bei den anderen Saps, die monomer vorliegen. Vor kurzem gelang in der

Abteilung - leider erst nach den Messungen dieser Arbeit - die Präparation von ruSap-B aus einer Schüttelkolbenexpressionen über Concanavalin A-Material - ohne Reversed-Phase-Chromatographie - (S. Locatelli-Hoops, persönliche Mitteilung), ähnlich der Trennung von glykosyliertem und unglykosyliertem Sap-A (Locatelli-Hoops, 2006). So lassen sich eventuell auch die hohen Expressionsraten im Fermenter in bessere Ausbeuten an getrennten Formen umsetzen. Allerdings war nicht klar wodurch sich das „neue“ Con-A-Material von den vorher eingesetzten Chargen unterschied. Con-A, das nach wie vor aus der Matrix ausblutet und unter SPR-Standardversuchsbedingungen an immobilisierte Liposomen bindet, muß sorgfältig entfernt werden; alternativ dazu bietet sich der Einsatz von quervernetztem Con-A-Material an (Miernyk und Johnston, 2006).

Das N-Glykosylierungsmuster von Sap-B entspricht dem für *P.pastoris* erwarteten mannosereichen Typ (Montesino et al., 1998). Dabei sind ca. 7 bis 16, hauptsächlich aber 12 Mannosereste über zwei N-Acetylglucosamine an das Asparagin der Glykosylierungskonsensus-Sequenz (Asn-Xaa-Ser/Thr) verknüpft. Dagegen sind die Glykanstrukturen von Sap-B, das aus humaner Leber oder Urin aufgereinigt wurde (Faull et al., 2000, Yamashita et al., 1990) vom komplexen Typ, häufig mit fucosylierter Kernstruktur, die durch lysosomale Enzyme allerdings auf 1-6 Zuckerreste verkürzt werden, wenn keine Defizienz vorliegt. Die anderen Saps besitzen jeweils unterschiedliche, heterogene Oligosaccharidstrukturen (Ito et al., 1993). Obwohl also die Glykosylierung von rgSap-B aus *P.pastoris* und nativem, aus Gewebe aufgereinigtem Sap-B nicht identisch ist, ist die Anzahl der Hexosen ähnlich und Platzbedarf, Abschirmung von bestimmten Bereichen der Proteinoberfläche oder Einfluß auf die Löslichkeit sollten vergleichbar sein. Es ist bisher unbekannt, wie und zu welchem Zweck die Saps unterschiedlich glykosyliert werden, und ob die Glykosylierung nicht nur für Sap-B und -A, sondern auch für Sap-C und -D die gleiche Relevanz besitzt.

Bei der Expression von Sap-D traten in der Fermenter-Expression starke Banden zwischen 13 und 23 kDa auf, die bei der Schüttelkolben-Expression nur gelegentlich und schwach nachweisbar waren (Abb. 3-5 und Abb. 3-7). Bei der Aufreinigung ließen sie sich mit der Gelfiltration abtrennen, immunochemisch waren sie schwach detektierbar, durch PNGase wurden sie nicht verändert und im MALDI-MS waren sie auch nicht meßbar: wahrscheinlich handelt es sich also nicht um glykosyliertes Sap-D, sondern um während der Expression aggregiertes, unglykosyliertes Sap-D. Ein Teil davon scheint denaturiert zu sein, da er sich selbst durch SDS und Reduktion während der Elektrophorese nicht auftrennen ließ. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, daß sich unter den Banden zwischen 13 und 23 kDa auch einige Prozent an glykosyliertem Sap-D verbergen: auch hier sollte mit anderen Klonen,

Hefestämmen und Expressionsmethoden experimentiert werden, um rgSap-D zu erhalten. Für Strukturuntersuchungen ist unglykosyliertes Sap-D dagegen besser geeignet, da die Inhomogenität des Zuckerbaums wegfällt, und die Proben besser kristallisieren. Zusammen mit unseren Kooperationspartnern Tim Maier und Maksim Rossocha (AG Prof. Wolfram Saenger, Freie Universität Berlin) gelang es, mittels Röntgenstrukturanalyse an ersten Kristallen zu zeigen, daß Sap-D als Monomer mit typischer SAPLIP-Struktur vorliegt, ähnlich wie Sap-A und -C.

Alle dargestellten Sap-Präparate besaßen C-terminal ein Histidinepitop, um die Aufreinigung von ausschließlich vollständig translatierten Proteinen (durch Affinitätschromatographie mit NiNTA) zu ermöglichen. Es stellte sich aber heraus, daß der Histidin-Tag selbst teilweise abgebaut wurde (Sap-D, Abb. 3-13; Sap-C, s. Klingenstein, 2002). Da der Aufreinigungsschritt über NiNTA nicht unbedingt notwendig ist, wäre in Zukunft auch die Expression ohne zusätzliches Epitop möglich. Die enzymatische Abspaltung der Histidinreste, z.B. durch Carboxypeptidase A, hätte zu einem relativ hohen Verbrauch des entsprechenden Enzyms und zu weiteren Aufreinigungsschritten geführt (Nettersheim, 2001). Die zusätzlichen Aminosäuren verschieben den (berechneten) isoelektrischen Punkt der Saps zu höheren pH-Werten ( $pI(\text{rSap-B}) = 4,7-4,9$ ;  $pI(\text{Wildtyp-Sap-B}) = 4,4$ ;  $pI(\text{Sap-D}) = 5,4-5,8$ ;  $pI(\text{Wildtyp-Sap-D}) = 4,6$ ), beim pH-Wert 4,2 der meisten Messungen lagen sie also positiv geladen vor; zum Vergleich: der pI des Kontrollproteins BSA liegt bei 5,6 (Swiss-Prot-Datenbank, [expasy.org/sprot/](http://expasy.org/sprot/)). In der Kristallstruktur (Abb. 2-6) sind die Aminosäuren 269-273 (Zählung s.7.2, sie entsprechen den Aminosäuren 72 bis 76 des nativen Sap-B) auf der letzten C-terminalen Helix entscheidend am Kontakt der beiden Dimeruntereinheiten beteiligt und werden durch die von Cys268 und Cys273 ausgehenden Disulfidbrücken in ihrer Position fixiert. Die letzten, C-terminalen Reste sind aber flexibel und liegen darüberhinaus weit von der Lipid-Bindungstasche entfernt (Ahn et al., 2003). Das Epitop selbst störte die Funktionalität der Saps weder *in vitro* noch bei Fütterungsstudien (3.4.1 und 3.4.1); auch bei SPR-Messungen verhielten sich Formen mit und ohne Epitop gleich (Locatelli-Hoops, 2006).

### 4.2 Funktionsstudien und biophysikalische Charakterisierung

Mit DLS, SPR und den eingesetzten *in vitro* und *in vivo* Assays konnten unterschiedliche Aspekte der Funktionsweise von Sap-B und Sap-D an der Grenzfläche zwischen Membran und wäßriger Phase untersucht werden, wobei die Fähigkeit zur Membranbindung, Lipidmobilisierung und Stimulierung der Abbaureaktion nicht unbedingt miteinander korrelierten.

Durch Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, daß die rekombinanten Saps einzeln und nicht nur als Domänen des Vorläufers internalisiert wurden und die Lysosomen der Zelle erreichten (Sadeghlar et al., 2003). Für die einzelnen Saps wie auch den Vorläufer war dazu keine Glykosylierung notwendig (Wrobe et al., 2000). Im Lysosom konnte ein Teil der rekombinanten Sap-B-Präparate die Defizienz endogener Saps aufheben und war ähnlich aktiv wie aus Gewebe aufgereinigtes, humanes Sap-B (Abb. 3-15). Die verschiedenen Sap-B- und -D-Präparate wurden *in vitro* mittels mizellarer und liposomaler Modellsysteme (zu den Modellsystemen: Linke et al., 2001b, Werth et al., 2001, Wilkening et al., 1998, Wilkening et al., 2000) auf einfache Weise quantitativ verglichen, so daß der Einfluß von Aufreinigung, Glykosylierung oder der Veränderung der Aminosäuresequenz auf die Fähigkeit zur Stimulierung des Lipidabbaus deutlich wurde.

Für die Untersuchungen mit DLS und SPR wurde dieser Prozeß noch weiter vereinfacht, indem nicht mehr die ganze Reaktion und die mögliche Interaktion von Sap und lysosomalem Enzym, sondern nur noch die Interaktion von Sap und Membran betrachtet wurde. Während die Dynamische Lichtstreuung in Verbindung mit Mikroskopie in der Lage war, Größen- und Strukturänderungen der Liposomen zu charakterisieren, konnten mit der Oberflächenplasmonresonanz Faktoren untersucht werden, die für die Membranbindung der Saps relevant sind. Dabei zeigte sich, daß neben Assoziation und Dissoziation ein weiteres, von uns als „Lipid-Abschwemmung“ bezeichnetes Phänomen auftrat, das bereits bei lytischen Peptiden (Chen et al., 2001) und für Sap-A beschrieben wurde (Locatelli-Hoops et al., 2006), nämlich die Mobilisierung von Lipiden aus immobilisierten Liposomen. Dabei zeigte sich, daß glykosyliertes Sap-B Lipide deutlich besser in Lösung brachte als die unglykosylierten Formen, ein Befund mit physiologischer Relevanz, da unglykosyliertes, variantes Sap-B bei Patienten zur Blockade des Sulfatidabbaus und den Symptomen einer Metachromatischen Leukodystrophie führt (Wrobe et al., 2000).

### 4.2.1 Sap-B

#### 4.2.1.1 Funktionalität

*In vitro* gelang die Stimulierung des Sulfatidabbaus durch Arylsulfatase A durch alle untersuchten Sap-B-Präparationen. Die rekombinanten Präparate erreichten dabei nicht den Umsatz des aus Gewebe dargestellten Sap-B (hgSap-B, aufgereinigt über Reversed-Phase-Chromatographie): Als mögliche Ursache wurden bereits früher die zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren vermutet (Nettersheim, 2001), ein Teil der rekombinanten Probe könnte darüberhinaus auch fehlgefaltet oder denaturiert vorliegen. Die Aufreinigung (mit oder

ohne Reversed-Phase-Chromatographie) spielte nur eine untergeordnete Rolle für die Funktionalität, wohl aber die Glykosylierung.

Im mizellaren Assay (Abb. 3-14, A) wurde von den glykosylierten Saps nur 8-16%, von den unglykosylierten dagegen 42-48% des angebotenen Sulfatids abgebaut. Möglicherweise ist es für die unglykosylierten Proteine einfacher, Lipide aus den Mizellen zu lösen oder der ruSap-B-Sulfatidkomplex ist für das Enzym ein besseres Substrat.

Beim liposomalen Assay (Abb. 3-14, B) sank der Reaktionsumsatz auf 10-20% des mizellaren ab, da das Sulfatid in der Membran verankert vorlag. Vorteile bezüglich Membranbindung oder -perturbation, die im mizellaren System naturgemäß keine Rolle spielen, sollten deutlich werden, trotzdem waren die unglykosylierten Saps unter den Versuchsbedingungen immer noch aktiver, obwohl sich beide Glykoformen annäherten.

Unter physiologischen Bedingungen, also in Zellkultur, wurde dann nur noch bei den glykosylierten Formen das Abbauprodukt Galaktosylceramid detektiert (Abb. 3-15). Bei früheren Versuchen zeigte unglykosyliertes Sap-B noch eine geringfügige Aktivität (Wrobe et al., 2000). Die Unterschiede zwischen der zuckerhaltigen und -freien Form sind also nicht absolut, sondern graduell, und es hängt von der Durchführung der Komplementierungsstudie ab, ob die Effekte eventuell nivelliert werden. Abweichende Ergebnisse, z.B. von Whitelegge (2003), ließen sich so erklären. Darüberhinaus wurde die Menge an Aktivator, die tatsächlich die Lysosomen der Zelle erreicht, bisher nicht quantifiziert; auch darin könnten sich die verschiedenen Sap-B-Präparate, Varianten und Glykoformen unterscheiden.

Neben der Aufnahme in die Zelle ist bei *in vivo* Funktionalitätsstudien auch die Stabilität und damit Lebensdauer und lokale Konzentration des Proteins relevant. Obwohl häufig die Funktion des Zuckerbaums im Schutz vor proteolytischem Abbau und zwar durch die Abschirmung einer Schnittstelle gesehen wurde (Kretz et al., 1990, Rafi et al., 1990, Whitelegge et al., 2003), wurden keine oder nur eine geringfügig geringere Stabilität für deglykosyliertes (N215D) oder variantes Sap-B (N215H) beobachtet (Hiraiwa et al., 1993, Wrobe et al., 2000).

### 4.2.1.2 DLS

Während Sap-A und -C direkt mit den Enzymen interagieren, die sie beim Abbau stimulieren (Berent und Radin, 1981, Morimoto et al., 1989), wurde dieses Verhalten für Sap-D noch nicht ausreichend untersucht, für Sap-B jedoch ausgeschlossen (Fischer und Jatzkewitz, 1977). Für die Funktionsweise von Sap-B sind also die Anlagerung an die Membran, die Extraktion und Komplexierung des Lipids und dessen Transport zum Enzym oder einer Donormembran entscheidend.

Nach dem Topologiemodell (Abb. 2-2) findet der GSL-Abbau an intraendosomalen und intralysosomalen Vesikeln statt, die einen Durchmesser von ca. 50-100 nm (Bradová et al., 1993) besitzen und durch ihre Krümmung und dem Fehlen einer Glykanschicht gegenüber der Plasmamembran oder organellen-limitierenden Membranen destabilisiert sind. Diese Situation wurde durch große, unilamellare Liposomen (bzw. Vesikeln, LUVs) nachgestellt. Struktur und Größe der Liposomen wurden mittels DLS und Mikroskopie vor und nach der Zugabe von Saps oder Kontrollproteinen untersucht. Bei der Zugabe von BSA vergrößerte sich der Radius von Liposomen, die anionische Lipide enthielten, durch Fusion oder elektrostatische Aggregation (bei pH 4 ist das Protein positiv, die BMP-haltige Membran dagegen negativ geladen (Wilkening et al., 2000)), dagegen verkleinerte sich der Radius nach der Zugabe von Triton-X-100 auf unter 10 nm, da durch das Detergenz die Liposomen in Mizellen aufgelöst wurden (Klingenstein, 2002). rgSap-B, im Protein-Lipid-Verhältnis 1:10 bis 1:1000 führte weder bei neutralen noch bei BMP-haltigen Liposomen zu einer Veränderung der Größe (Abb. 3-21). Es ist bekannt, daß Sap-B GSL (Vogel et al., 1991) und auch Phosphatidylcholin (Ciaffoni et al., 2006) zwischen Membranen transferieren kann. Vermutlich bilden sich kurzfristig lösliche Komplexe mit rgSap-B, Lipide werden zwischen den Liposomen ausgetauscht, und nach der Perturbation nehmen die Liposomen wieder die stabilste Größe ein. rgSap-B und ruSap-B, die über Reversed-Phase-Chromatographie unter Verwendung organischer Lösungsmittel aufgereinigt worden waren, zeigten hier zum ersten mal ein abweichendes Verhalten: nach Proteinzugabe trübte sich die Liposomensuspension konzentrationsabhängig, das Liposomensignal verbreiterte sich und verschob sich bei BMP-haltigen Liposomen nach größeren Werten. Diese Proben verhielten sich ähnlich wie BSA, das vermutlich die Membran bedeckt und so mit den Liposomen Aggregate bildet, die dann makroskopisch als Niederschlag ausfallen. Die Fähigkeit, nach der Bindung an die Membran wieder in Lösung zu gehen, scheint also bei rSap-B(RP) eingeschränkt zu sein. Möglicherweise wurden durch die Einwirkung organischer Lösungsmittel hydrophobe Bereiche exponiert oder vergrößert.

### 4.2.1.3 SPR

Bei SPR-Messungen fiel das Signal bei Zugabe von rgSap-B unter die Nulllinie, die der vollständigen Bedeckung des Chips mit Liposomen entspricht, also muß die vorher stabile Liposomensicht Material verloren haben; dieser Vorgang wurde als „Abschwemmung“ bezeichnet. Dabei ist es möglich, daß einzelne Lipide von den Aktivatoren komplexiert und in Lösung gebracht wurden oder daß ein Teil der Liposomen durch Fusion in planare, den Chip bedeckende Membranen umgeordnet wurde, die durch ihren Platzbedarf andere



Membranstrukturen verdrängen (3.5.2.2, S.51). Mit der SPR-Methode werden keine Massenänderungen sondern Änderungen des Brechungsindex in der Nähe der Chipoberfläche gemessen. Diese sind zwar proportional zur Bedeckung des Chips, können theoretisch aber auch durch Pufferwechsel oder Phasenänderungen der Membran hervorgerufen werden. Mit einer unabhängigen Methode, nämlich mit der Extraktion von radioaktiv markiertem PC oder Cholesterol aus octylsepharose-gebundenen Liposomen, konnten Artefakte ausgeschlossen, die Abschwemmung bestätigt und die Natur des abgeschwemmten Materials bestimmt werden (Abb. 3-28). Außerdem gibt es Hinweise, daß nicht intakte Liposomen die Säule bzw. den Chip verlassen, da sich das Verhältnis der Lipidkomponenten von eingesetzten Liposomen und Eluat unterschieden. Das Mengenverhältnis von PC zu Cholesterol liegt bei den ursprünglich eingesetzten Liposomen bei 2,4:1 (61:25 mol%) und verschiebt sich in den Eluaten zu 1,75:1<sup>1</sup>. Die Ergebnisse der SPR- und Säulen-Experimente sind qualitativ aber nicht quantitativ vergleichbar, denn während der SPR-Chip bis zu 50% der immobilisierten Lipide verliert, ist der Anteil bei den auf der Säule gebundenen Liposomen mit 1,1 (PC) bis 1,4% (Chol) wesentlich geringer. Die Ursache liegt in den unterschiedlichen Mengenverhältnissen von Protein zu Lipid, außerdem unterscheiden sich die Materialien in der Länge ihrer Alkylketten (C8-C12 für den Biacore-Chip, C8 für die Säule). Auf der Säule fließt innerhalb von zwei Minuten 1 nmol Protein an 75 nmol Lipid vorbei, in der SPR-Flußzelle sind es in drei Minuten bis zu 300 pmol Protein zu 10 pmol Lipid<sup>2</sup> auf der liposomalen Chipoberfläche, also im Verhältnis wesentlich mehr Protein. Das Säulenvolumen (und die Kapazität des Materials) legt die Menge an gebundenen Liposomen fest, da aber die Säule nicht auf die Größe der SPR-Flußzelle (0,02 µl) reduziert werden kann, benötigte man mehrere mg Protein pro Messung, um sich den Bedingungen der SPR-Messungen anzunähern, was zwar prinzipiell möglich aber unter dem Aspekt des Proteinverbrauchs nicht praktikabel ist.

Neben der Abschwemmung von Lipiden durch die Destabilisierung der Liposomenmembran tritt wahrscheinlich auch die direkte Verdrängung der Lipide durch Sap-B auf der hydrophoben Chipoberfläche auf, sobald diese durch den Lipidverlust zugänglich wird. Da normalerweise aber die Regeneration des Chips nach einer Messung mit Liposomen und Saps mit CHAPS/NaOH erreicht werden konnte, während sich direkt auf der Chipoberfläche

<sup>1</sup> Berechnung: 1,1% eluiertes PC von 61 mol% PC im Liposom ergibt 0,7 mol% in den eluierenden Fraktionen; 1,4% Cholesterol von 25 mol% ergibt 0,4 mol%;  $0,7/0,4 = 1,75$

<sup>2</sup> Berechnung: Fläche der Zelle = 1,2 mm<sup>2</sup>, 1 RU ~ 0,9 pg/mm<sup>2</sup>,  $M_{\text{Lipid}}$  (gemittelt für Standardliposomen PC/Chol/BMP, 760/387/684 g/mol, 60:20:20 mol%) ≈ 670 g/mol, ergibt 6000 RU ~ 9,7 pmol

## Diskussion

gebundenes Sap nur unter denaturierenden Bedingungen entfernen ließ, liegt am Ende der durchgeführten Messungen - also nach einer Injektion von 0,3 nmol (60 µl einer 5 µM Proteinlösung), gefolgt von reinem Puffer - vermutlich keine reine Sap-Bedeckung vor. Ob eine größere Menge Sap-B tatsächlich in der Lage ist, die Liposomen vollständig zu verdrängen, oder ob z.B. Membranstrukturen entstehen, die die Oberfläche abschirmen, würde die genaue Analyse der Chipbedeckung durch andere Methoden als SPR erfordern (3.5.2.3).

Nach der Immobilisierung der Liposomen wurde der Meßwert auf Null gesetzt. Dieser Schritt diente dazu, produktionsbedingte Unterschiede zwischen den Chips bzw. den einzelnen Meßzellen auszugleichen, außerdem ist er notwendig, um die Interaktionskurven vergleichen zu können. Allerdings hängen Bindung und Lipidmobilisierung der Saps nicht nur von der Zusammensetzung der Liposomen ab, sondern auch von deren ursprünglicher Anzahl auf der Chipoberfläche; diese Anzahl wiederum ist ebenfalls von der Lipidzusammensetzung abhängig (Abb. 3-25).

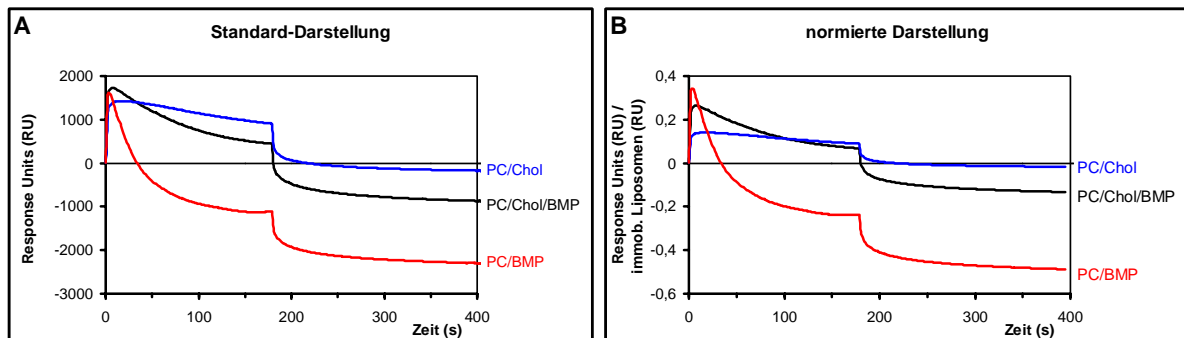


Abb. 4-1 Im Gegensatz zur üblichen Darstellung (A) bezieht die normierte Darstellung (B) die unterschiedlichen Mengen an immobilisierten Liposomen auf dem Chip - vor der Injektion des Proteins, hier rgSap-B - mit ein; die abgebildeten Meßkurven zeigen drei Liposomenarten, die den gesamten untersuchten Bereich der unterschiedlichen BMP- und Cholesterolkonzentrationen umfassen, (PC/Chol, 62:38 mol%; PC/Chol/BMP, 48:38:14 mol%; PC/BMP, 86:14 mol%); für die Versuchsbedingungen vgl. Abb. 3-30.

Um beide Effekte zu trennen, kann man die Meßkurven formal auf die Menge an immobilisierten Liposomen normieren (indem man alle Meßwerte der Kurve durch den Betrag - in RU- an immobilisierten Liposomen direkt nach der Beladung teilt). Diese Darstellung ist unüblich, zeigt aber hier folgendes auf anschauliche Weise: die relative Lage der Kurven zueinander verändert sich durch die Normierung im Prinzip nicht (Abb. 4-1). Die Effekte von Cholesterol- und BMP-Gehalt der Liposomen auf die Lipidmobilisierung durch Sap-B werden bestätigt, ihr Einfluß auf die Membranbindung von rgSap-B – BMP steigert sie, Cholesterol vermindert sie -werden sogar gegenüber Abb. 3-30 verdeutlicht. Da die Grundlinie des leeren Chips bei der normierten Darstellung per Definition bei -1 liegt, läßt

sich der Materialverlust einfach ablesen, so haben z.B. die PC/BMP-Liposomen mindestens 50% der Lipide verloren, bzw. mehr als 50% bei gleichzeitigem Verbleib von Sap-B auf dem Chip (Abb. 4-1, B).

Man könnte vermuten, daß die Vergleichbarkeit der Meßkurven sich verbessern ließe, wenn der Chip mit gleichen Mengen an Liposomen beladen werden könnte, unabhängig von deren Lipidzusammensetzung. Durch die Modifizierung des Beladungsprotokolls ist dies prinzipiell möglich, da außer der Zusammensetzung auch die Konzentration der Liposomen-Suspension und deren Injektionsdauer und -geschwindigkeit das Ergebnis der Beladung beeinflussen. Vermutlich befinden sich dann aber nicht nur „immobilisierte“, also über Alkylketten verankerte Liposomen auf der Chipoberfläche, sondern auch solche, die unspezifisch an andere Liposomen adsorbiert sind und deshalb andere Eigenschaften besitzen. Aus diesem Grund wurde die Modifizierung des Beladungsprotokolls verworfen.

Die Bindung von rgSap-B an immobilisierte Liposomen und die sofort danach einsetzende Abschwemmung waren konzentrationsabhängig (Abb. 3-27). In der Assoziationsphase (Injektion des Proteins) überlagerten sich die gegenläufigen Prozesse – Bindung und Abschwemmung –, was Aussagen über die Bindung erschwert. Außerdem kam es zu Überkreuzungen der Kurven zwischen 0,05 und 1  $\mu\text{M}$  rgSap-B. Je mehr Protein gebunden wurde, um so schneller und tiefer sank das Signal ab. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ließ sich die Geschwindigkeit der Lipidmobilisierung gegenüber 1  $\mu\text{M}$  kaum noch steigern (das Gefälle beider Kurven war gleich), was darauf hindeutet, daß die Liposomenoberfläche mit Sap-B gesättigt war. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  rgSap-B wurde die Bedeckung mit Standardliposomen nur zu ca. 15% (1000 von 6000 RU) reduziert; gleichzeitig wurde ein Meßbereich von ca. 2500 RU umspannt. Da sich der Meßbereich als ausreichend empfindlich erwies und bei keiner der folgenden Messungen überschritten wurde, diente diese Sap-Konzentration als Standardkonzentration. Bei ca. 10 pmol auf dem Chip gebundenem Lipid betrug das molare Lipid-Protein-Verhältnis 1:0,3 bis 1:30 (bei 0,05  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$  Sap-B). Die Zusammensetzung des Lipid-Protein-Eluats bei maximaler Mobilisierung von ca. 50% betrug ca. 1:60, also bildete nur ein Bruchteil der Saps 1:1-Komplexe aus. Mit 5  $\mu\text{M}$  liegt die absolute Konzentration wahrscheinlich noch unter der physiologischen im Lumen des Lysosoms: ohne Berücksichtigung von Aufreinigungsverlusten konnten mehr als 5 mg Sap-B aus 1 kg Lebergewebe isoliert werden (Fischer und Jatzkewitz, 1975). Mit einem geschätzten lysosomalen Volumen von 1% des

## Diskussion

---

Gewebes und einem molekularen Gewicht von 10 kDa für Sap-B ergibt sich eine Konzentration von bis zu 50  $\mu$ M.

Die Anbindung des Aktivators und die Abschwemmung von Lipiden wurden durch eine niedrige Ionenstärke des Puffers gefördert (Abb. 3-29). Die niedrige Ionenstärke sollte die Stabilität von Sap-B in Lösung herabsetzen und die elektrostatische Anziehung zwischen positiv geladenem Sap-B und der negativen, BMP-haltigen Membran fördern. Darüberhinaus liegt das Optimum der Arylsulfatase A in 50 mM Natriumformiatpuffer bei pH 4,5, während es sich mit sinkendem Salzgehalt zu höheren pH-Werten verschiebt (Stinshoff und Jatzkewitz, 1975). Man kann vermuten, daß Enzym und Aktivator ähnliche Reaktionsbedingungen bevorzugen.

Der pH-Wert des Lysosoms liegt zwischen 4 und 5,5 (Coffey und De Duve, 1968, Mellman et al., 1986). Dies gilt auch für die pH-Optima der lysosomalen Exohydrolasen, z.B. pH 4,7 für die GM1- $\beta$ -Galaktosidase (Hanada und Suzuki, 1979), pH 4,5 für die Arylsulfatase A (Stinshoff und Jatzkewitz, 1975) oder pH 3,8-4,3 für die saure Ceramidase (Bernardo et al., 1995). Diese Enzyme, deren Reaktionen von Sap-B oder -D stimuliert werden, sind demnach bei dem in Anlehnung an frühere Experimente (z.B. Wilkening et al., 2000) gewählten „lysosomalen“ pH-Wert von 4,2 aktiv. Der saure pH ist für die Membranbindung und für die Lipidextraktion von rgSapB essentiell (Abb. 3-29), letztere konnte bei neutralen Liposomen bei pH 5,5 und bei BMP-haltigen bei pH 7,0 nicht mehr beobachtet werden.

Intralysosomale Membranen besitzen eine charakteristische Lipidzusammensetzung: sie enthalten BMP, aber kaum Cholesterol. Die Anbindung von rgSap-B an die Liposomen wurde durch beide Lipide kaum beeinflusst, oder die Unterschiede wurden durch das direkte Einsetzen der Abschwemmung überdeckt. Die Abschwemmung war dagegen stark von der Lipidzusammensetzung abhängig (Abb. 3-30): ein hoher BMP-Gehalt und die Abwesenheit von Cholesterol destabilisieren die Membran so, daß die Lipidextraktion einfacher wird. Außer BMP wirken auch andere anionische Lipide ähnlich destabilisierend, allerdings kommen sie entweder nativ in intralysosomalen Vesikeln nur selten vor oder werden, im Gegensatz zu BMP, schnell abgebaut (z.B. Sulfatid). Eine besondere Affinität zu Sulfatid, immerhin die hauptsächliche Speichersubstanz bei einer Sap-B-Defizienz, konnte nicht beobachtet werden.

Bei der Niemann-Pick-Typ-C-Erkrankung wird Cholesterin während des Endozytoseweges aufgrund von Defekten in bestimmten Proteinen des Transportsystems (NPC1 und 2) nicht aus den Endosomen oder Lysosomen entfernt, sondern akkumuliert in intralysosomalen Membranstrukturen (Patterson, 2003). Der Phänotyp ist vor allem im Gehirn durch die Speicherung von GSL gekennzeichnet. Die SPR-Daten liefern für diesen Sekundär-Effekt eine mögliche Erklärung: Sap-B, genau wie Sap-A (Locatelli-Hoops et al., 2006), ist nur noch eingeschränkt in der Lage, Lipide durch Extraktion dem Abbau zuzuführen, wenn durch Cholesterin die Membranfluidität vermindert und eine Perturbation dadurch erschwert wird.

In früheren SPR-Messungen des Arbeitskreises wurde aus Gewebe aufgereinigtes, glykosyliertes Sap-B verwendet (Wilkening et al., 2000), das allerdings keine Abschwemmung zeigte, so daß zuerst die Güte der rekombinanten Präparate zweifelhaft erschien. Es stellte sich aber heraus, daß der zur Trennung der Saps voneinander entscheidende Schritt, nämlich die Reversed-Phase-Chromatographie, die Eigenschaften der Präparate verändert hatte: glykosyliertes rekombinantes Sap-B verlor durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln ebenfalls die Fähigkeit zur Lipidmobilisierung (Abb. 3-33). Auch Concanavalin A-Untereinheiten, die sich während der Chromatographie leicht von der Matrix lösen können, verfälschen das Verhalten der Probe gegenüber Membranen (Con A bindet an Liposomen). Die Empfindlichkeit der SPR-Methode verlangt also einheitlich aufgereinigte Präparate.

Die Glykosylierung der Saps wurden bisher häufig als irrelevant betrachtet, da nur geringe Unterschiede zwischen glykosylierten und unglykosylierten Formen zu beobachten waren (z.B. Sap-A: Morimoto et al., 1989, Sap-B: Hiraiwa et al., 1993, Norris et al., 2005, Whitelegge et al., 2003, Sap-C: Qi et al., 1994, Sano und Radin, 1988, Weiler et al., 1993 Sap-D: Tatti et al., 1999). Es wurde vermutet, daß der Zuckerbaum eine proteolytische Schnittstelle verdeckt und so den Abbau verhindert (Whitelegge et al., 2003), oder daß er für die korrekte Faltung des Proteins notwendig ist (Hiraiwa et al., 1993). Allerdings konnten diese Befunde nicht erklären, warum ein unglykosyliertes Sap-B trotz richtiger Lokalisation und annähernder Wild-Typ-Stabilität kaum funktional war, sondern bei einem Patienten zur massiven Sulfatidspeicherung und nach einigen Jahren zum Tode führte (Wrobe et al., 2000). Durch die SPR-Messungen an verschiedenen Sap-B-Formen konnte für diese erstmals gezeigt werden, daß das volle Potential zur Membranperturbation und Lipidextraktion nur bei vorhandener Glykosylierung voll ausgeprägt wurde, während die unglykosylierten Saps zwar

an die Liposomen banden, sich dann aber kaum noch ablösten (Abb. 3-32). Der polare Zuckerbaum sollte die Löslichkeit erhöhen, und den Übergang des Sap-B-Lipid-Komplexes zurück in die wäßrige Phase erleichtern. Die Unterschiede zwischen den unglykosylierten Sap-B-Varianten sind möglicherweise auf den Aminosäureaustausch an Position 215 (innerhalb der Glykosylierungssequenz: D, Q und H statt N215) zurückzuführen, der an dieser Stelle zu unterschiedlichen Ladungsverhältnissen und Platzbedarf führte. Die Glykoformen von Sap-A verhalten sich analog (Locatelli-Hoops et al., 2006), für Sap-C und -D konnten noch keine vergleichenden Messungen durchgeführt werden, da das Expressionssystem *P.pastoris* diese beiden Saps nur sehr gering oder gar nicht glykosyliert.

### 4.2.2 Sap-D

ruSap-D zeigte im liposomalen Ceramidase-Assay nur ca. 10% der Aktivität des aus Gewebe aufgereinigten, glykosylierten Sap-D (Abb. 3-17 und Linke et al., 2001b). Die Reaktion wird durch einen sauren pH-Wert und BMP als Liposomenbestandteil stimuliert, während Cholesterol die Reaktion hemmt. Die Zugabe von ruSap-D führte bei Liposomen, die anionische Lipide enthielten, zur Fusion der Liposomen, zur Trübung der Suspension, und zur Bildung von Niederschlag (Abb. 3-23). Andere Arbeitsgruppen (Ciaffoni et al., 2001) beobachteten unter ähnlichen Bedingungen (Mengenverhältnis Protein/Lipid ~ 1:25) die Auflösung negativ geladener, multilamellare Vesikel zu „Partikeln“, die Sap-D enthalten, allerdings wurde aus Gewebe aufgereinigtes, glykosyliertes Sap-D eingesetzt und nicht die Partikelgrößenverteilung, sondern die Trübung durch Lichtstreuung gemessen. Nur bei destabilisierten Liposomen (14 mol% BMP, 5 mol% Chol) zeigte ruSap-D eine leichte Tendenz zur Lipidextraktion (Abb. 3-35), während seine Bindung an die immobilisierten Liposomen bis zu fünfmal höher war als bei rgSap-B. Möglicherweise ist auch bei Sap-D die Glykosylierung zur vollen Funktionsfähigkeit notwendig. Die Membranbindung steigt mit sinkendem pH-Wert, sinkendem Cholesterolgehalt und steigendem BMP-Gehalt, außerdem ist sie konzentrationsabhängig. Anionische Lipide wirken ähnlich wie BMP, Ceramid beeinflusst das Verhalten von ruSap-D kaum. Solange kein glykosyliertes Sap-D exprimiert werden kann, bleibt ein Vergleich mit Sap-A und Sap-B unvollständig.

Sap-D hat wahrscheinlich eine ähnliche Struktur wie Sap-C, und beide besitzen ähnlich verteilte Lysinreste. Da bei Sap-C bekannt ist, daß die Region, die für die Stimulierung des Enzyms verantwortlich ist, räumlich von den Aminosäureseitenketten getrennt ist, die für die Membranverankerung und fusogene Aktivität verantwortlich sind (Lys13 und 17, vom Anfang des Saps gezählt) (Liu et al., 2005, Qi und Chu, 2004), war es interessant zu untersuchen, ob für analoge Reste auf der Sap-D-Sequenz gleiches gilt. Dazu wurden

(unglykosylierte) Sap-D-Varianten eingesetzt, bei denen je ein positiv geladener Rest (Arg15 bzw. Lys8) durch das negativ geladene Glutamat ersetzt war. Falls Sap-D die Ceramidase direkt stimuliert, hatten die beiden ausgetauschten Aminosäuren nur einen leichten Einfluß, da beide Varianten noch zu ca. 70% aktiv waren (Abb. 3-18). Bei der Membranbindung unterschied sich Sap-D K8E kaum von der Wildtyp-Form, Sap-D R15E dagegen band wesentlich langsamer, aber fester (Abb. 3-38) und mit einer anderen Kinetik. Die Aminosäure in dieser Position ist also relevant für die Membranaktivität.

Weder hier noch bei Sap-B bedeutet eine festere Bindung gleichzeitig eine höhere Funktionalität, sondern die Dissoziation, mit oder ohne gebundenem Lipid, muß immer möglich bleiben. Deshalb bieten sich als Ergänzung zu SPR-Spektroskopie Transfer-Experimente an (Babalola et al., 2007, Wendeler et al., 2006), um die Mechanismen der Saps weiter zu studieren.

## 5 Material

### 5.1 Geräte

Bioreaktor	Bioflow 3000, NB Scientific	New Brunswick, USA
Blotting-Apparatur	Mini-Transblot; BioRad	München
Densitometer	Shimadzu	Duisburg
DLS-Gerät	ALV-NIBS/HPPS High sensitivity version, ALV-GmbH	Langen
Elektrophorese-Gerät	Miniprotean II, BioRad	München
Elektroporator	Cellject; Eurogentec	Brüssel, Belgien
Fluoreszenz-Detektor	Shimadzu RF-10 AX	Duisburg
Flüssigszintillationszähler	Tri-Carb 1900 TR; Canberra Packard/ Perkin Elmer	Rodgau- Jügesheim
FPLC-Anlage	Pharmacia Biosystems	Freiburg
Geldokumentationsanlage	Cybertech CS-1 mit <i>Image Documentation System</i> ; Cybertech	Berlin
Horizontalentwicklungskammer für DCs	Camag	Berlin
Horizontalelektrophorese- Apparatur	Horizon 20-25, 11-14; Gibco Invitrogen Coporation	Karlsruhe
HPLC-Anlage (präparativ)	BioCad Sprint System; PE Applied Biosystems	Darmstadt
HPLC-Anlage (analytisch)	SMART, Amersham Biosystems (Pharmacia)	Freiburg
Extruder	Liposofast, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
MALDI-Massenspektrometer	<i>TofSpecE</i> -Massenspektrometers, Micromass	Manchester, Großbritannien
PCR-Block	Tri-Thermoblock, Biometra PTC-200, Biozym	Göttingen Hess. Oldendorf
Photometer	Genquant II, Pharmacia Biotech SmartSpec 3000 BioRad Multiscan Ascent, Labsystems Dinex Hybaid	Freiburg München Frankfurt a.M.
Phosphoimager	Fujix BAS 1000, Raytest	Straubenhardt
Reinstwasseranlage	Easypure UV/UF, Werner	Leverkusen
Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyzers, PE Applied Biosystemys	Darmstadt
SPR-Gerät	BiaCore 3000, BiaCore	Freiburg
Transmissionselektronenmikroskop	Philips CM 120	Eindhoven, Niederlande
Transversalfiltration	Pellicon XL 50, Millipore	Schwalbach
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson	Danbury, USA
UV-Transilluminator	Biometra	Göttingen



Zentrifugen	Modelle 5414, 5417R, 5415D, Hamburg 5810R, Eppendorf Minifuge GL, Heraeus Hanau Sorvall RC5B, Du Pont Bad Homburg Instruments Düsseldorf Sorvall RC5C plus, Kendro München L8-70M, Beckman Instruments
Zentrifugenrotoren	Sorvall SLA-3000, GS-3, GSA, Düsseldorf SS34, JA10 ; Kendro Ti 5, SW41 Ti ; Beckman München Instruments

## 5.2 Verbrauchsmaterialien

DC/HPTLC-Platten	Merck	
Dialyseschlauch	Servapor, Serva	Heidelberg
Elektroporationsküvetten	0,2 cm, Invitrogen	Karlsruhe
Extrudermembran	Polycarbonat 50, 100 nm, Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
Filter	Bottletop, SFCA-Membran, 0,2 µm, Nalgene	Rochester, USA
Geltrocknungsfilm	Minisart, 0,2 µm, Sartorius	Göttingen
Kulturschalen	Promega	Mannheim
Kupfer-Grids (Mikroskopie)	Falcon, Becton-Dickinson	Heidelberg
PVDF-Membran	400er Maschennetz, Science Services	München
Röntgenfilm	Parablot, Macherey und Nagel	Düren
SPR-Sensorchips	X-Omat S, BioMax, Eastman Kodak	Rochester, USA
UV-Küvetten (DLS-Messung)	Pioneer L1, CM5, Biacore	Freiburg
	Plastibrand	Wertheim

## 5.3 Chemikalien

Alle Chemikalien hatten Analysen-Reinheitsgrad oder höher und wurden nicht weiter gereinigt. Die Salze waren von Merck, Darmstadt, die Lösungsmittel von Baker, Deventer, NL, oder Riedel-de Haen/ Sigma-Aldrich, Seelze.

Methyl- $\alpha$ -D-manno- -glucopyranosid	und Sigma	Taufkirchen
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma	Taufkirchen
Acrylamid/ N,N'-	Roth	Karlsruhe
Methylenbisacrylamid-Mix		
Agar	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Agarose	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer	Mannheim
Antifoam 204 und 289	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	Fluka/ Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma	Taufkirchen
Biotin	Invitrogen	Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
CHAPS	Sigma	Taufkirchen

## Material

---

Coomassie, Lösung	kolloidale	ICN Pharmaceuticals	Costa Mesa, USA
Dextrose		Sigma	Taufkirchen
DMEM		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
EDTA		Merck	Darmstadt
Essigsäure		Riedel-de Haen/ Sigma-Aldrich	Seelze
Ethidiumbromid		Serva	Heidelberg
Ficoll		Sigma	Taufkirchen
FKS		Cytogen	Sinn-Fleisbach
Formaldehyd, 37% (v/v)		Merck	Darmstadt
Geneticin (G418)		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Glucose		Sigma	Taufkirchen
Glycerol		Sigma	Taufkirchen
Glycin		Merck	Darmstadt
Hefe-Extrakt		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
LB-Medium		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
MEM		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol		Sigma	Taufkirchen
NP-40		Fluka/ Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Octylglucosid		Sigma	Taufkirchen
O-Phthaldialdehydlösung (OPA reagent solution incomplete)		Sigma	Taufkirchen
Pepton		Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Phenol		Roth	Karlsruhe
Phosphorsäure, 85%		Riedel-de Haen/ Sigma-Aldrich	Seelze
SDS		Sigma	Taufkirchen
Serva Blau G		Serva	Heidelberg
Sinapinsäure		Sigma	Taufkirchen
Sorbitol		Sigma	Taufkirchen
Szintillationsflüssigkeit, Ultima Gold		Packard	Dreieich
Taurodesoxycholat		Sigma	Taufkirchen
TEMED		Sigma	Taufkirchen
Tricin		ICN Pharmaceuticals	Costa Mesa, USA
Trifluoressigsäure		Sigma	Taufkirchen
Tris		ICN Pharmaceuticals	Costa Mesa, USA
Triton X-100		Sigma	Taufkirchen
Tween-20		Sigma	Taufkirchen
Uranylacetat		Merck	Darmstadt
YNB (yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids)		Invitrogen	Karlsruhe
Xylenyanol		Merck	Darmstadt

### 5.4 Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien, Plasmide und Nukleinsäuren

E.coli DH5 $\alpha$	Promega	Mannheim
Pichia pastoris GS115	Invitrogen	Karlsruhe
Vektor pPIC9(K)	Invitrogen	Karlsruhe

Vektor pUC19	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
3'-/5'-AOX1- Sequenzierprimer	Invitrogen	Karlsruhe
DNA-Längenstandard 1 kB Plus DNA Ladder, Oligonukleotide	Gibco/ Invitrogen Eurogentec	Karlsruhe Köln

Das Plasmid pBHE mit pSap-cDNA, Wildtyp und Varianten, wurde in der Abteilung dargestellt. Die Normalfibroblasten wurden von der Johanniter Kinderkrankenhause in Sankt Augustin zur Verfügung gestellt, die pSap-defizienten Fibroblasten von Prof. Klaus Harzer, Universität Tübingen.

### 5.5 Kits

AmpliTaq FS BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems	Darmstadt
Nucleobond AX 100 Midiprep Kit	Macherey und Nagel	Düren
QIAEX II DNA Elutionskit	Qiagen	Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	MBI Fermentas	St.Leon-Rot
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer Life Sciences	Boston, USA

### 5.6 Antikörper, Enzyme, Proteine

Protein-G- Meerrettichperoxidase- Konjugat, Kaninchen-anti-Ziegen-IgG- Antikörper- Meerrettichperoxidase- Konjugat,	BioRad	München
Endo H	NEB	Frankfurt
PNGase F	NEB	Frankfurt
Restriktionsendonukleasen	NEB	Frankfurt
<i>Pwo</i> -Polymerase	PeqLab	Erlangen
RNase A	USB	Cleveland, USA
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas	St.Leon-Rot
Trypsin	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Albumin Fraktion V (Blot)	Roth	Karlsruhe
BSA	Sigma	Taufkirchen
Cytochrom c	Sigma	Taufkirchen

## Material

---

MW-Standard für die Gelfiltration: MWGF70 Kit for Molecular Weights 6,500-66,000 (Blue Dextran, BSA, Carboanhydrase, Cyt c, Aprotinin)	Sigma	Taufkirchen
MW-Standard für die SDS-Elektrophorese: MultiMark Multi-Colored	Invitrogen Novex	Karlsruhe

Die polyklonale Antikörper gegen Sap-A-D (Henseler et al., 1996a, Klein et al., 1994), ruSap-C (Ralf Klingenstein) und die rekombinante humane Saure Ceramidase (Heike Schulze) stammten aus dem Arbeitskreis. Die rekombinante Arylsulfatase A und natives, aus humanem Gewebe aufgereinigtes Sap-B wurden von der Abteilung Prof. Volkmar Gieselmann, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt, die varianten Formen von Sap-D von der Abteilung Prof. Wolfram Saenger, Freie Universität, Berlin.

### 5.7 Säulen und Säulenmaterial

Borsilikatglas-Leersäulen	Omnifit	Cambridge, UK
PEEK-Leersäulen	PE Applied Biosystems	Darmstadt
Anionentauschermaterial POROS 20HQ	PE Applied Biosystems	Darmstadt
Concanavalin A-Sepharose 4B	Sigma	Taufkirchen
Kationentauschermaterial POROS 20HS	PE Applied Biosystems	Darmstadt
NiNTA-Agarose	Qiagen	Hilden
Octylsepharose 4 Fast Flow	Sigma	Taufkirchen
Carbograph-Säulchen HiTrap HIC Selection Kit	Alltech Amersham Biosciences	Deerfield, USA Freiburg
Lichroprep 18	Merck	Darmstadt
NiNTA-Spin-Säulchen, 500 µl	Qiagen	Hilden
Nucleosil 300-5-C4, (8x300 mm), Fertigsäule	Knauer	Berlin
Superdex HiLoad 16/60, Gelfiltrationssäule	Amersham Biosciences	Freiburg

### 5.8 Lipide

Myristoyl-BMP	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
D-erythro-C16-Ceramid	Matreya	Pleasant Gap, USA
[ <sup>14</sup> C]-Cholesterol	Amersham Biosciences	Freiburg
Cholesterol	Sigma	Taufkirchen
Phosphatidsäure (Eigelb)	Sigma	Taufkirchen
Phosphatidylcholin (Eigelb)	Lipoid	Ludwigshafen

Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
[ <sup>14</sup> C]-Phosphatidylcholin	Biotrend	Köln
Sulfatid (Rinderhirn)	Sigma	Taufkirchen

[<sup>14</sup>C]-Sulfatid, [<sup>14</sup>C]-Galaktosylceramid, C12/18-Ceramid, C14- und C16-Sphingalin wurden von Dr. Günter Schwarzmann synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

### 5.9 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Puffer wurden ebenfalls sterilfiltriert und bei Bedarf (DLS, SPR) unter Vakuum entgast.

	Zusammensetzung	
Basalsalz-Medium	26,7 ml/l	85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	0,93 g/l	CaSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O
	18,2 g/l	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	14,9 g/l	MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O
	4,13 g/l	KOH
	40,0 g/l	Glycerol
LB-Medium	1% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
	1% (w/v)	NaCl
		eingestellt auf pH 7,0 mit NaOH
MD-Medium	1,34% (w/v)	YNB
	4 x 10 <sup>-4</sup> % (w/v)	Biotin
	2% (w/v)	Dextrose
MG-Medium	1,34% (w/v)	YNB
	4 x 10 <sup>-4</sup> % (w/v)	Biotin
	1% (v/v)	Glycerol
MM-Medium	1,34% (w/v)	YNB
	4 x 10 <sup>-4</sup> % (w/v)	Biotin
	0,5% (v/v)	MeOH
YPD-Medium	1% (w/v)	Hefe-Extrakt
	2% (w/v)	Pepton
	2% (w/v)	Dextrose

## Material

---

BCA-Reagenz	50 Volumenteile 1 Voumenteil	A B
Lösung A = BCA-Lösung	1% (w/v) 2% (w/v) 0,16% (w/v) 0,4% (w/v) 0,95% (w/v)	BCA Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> •H <sub>2</sub> O Natriumtartrat•2H <sub>2</sub> O NaOH NaHCO <sub>3</sub> , pH 11,25
Lösung B = Kupfersulfatlösung	4% (w/v)	CuSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O
Anodenpuffer (SDS-PAGE)	0,2 M	Tris, pH 8,9
Kathodenpuffer (SDS-PAGE)	0,1 M 0,1 M 0,1% (w/v)	Tris-Cl, pH 8,25 Tricin SDS
Lysispuffer (Hefen)	(2% v/v) 1% (v/v) 100 mM 10 mM 1 mM	Triton X-100 SDS NaCl Tris-HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0
N2-Puffer	100 mM 15% (v/v) 900 mM 0,15% (v/v)	Tris EtOH KCl Triton X-100 eingestellt auf pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
N3-Puffer	100 mM 15% (v/v) 1,15 M	Tris EtOH KCl eingestellt auf pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
N5-Puffer	100 mM 15% (v/v) 1,15 M	Tris EtOH KCl eingestellt auf pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-Puffer	140 mM 40 mM 1 mM 10,5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T-Puffer	1,5 mM 8 mM 140 mM 0,05% (v/v)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaCl Tween 20

PCR-Puffer	10 mM 25 mM 2 mM	Tris-HCl, pH 8,8 25 mM KCl MgSO <sub>4</sub>
PMT1-Spurensalz-Lösung	6,0 g/l 0,08 g/l 3,0 g/l 0,2 g/l 0,2 g/l 0,5 g/l 20 g/l 65 g/l 0,2 g/l 5 ml/l	CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O NaI MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> CaSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O ZnCl <sub>2</sub> FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O Biotin konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Probenpuffer (SDS-PAGE)	10 mM 2,4% (v/v) 0,8% (w/v) 0,4% (v/v) 0,002% (w/v)	Tris-HCl, pH 6,8 Glycerol SDS β-Mercaptoethenol Serva Blue G
Probenpuffer (Agarosegel)	0,25% (w/v) 0,25% (w/v) 30% (w/v)	Bromphenolblau Xylenxanol Ficoll
S1-Puffer	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A
S2-Puffer	200 mM 1% (v/v)	NaOH SDS
S3-Puffer	2,8 M	KAc, pH 5,1
TAE-Puffer	40 mM 40 mM 1 mM	Tris Essigsäure EDTA pH 8,0
TE	1 mM 10 mM	EDTA Tris-HCl, pH 8,0
TFB I	30 mM 50 mM 100 mM 10 mM 15% (v/v)	NaAc Mg <sub>2</sub> Cl•6H <sub>2</sub> O NaCl Ca <sub>2</sub> Cl•2H <sub>2</sub> O Glycerol pH 5,8

## Material

---

TFB II	10 mM 10 mM 75 mM 15% (v/v)	MOPS NaCl Ca <sub>2</sub> Cl•2H <sub>2</sub> O Glycerol pH 6,4-7,0
Transferpuffer (Western-Blot)	25 mM 200 mM 0,04% (w/v) 20% (v/v)	Tris-Cl, pH 8,0 Glycin SDS MeOH
Uranylacetatlösung (Mikroskopie)	1% (w/v)	Uranylacetat; bei RT und im Dunkeln ansetzen (Rühren für 30 min) und aufbewahren, vor dem Gebrauch zentrifugieren, um Schwebeteilchen abzutrennen



## 6 Methoden

### 6.1 Arbeiten mit *E.coli*

#### 6.1.1 Kulturen

Die Anzucht von *E.coli* Kulturen erfolgt in 5 ml LB-Medium für 12-16 h im Schüttelinkubator bei 37°C (Übernachtskultur). Bakterien, die in ihrem Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen besitzen, werden über die Zugabe von 100 µg Ampicillin (Amp)/ml Medium selektioniert.

Aus den Übernachtskulturen werden Großkulturen, z.B. zur Plasmidpräparation, angeimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von ca. 0,5–1 inkubiert. Einer OD<sub>600</sub> von 1 entspricht eine Zelldichte von ca. 8x10<sup>8</sup> Zellen pro ml, als Leerwert bei der Extinktionsmessung dient Wasser oder das Medium.

Für die mehrmonatige Lagerung werden *stab*-Kulturen angelegt. 1 ml LB/Amp-Agar in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wird angeimpft und für ca. 16 h bei 37°C inkubiert, dann bei 4°C oder 25°C gelagert.

Für die langfristige Sicherung der Bakterienkulturen dient die Glycerol-Dauerkultur. 850 µl einer frischen Übernachtskultur werden mit 150 ml sterilem Glycerol versetzt, gut gemischt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei –80°C.

#### 6.1.2 Darstellung von kompetente Zellen, Transformation und Selektion

Kompetente Zellen besitzen eine für Plasmid-DNA durchlässige Zellmembran. Dies wird durch Behandlung der Bakterien mit einer CaCl<sub>2</sub>-Lösung erreicht.

Man läßt eine frisch angeimpfte Großkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wachsen, erntet die Bakterien durch Zentrifugation bei 3200 x g für 5 min bei 4°C, und resuspendiert das Pellet in 1/5 des ursprünglichen Kulturvolumens in TFB I. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis zentrifugiert man ein zweites Mal, verwirft den Überstand und nimmt das Pellet in einem erneut um 1/5 reduzierten Volumen in TFB II auf. Die entstandene Zellsuspension wird in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert (je 100-200 µl) und sofort bei –80°C tiefgefroren.

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen erfolgt mittels der Hitzeschock-Methode. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit 5-10 µl DNA-Lösung versetzt (entsprechend einigen ng Plasmid-DNA) und für 10-30 min bei 4°C inkubiert. Dann erfolgt der „Hitzeschock“ bei 42°C für 45-90 s in einem Thermomixer. Die Suspension wird 2 min bei 4°C abgekühlt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Selektion erfolgt auf LB/Amp-Agar-Platten, 50-500 µl des Transformationsansatzes werden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien werden in Übernachtskulturen überführt und durch Restriktionsanalyse charakterisiert.

### 6.2 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

#### 6.2.1 Kulturen

Die Anzucht von *P.pastoris* Kulturen vom Stamm GS115 (Invitrogen) erfolgt in YPD-Medium bei einer Temperatur von 28-30°C über Nacht im Schüttelinkubator bei 250-300 rpm.

Aus den Starterkulturen werden Großkulturen angeimpft, dabei sollte das Kulturvolumen maximal 10-15% des Gefäßvolumens betragen, um ausreichende Luftzufuhr zu garantieren. Die Verdopplungszeit in der logarithmischen Wachstumsphase beträgt ca. 2 h. Die Zelldichte

wird durch Extinktionsmessung bei 600 nm bestimmt, dabei entspricht eine  $OD_{600} = 1$  einer Zelldichte von ca.  $5 \times 10^7$  Zellen.

Die Sicherung der Kulturen erfolgt als *stab*-Kultur oder Glycerolkultur.

Für die *stab*-Kulturen wird 1 ml YPD-Agar in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit einer einzelnen *P.pastoris*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert, dann bei 4°C gelagert.

Für die Glycerolkultur wird eine frische Übernachtskultur durch Zentrifugation geerntet und in YPD-Medium, das 15% (v/v) Glycerol enthält, mit einer Konzentration von  $OD_{600} = 50-100$  resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 6.2.2 Transformation

Die Transformation von *P.pastoris* erfolgt durch Elektroporation (Becker und Guarente, 1991). Diese Methode erreicht eine Effizienz von  $10^3-10^4$  transformierten Zellen pro  $\mu\text{g}$  DNA.

500 ml YPD-Medium werden mit einer frischen 5 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 1,3-1,5$  inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation mit  $1500 \times g$  für 5 min bei 4°C pelletiert, das Pellet wird in 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendierung werden mehrfach mit folgenden Volumina wiederholt:

- 250 ml eiskaltes, steriles Wasser
- 20 ml eiskaltes, 1 M Sorbitol
- 1 ml eiskaltes, 1 M Sorbitol

Die erhaltenen Zellsuspension wird in Aliquots von 80  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Ein Aliquot wird mit 5-20  $\mu\text{g}$  linearisierter DNA (in 5-10  $\mu\text{l}$  TE-Puffer) vermischt und in eine eiskalte 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt. Die Mischung wird für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wird in einem Elektroporator bei 1500 V Ladungsspannung, 40  $\mu\text{F}$  Kapazität und 282  $\Omega$  Widerstand durchgeführt, so daß eine Feldstärke von ca. 7500 V/cm erreicht wird und der Puls ca. 10 ms dauert. Sofort nach der Entladung des Elektroporators werden 1 ml eisgekühltes 1 M Sorbitol in die Küvette gegeben und deren Inhalt in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

200-600  $\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes werden auf Minimal Dextrose (MD)-Agar-Platten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert, bis nach 3-4 Tagen erste  $\text{His}^+$ -Kolonien erscheinen.

### 6.2.3 Phänotypisierung

#### 6.2.3.1 Methanolumsatz (Mut+/ MutS)

Je nach Rekombinationsort des linearisierten Transfer-Plasmids mit dem Hefe-Genom, und Art des *cross overs* (Insertion oder Replacement) entstehen Kolonien, die auf methanolhaltigem Medium unterschiedlich schnell wachsen -  $\text{Mut}^+$  steht für den Wildtyp (*methanol utilization wild type*),  $\text{Mut}^S$  für den langsamer wachsenden Phänotyp (*methanol utilization slow*). Um den Phänotyp festzustellen, werden einzelne, transformierte Kolonien gleichzeitig mittels Impf-Öse auf Minimal Methanol (MM)- und MD-Agar-Platten übertragen. Nach einigen Tagen der Inkubation bei 30°C wird die Größe der Kolonien verglichen, dabei sollten die  $\text{Mut}^S$ -Stämme auf dem methanolhaltigen Medium deutlich langsamer wachsen. Für die rekombinante Expression der Saps wurden nur  $\text{Mut}^+$ -Stämme verwendet.

#### 6.2.3.2 Multiple Insertionen

Bei Verwendung des pPIC9K-Plasmids ist es möglich, die Anzahl der Insertionsereignisse mit der Geneticin-Resistenz zu korrelieren (eine Kopie des Kanamycin-Resistenzgens führt zu einer Resistenz gegenüber 0,25 mg Geneticin /ml Medium). Dazu werden transformierte  $\text{His}^+$ -

Kolonien mit 1-2 ml sterilem Wasser von den MD-Platten gewaschen und Aliquots auf YPD-Agar mit steigenden Konzentrationen an Geneticin (0,25–4 mg/ml Medium) ausplattiert. Die Platten werden bei 30°C für 2-5 Tage inkubiert. Kolonien mit hoher Resistenz werden auf ihr Expressionsvermögen hin getestet.

#### 6.2.4 Isolierung von genomischer Hefe-DNA

Eine weitere Methode, die Integration des gewünschten Gens und den Phänotyp zu testen, ist eine analytische PCR-Reaktion mit der genomischen Hefe-DNA als Template und 5'-*AOX1*- bzw. 3'-*AOX1*-Primern als Sonde. Ist das Fremdgen erfolgreich aufgenommen worden, findet man beim Mut<sup>+</sup>-Phänotyp im Agarose Gel zwei Banden, die dem intakten *AOX1*-Gen und dem *AOX1*-Gen erweitert um das Insert entsprechen. Eine Hefekultur von 10 ml wird über Nacht bis Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1200 x g, 5 min, 25°C, geerntet, mit 0,5 ml Wasser gewaschen, und in 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,3 g Glassperlen und 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v), werden die Zellen bei höchster Geschwindigkeit für mindestens 5 min gevortext. Die DNA wird mit 200 µl TE extrahiert und mit 1 ml 100%igem EtOH gefällt. Die DNA wird durch Zentrifugation pelletiert, bei Raumtemperatur getrocknet und in 0,4 ml TE aufgenommen. Zur Entfernung von RNA-Verunreinigungen werden 30 µl DNase-freie RNase A (1 mg/ml) zugegeben, vermischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 µl 4 M Ammoniumacetat in Wasser und 1 ml 100%igem EtOH wird die DNA erneut gefällt, anschließend pelletiert, getrocknet und in 100 µl TE gelöst.

#### 6.2.5 Protein-Expression in *Pichia pastoris*

##### 6.2.5.1 Kontroll-Expression/ Expression im Schüttelkolben

Bei transformierten *P.pastoris* Klonen bestehen trotz gleicher Kopienzahl des Fremdgens erhebliche Unterschiede in der Expressionsleistung, deshalb müssen 10-20 Kolonien bei unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden, um geeignete Klone für Großexpressionen zu finden. Der für die Transformation verwendete Vektor pPIC9K koppelt das Fremdprotein an eine Signalsequenz, die zur Sekretion in den Kulturüberstand führt, dadurch wird die Detektion und spätere Aufreinigung erleichtert.

Für eine Kontrollexpression werden 10 ml Minimal Glycerol (MG)-Medium, ungepuffert, gepuffert (zusätzlich 100 mM NaPP, pH 6,0) oder als „komplexes“ Medium (zusätzlich 1% (w/v) Hefe-Extrakt und 2% (w/v) Pepton) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und im Schüttelinkubator (30°C, 250 rpm) bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 2-6 inkubiert, durch Zentrifugation geerntet (3000 x g, 5 min, 4°C) und in ca. 15 ml MM-Medium (analog zum MG-Medium entweder ungepuffert, gepuffert oder komplex) resuspendiert. Durch den Medienwechsel erfolgt die Induktion der rekombinanten Proteinexpression, sie wird bei guter Sauerstoffzufuhr im Schüttelinkubator durch Zugabe von 0,5% (v/v) MeOH alle 24 h über 5 Tage aufrechterhalten. Die Hefezellen werden pelletiert (5000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand für den Proteinnachweis mittels Elektrophorese, Silberfärbung und Western-Blot eingesetzt.

Geeignete Klone, die das rekombinante Protein in hoher Ausbeute produzieren, werden für Expressionen im größeren Maßstab eingesetzt. Zur ausreichenden Sauerstoffzufuhr werden Schikanekolben, die maximal zu 15% gefüllt sind, verwendet. Die optimalen Pufferbedingungen und Inkubationszeiten aus den Kontrollexperimenten werden dabei übernommen.

### 6.2.5.2 Expression im Bioreaktor (Higgins und Cregg, 1998, Stratton et al., 1998)

#### *Inokulation und Glycerol-Fütterungsphase*

Im Fermenter (Bioflow 3000, NB Scientific) werden 3 l steriles Basalsalz-Medium vorbereitet und mit 150 ml einer Starterkultur (mit einer einzelnen Kultur inokuliertes MG-Medium,  $OD_{600} = 2$ ) angeimpft und 4,35 ml/l PMT1-Spurensalz-Lösung zugegeben. Die Temperatur wird auf 30°C eingestellt, der pH-Wert mit 30%igem  $NH_4OH$  auf 5,0. Das Schäumen des Mediums wird durch Zugabe von Anti-Schaummitteln (Antifoam 204 oder 289), nach Bedarf, verhindert. Die Menge an gelöstem Sauerstoff (DO) wird auf 35% reguliert, dazu ist am Anfang bei einer Luftzufuhr von 4,4 l/min eine Rührgeschwindigkeit von 250 rpm nötig, die sich innerhalb der nächsten ca. 24 h durch die Zunahme der Biomasse auf 800 rpm erhöht, danach muß der DO-Wert über die Anreicherung der zugeführten Luft mit Sauerstoff gehalten werden. Sobald die Hefen die Nahrungsquelle (Glycerol) verbraucht haben, stellen sie den Sauerstoffverbrauch ein und der DO erreicht 100%.

#### *Glycerol-Fütterung am Wachstumslimit (glycerol fed-batch phase)*

Ab diesem Zeitpunkt füttert man für vier Stunden 50%iges Glycerol mit einer Flußrate von 15 ml/(l x h) zu. Um die Anreicherung von Glycerol zu verhindern, unterbricht man halbstündig und am Ende der vier Stunden die Fütterung, bis der DO-Anstieg um ca. 10% in einer Minute oder schneller (DO *spike*) den vollständigen Verbrauch aller Nahrungsquellen anzeigt.

#### *Adaptionsphase*

Um die Expression zu starten, wird die Kohlenstoffquelle Glycerol durch Methanol ersetzt. Am Beginn der Adaptionsphase wird der pH-Wert auf 3,0 gesetzt, indem die  $NH_4OH$ -Zufuhr verringert wird, und Methanol mit 2 ml/l Spurensalzlösung mit einer Flußrate von 3,5 ml/l x h zugegeben. Nach einigen Stunden zeigt der Anstieg des DO-Wertes, daß die Methanolmenge langsam (um ca. 1 ml/l x h pro 30 min) bis auf 12 ml/l x h gesteigert werden kann. Über die Kontrolle des DO *spike* vermeidet man eine zu schnelle Steigerung und toxische Anreicherung des Methanols.

#### *Induktionsphase*

Die sich anschließende Expression dauert je nach Hefestamm 3-5 Tage und wird durch die Ernte des Mediums beendet.

Während des gesamten Experiments werden Proben genommen: in der Wachstumsphase, um die Zelldichte zu bestimmen, in der Expressionsphase, um den optimalen Zeitpunkt der Ernte festzustellen.

## 6.3 Arbeiten mit DNA

### 6.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Es wurden zwei Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien verwendet, die beide auf der alkalischen Lyse beruhen (Birnboim und Doly, 1979). Proteine und DNA werden durch SDS und NaOH denaturiert. Aus dem Lysat werden Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA präzipitiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA, die beim Kit über eine Anionenaustauschersäule u.a. von RNA gereinigt wird.

#### 6.3.1.1 Schnellisolierung

Die Schnellisolierung wurde eingesetzt, um kleine Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, z.B. um Klone durch Restriktion identifizieren zu können. Es werden 1,5 ml einer frischen Übernachtskultur bei 14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R) für 30 s bei 25°C

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird resuspendiert und nacheinander mit folgenden Lösungen versetzt, vermischt und kurz bei 25°C inkubiert:

- 100 µl Resuspensionspuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose)
- 200 µl Lysis-Puffer (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS)
- 150 µl Neutralisationspuffer (5 M Essigsäure, mit KOH auf pH 4,8 eingestellt)

Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 3 min, 25°C) wird der klare Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit zwei Volumen Isopropanol gefällt, mit einem Volumen 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### 6.3.1.2 Präparative Isolierung

Die präparative DNA-Isolierung erfolgt mit dem Midi-NucleoBond-Kit (Macherey und Nagel), die DNA wird dabei über eine Anionentauscher mit Kieselgelmatrix gereinigt.

100 ml LB-Medium werden mit Bakterien angeimpft und 16 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und in 4,0 ml Puffer S1 aufgenommen, mit 4,0 ml S2 versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 4,0 ml S3 wird der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert, dann werden die Zelltrümer durch Zentrifugation (12.000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die klare Lösung wird vorsichtig vom Pellet getrennt, in ein neues Gefäß überführt und dann auf die mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrierte NucleoBond-AX100-Säule aufgetragen. Die Säule wird mit 2 x 5 ml Puffer N3 gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml Puffer N5 eluiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt durch Isopropanolfällung.

### 6.3.2 DNA-Reinigung

#### 6.3.2.1 Ethanol-fällung

Die DNA-Lösung wird mit  $\frac{1}{10}$  Volumenteilen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumenteilen Ethanol versetzt. Nach der Präzipitation für ca. 30 min bei -20°C wird zentrifugiert (14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R), 4°C, 20 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem, eiskaltem EtOH gewaschen. Das Pellet wird bei Raumtemperatur getrocknet und in Wasser oder einem geeigneten Puffer, z.B. TE aufgenommen.

#### 6.3.2.2 Isopropanolfällung

Die DNA-Lösung wird mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt und zentrifugiert (14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R), 4°C, 20 min), die weitere Aufarbeitung entspricht der Ethanol-fällung.

#### 6.3.2.3 Phenolextraktion

Die DNA-Lösung wird bei Raumtemperatur mit einem Volumenteil Phenol (mit Tris-HCl auf pH 7,5-8 gepuffert) versetzt und vermischt, dabei werden Proteine denaturiert und fallen an der Phasengrenzfläche aus. Um die Phasen wieder zu trennen, wird zentrifugiert (14.000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5810R), 25°C, 3 min). Die obere, wäßrige Phase enthält die DNA und wird vorsichtig abgenommen. Zur Entfernung des Phenols wird die Lösung noch einmal mit einem Volumenteil Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1 v/v) ausgeschüttelt.

Die weitere Reinigung erfolgt über Ethanol- oder Isopropanolpräzipitation.

### 6.3.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgt photometrisch über ihre Absorption bei 260 nm Wellenlänge (SmartSpec 3000, Biorad), dem Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen. Je nach Art der DNA ergeben sich unterschiedliche

## Methoden

---

Proportionalitätsfaktoren, für doppelsträngige DNA beträgt dieser Faktor 5, eine OD<sub>260</sub> entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

Die Reinheit ergibt sich aus dem Quotienten OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>, der für DNA bei 1,8-2 liegt.

### 6.3.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Identifizierung und präparativen Aufreinigung doppelsträngiger DNA-Fragmente werden diese in einer Agarosematrix gemäß ihrer Größe aufgetrennt und über die Fluoreszenz ihrer Interkalationsverbindung mit Ethidiumbromid detektiert.

Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt und neben dem Standard auf das Agarosegel (1-1,5% (w/v) Agarose, in TAE-Puffer, 5 µl Ethidiumbromid auf 100 ml Gel) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in TAE-Puffer bei 5 V/cm Elektrodenabstand in einer Horizontalelektrophoresekammer. Die Detektion erfolgt mit einem UV-Transilluminator mit Dokumentationssystem.

### 6.3.5 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mit dem QIAEX II DNA Elutionskit (Qiagen). Die gewünschte DNA-Bande wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstück wird in Puffer QX (3 µl pro µg Gel) bei 50°C für 10 min inkubiert, bis es sich vollständig aufgelöst hat. Wenn nötig, wird der pH mit 3 M NaAc auf <7,5 eingestellt und ein Gelvolumen Isopropanol zugegeben, bevor die Probe auf die Silicamatrix im Spinsäulchen aufgetragen wird. Alle Wasch- und Elutionsschritte erfolgen durch Zentrifugation für 1 min bei 17.900 x g. Die Säule wird mit 0,5 ml Puffer QX, dann mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, die Elution erfolgt mit 50 µl Niedrigsalzpuffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

### 6.3.6 PCR

Zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Abschnitten und zum schnellen Nachweis bestimmter Sequenzen in Plasmiden dient die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988). In drei Schritten wird zuerst die doppelsträngige Sequenz (Templat) bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert, dann lagern sich komplementäre, eventuell modifizierte Oligonukleotide (Primer) an (Annealing), zuletzt werden die Primer durch eine hitzestabile Polymerase in Anwesenheit von dNTPs verlängert (Extension). Diese Schritte werden zyklisch wiederholt.

Als Template für die einzelnen, die Sap-Domänen codierenden cDNA-Abschnitte wurden der Vektor pBHE mit der vollständigen pSap-Sequenz eingesetzt. Ein Ansatz enthält in 50 µl PCR-Puffer:

- 10-50 ng Templat-DNA
- je 20-100 ng des *forward* und *invers* Primers
- dNTP-Mischung (2,5-10 ng je Nukleotid)

Zuletzt wird 1 U *Pwo*-Polymerase zugegeben und die Reaktionszyklen im Thermocycler gestartet:

2 min	95°C	] 30 x
30 s	95°C	
1 min	Annealing-Temperatur*	
30 s	72°C	

\*)Die Annealing-Temperatur richtet sich nach den verwendeten Primern und liegt 5-10°C unter deren Dissoziationstemperatur T<sub>D</sub>: T<sub>D</sub> = 2 x (A+T) + 4 x (G+C)

Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgt über ein Agarosegel, gefolgt von einer Gelextraktion der gewünschten Banden.

### 6.3.7 Restriktion

Durch die Spaltung doppelsträngiger DNA durch Typ II Restriktionsendonukleasen werden Plasmide charakterisiert oder gezielt Fragmente mit glatten oder kohäsiven Enden dargestellt. Die Hydrolyse einer Phosphordiesterbindung erfolgt spezifisch innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz. Für eine vollständige Restriktion wurde das Enzym in einem leichten Überschuß eingesetzt ( $> 1$  U für  $1 \mu\text{g}$  DNA) und mit dem zugehörigen Puffer für 1-16 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Kontrolle und Reinigung erfolgen über Agarosegelelektrophorese oder im Falle der Linearisierung des Transfervektors für die Elektroporation durch Phenolextraktion.

### 6.3.8 Ligation

T4-DNA-Ligase verknüpft glatte oder kohäsive Enden von DNA-Fragmenten über eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe. Als Cofaktoren benötigt das Enzym ATP und  $\text{Mg}^{2+}$ . Es wurde ein DNA-Ligations-Kit (MBI Fermentas) eingesetzt. Der Ansatz zur Insertion eines restriktionsverdauten PCR-Produktes in ein linearisiertes Plasmid enthält folgende Komponenten in einem Endvolumen von  $20 \mu\text{l}$  Ligationspuffer:

- 400-800 ng DNA, Menge Insert/ Plasmid 1:1 bis 3:1
- 10% (w/v) PEG 4000
- 2 U T4-Ligase

Die Reaktion wird für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert und kann direkt zur Transformation eingesetzt werden.

### 6.3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte unter Verwendung des ABI Prism 310 Genetic Analyzers (PE Applied Biosystems) nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die DNA-Stränge werden mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden markiert, die Amplifikation erfolgt mit einer thermostabilen AmpliTaq-Polymerase in Zyklen (*cycle sequencing*), nach kapillarelektrophoretischer Trennung der Polynukleotide werden diese detektiert. Aus den resultierenden Fluoreszenzspektren läßt sich die Basenabfolge ablesen. Ein Ansatz enthält in  $10 \mu\text{l}$ :

250 ng dsDNA-Templat

3-10 pmol Primer

$2,0 \mu\text{l}$  Premix (AmpliTaQ FS BigDyeTerminator Kit, PE Applied Biosystems)

Die Parameter des Temperaturcyclings sind:

2 min	$96^\circ\text{C}$	] 25 x
10 s	$96^\circ\text{C}$	
5 s	$50^\circ\text{C}$	
90 s	$60^\circ\text{C}$	

Die amplifizierte DNA wird mit EtOH gefällt und vor der Auftrennung auf dem Sequenziergerät hitzedenaturiert.

### 6.4 Arbeiten mit Proteinen

#### 6.4.1 Vorbereitung der Expressionsüberstände für die Chromatographie-Schritte

Je nach Darstellungsart der rekombinanten Proteine – Schüttelkolben oder Bioreaktor – variiert die Präparation des partikelfreien Überstandes für die Säulenchromatographie. Die Schüttelkolbenexpressionen werden durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 30 min) von Zellpartikeln befreit, sterilfiltriert (im Wasserstrahlvakuum mit einem *bottle top*-Filter, SFAC (*surfactant-free cellulose acetate*)-Membran, 0,2 µm Poren), und direkt aufgetragen. Die Fermentations-Überstände enthalten Zusätze, die den Filter verstopfen. Deshalb wird nach der Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 30 min) eine Hitze-fällung durchgeführt (1 h bei 60°C) und die Lösung mehrere Tage bei 4°C gelagert, dann wieder zentrifugiert (3200 x g, 4°C, 30 min) und erst dann filtriert. Dazu wird entweder ein *bottle top*-Filter oder ein Pellicon XL 50-Gerät (Millipore) für die Tangentialflußfiltration mit Filterkartusche (PLCHK 100, Membran aus regenerierter Zellulose, MWCO 100 kDa) eingesetzt.

Die Proteinkonzentration der Expressionsüberstände kann nur anhand silbergefärbter SDS-PAGE-Gele (6.4.12) abgeschätzt werden, da die grünlich-gelbe Farbe des Überstandes mit allen photometrischen Quantifizierungsmethoden interferiert.

Die sich anschließenden Chromatographieschritte erfolgen an einer präparativen HPLC-Anlage (BioCad, PE Applied Biosystems), für die Gelfiltration wird eine FPLC-Anlage (Amersham Bioscience, Pharmacia) benutzt.

#### 6.4.2 Kationentauscher-Chromatographie

Säule: Kationentauschermaterial POROS 20HS, Bindungskapazität 60 mg/ml, CV = 7,85 ml (Ø10 mm x 100 mm)

Flußrate: Probenauftrag und Elution 10 ml/min, Waschschritte 20 ml/min

Puffer: 50 mM NaPP, pH 4,0, mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl

##### **Wildtyp-Sap-B**

Der Überstand wird 1:1 mit NaCl-freiem NaPP-Puffer verdünnt, der pH kontrolliert und falls nötig mit HCl oder NaOH auf pH 4,0 eingestellt. Die Säule wird ebenfalls mit NaCl-freiem Puffer äquilibriert, die Probe (20 CV, ca. 300 mg Protein, abgeschätzt anhand eines Silbergels mit bekannter Menge an Sap-B) wird aufgetragen, und die Säule wird gewaschen (20 CV). Die Elution erfolgt, mit einem mehrstufigen Salzgradienten, bei dem für jeweils 3 CV folgende NaCl-Konzentrationen gehalten werden: 250, 500, 700, 800, 1000 mM. Die gesammelten Fraktionen haben ebenfalls ein Volumen von 3 CV.

Der Glykosylierungsgrad der eluierten Proteinspezies nimmt mit steigendem Salzgehalt ab; die Fraktion, die bei 250 mM NaCl eluiert, ist fast vollständig glykosyliert, sie wird über Gelfiltration (6.4.5) weiter aufgereinigt. Bei einem Teil der anderen Fraktionen erfolgt eine Trennung der zuckerhaltigen und -freien Spezies über Reversed-Phase-Chromatographie (6.4.4).

##### **Sap-D und unglykosylierte, variante Sap-B**

Vom Überstand werden 3 CV auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 20 CV gewaschen. Die Elution erfolgt in 6 CV Puffer mit 1 M NaCl. Die weitere Aufarbeitung erfolgt über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (6.4.3).

#### 6.4.3 Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Säule: NiNTA-Agarose, Bindungskapazität 5-10 mg/ml, CV = 30 ml (Ø16 mm x 150 mm)

Flußrate: 3 ml/min

Puffer: A = 50 mM NaPP, 300 mM NaCl, pH 7,0

B = 50 mM NaPP, 300 mM NaCl, pH 6,0



C = 50 mM NaPP, 300 mM NaCl, pH 4,0

Der pH des Eluats der Kationenaechromatographie wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Säule wird mit Puffer A äquibriert, 100-300 mg des Proteins (in ca. 6 CV Puffer A) werden aufgetragen, dann wird mit je 4 CV Puffer A und B gewaschen, anschließend wird das Protein in 8 CV Puffer C eluiert.

#### 6.4.4 Reversed-Phase-Chromatographie

Säule: Nucleosil C4, CV = 15 ml (Ø8 mm x 300 mm)

Flußrate: 2 ml/min

Laufmittel: A = H<sub>2</sub>O, 0,1% (v/v) TFA

B = Acetonitril, 0,08 % (v/v) TFA

Die Trennung glykosylierter und unglykosylierter Sap-B-Spezies erfolgt durch Reversed-Phase-Chromatographie. 10 mg des Proteins werden auf die mit 80% A, 20% B äquibrierte Säule geladen und in einem Gradienten von 40 bis 60% B über 14 CV eluiert. Die glykosylierten Formen eluieren zwischen 40-45% B, die unglykosylierte zwischen 43 bis 60% B. Die Proteine werden nach Gefriertrocknung in einem geeigneten Puffer aufgenommen und der unlöslicher Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

#### 6.4.5 Gelfiltration

Säule: Gelfiltrationssäule Superdex HiLoad 16/60, CV = 120 ml (Ø16 mm x 600 mm)

Flußrate: 1 ml/min

Puffer: 25 mM NaAc, 150 mM NaCl, pH 4,0 oder 50 mM NaCit, pH 4,2 (je nach anschließendem Verwendungszweck)

Mit Standardsubstanzen (Blue Dextran, BSA, Carboanhydrase, Cyt c, Aprotinin; MWGF70 Kit for Molecular Weights 6,500-66,000, Sigma) wird in einem Kalibrierungsschritt bestimmt, in welchen Fraktionen man definierte Sap-Monomere, -Oligomere oder Aggregate zu erwarten hat.

Die Proteinprobe wird unter Verwendung eines Zentrifugalkonzentrators (MWCO 5 kDa) in den entsprechenden Puffer (s.o.) überführt und auf 1 ml aufkonzentriert (ca. 1-15 µg/µl). Dann wird sie auf die äquibrierte Säule aufgetragen und mit 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> CV Puffer in 2 ml-Fraktionen eluiert.

#### 6.4.6 Affinitätschromatographie an Concanavalin A

Säule: Concanavalin A-Sepharose, CV = 2 ml (Ø10 mm x 25 mm)

Flußrate: 1 ml/min

Puffer: A = 20 mM Tris, 150 mM NaCl, jeweils 1 mM MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, pH 6,0 (evtl. mit 0,1% (w/v) der Detergenzien NP-40 oder Octylglucosid im Waschschrift)

B = A mit 1 M Methyl-α-D-manno- oder glucopyranosid

Die Probe wird unter Verwendung eines Zentrifugalkonzentrators (MWCO 5 kDa) in Puffer A überführt und aufkonzentriert, dann werden ca. 5 mg in 100µl auf die ebenfalls mit Puffer A äquibrierte Säule aufgetragen. Die Säule wird mit Puffer A für 6 CV gewaschen, dann für 15 CV mit Puffer B eluiert.

#### 6.4.7 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Säule: Phenylsepharose High Performance-, Octyl-, Butylsepharose 4 Fast Flow-Fertigsäulchen (HiTrap HIC Selection Kit, Pharmacia), CV = 1 ml

Flußrate: 1 ml/min

Puffer: A = 10 mM NaCit, 150 mM NaCl, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 4,0

B = 10 mM NaCit, 150 mM NaCl, pH 4,0

Die Säulen werden mit Puffer A äquilibriert und je 4 mg der Sap-B-Probe im gleichen Puffer aufgetragen. Nach dem Waschschrift (6 CV) mit Puffer A erfolgt die Elution mit einem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1-0 M über 5 CV.

### 6.4.8 Proteinquantifizierung

Proteinkonzentrationen werden mittels der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode in 96er Mikrotiterplatten bestimmt (Smith et al., 1985). Dabei reduzieren die Proteine unter den alkalischen Bedingungen des Assays  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ , das einen farbigen Komplex mit BCA bildet. 20  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung werden mit frisch angesetztem 200  $\mu\text{l}$  BCA-Kupfersulfat-Reagenz gemischt, und für 30 min bei 60°C inkubiert. Die Extinktion des Komplexes wird bei 595 nm in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Multiskan Ascent, Labsystems) bestimmt. Daraus wird mit Hilfe einer Eichgeraden (BSA in Konzentrationen von in 0-5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ) die Konzentration berechnet.

### 6.4.9 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung von Sap-B und -D wurden durch die Firma TopLab, Martinsried, mit dem Verfahren des schrittweisen Edman-Abbaus in einer Modifikation von Hunkapillar (Hunkapillar et al., 1983) und dem Proteinsequenzierer Procise 492 (PE Applied Biosystems) durchgeführt.

### 6.4.10 Enzymatische Deglykosylierung

#### 6.4.10.1 Abtrennung des Zuckerbaumes mittels PNGase F oder Endo H

##### *unter nativen Bedingungen*

10  $\mu\text{g}$  des Proteins in einer 25 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung werden mit 500-1000 U PNGase F versetzt und für mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung des Enzyms erfolgt über NiNTA-Spin-Säulchen (Qiagen). Der pH-Wert der Reaktionslösung wird auf 7,0 eingestellt, unter diesen Bedingungen binden die rekombinanten Proteine über ihren Histidin-Tag an das Säulenmaterial. Die Elution erfolgt im Säuren durch einen geeigneten Puffer (meist 50 mM NaCit, pH 4,2).

##### *unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen*

10  $\mu\text{g}$  des Proteins werden für 10 min bei 100°C in Denaturierungspuffer (0,5 %, w/v, SDS, 40  $\mu\text{M}$  DTT) inkubiert.

Für die Deglykosylierung mit PNGase F wird der Reaktionsansatz mit NP-40 (Endkonzentration 1% v/v) versetzt. Der Reaktionsansatz wird in 50 mM NaPP (pH 7,5) nach Zugabe von 500-1000 U PNGase F für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Deglykosylierung mit Endo H findet in 50 mM NaCit (pH 5,5) statt, dazu werden nach dem Denaturierungsschritt 500-1000 U des Enzyms zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 6.4.10.2 Isolierung des Oligosaccharides

Das durch die PNGase F-Reaktion abgetrennte Oligosaccharid wird über eine nicht-poröse, graphitisierte Kohlenstoff-Säule aufgereinigt. Das Säulenvolumen beträgt 0,5 ml.

Die Säule wird mit 10 ml wässrigen Acetonitril (80%, v/v), 0,1% (v/v) TFA gewaschen und mit 10 ml Wasser äquilibriert. Die Probe wird mit Wasser auf 150  $\mu\text{l}$  verdünnt und aufgetragen. Mit weiteren 10 ml Wasser entfernt man störende Salze, die Elution erfolgt mit 2 ml 25%igem (v/v) Acetonitril. Die Probe wird gefriergetrocknet und in 10  $\mu\text{l}$  70%igem (v/v) Acetonitril aufgenommen und kann dann direkt für die MALDI-MS-Messung eingesetzt werden.

### 6.4.11 Matrix-unterstützte Laser Desorption/ Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Alle Spektren wurden unter Verwendung eines *TofSpecE*-Massenspektrometers (Micromass) im positiven Modus bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV mit einem 337 nm Stickstofflaser gemessen.

Jeweils 1 µl der Probe und der Matrixlösung werden zusammen auf einen Probenträger pipettiert, wo sie nach Trocknen bei Raumtemperatur co-kristallisieren. Der Probenträger wird ins Hochvakuum eingebracht und mit einem UV-Laserpuls bestrahlt. Dies führt zur Desorption der Probensubstanz unter Kationenübertragung aus der Matrix. Die nun geladenen Probenteilchen werden im elektrischen Feld beschleunigt und anschließend in der Flugröhre nach Masse/ Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die Detektion erfolgt in einem Flugzeitanalysator. Die Kalibrierung des Gerätes wird extern mit mehreren, für den Massenbereich der Probe geeigneten Protein- oder Polyethylenglykol-Standards durchgeführt. Bei der Vermessung der Proteine dient Sinapinsäure (in 40% (v/v) wäßrigen Acetonitril) als Matrix, bei den Oligosacchariden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (in 70% (v/v) wäßrigen Acetonitril).

### 6.4.12 Elektrophoretische Proteintrennung (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung und Charakterisierung der sauren, relativ kleinen Saps wird eine modifizierte, diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einem Tricin-SDS-Puffersystem gewählt (Schägger und von Jagow, 1987).

Die Proben werden für 5-10 min bei 100°C im Probenpuffer denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt in einer Minigel-Apparatur (MiniProtean, Biorad) bei konstantem Strom von 30 mA (Sammelgel, ca. 1 cm Laufstrecke), der auf 50 mM erhöht wird, wenn die Probe in das Trenngel (ca. 6 cm) eintritt. Die Elektrophorese wird beendet, wenn der blaue Farbstoff des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht. Die Größenbestimmung erfolgt anhand eines Proteinstandards.

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel:

	Sammelgel	Trenngel
Tris, pH 8,45	1 M	1 M
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
Glycerol	-	14% (v/v)
AA-Mix	4% (w/v)	16% (w/v)
TEMED	0,001% (v/v)	0,0002% (v/v)
APS	0,1 (w/v)	0,02 (w/v)

AA-Mix: 40% (w/v) Acrylamid und 1,35% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

### 6.4.13 Anfärbung der Proteine

#### 6.4.13.1 Silberfärbung

Die Proteine werden mit Silber angefärbt (Blum et al., 1987). Nach der Elektrophorese wird das Gel für mindestens eine Stunde in der Fixierlösung (50% (v/v) MeOH, 12% (v/v) AcOH, 0,5 ml/l Formaldehyd, 37% (v/v)) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (3 x 20 min, 50% (v/v) EtOH) wird das Gel mit Natriumthiosulfat (2 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O) behandelt, kurz mit Wasser gewaschen und mit Silberionen imprägniert (0,2% (w/v) AgNO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O, 0,75 ml/l Formaldehyd, 37% (v/v)). Überschüssige Silberionen werden mit Wasser abgewaschen. Das Gel wird in der Entwicklungslösung (60 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

4 mg/l  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 ml/l Formaldehyd, 37% (v/v)) inkubiert, bis die ersten Banden erscheinen. Die Reaktion wird mit der Stopplösung (50% (v/v) MeOH), 12% (v/v) AcOH) beendet. Anschließend wird die Säure entfernt (30% (v/v) MeOH, 3% (v/v) Glycerol) und das Gel zwischen transparenten Cellulose-Filmen getrocknet.

### 6.4.13.2 Färbung mit kolloidaler Coomassie-Lösung

Das Gel wird 40 min in der Fixierlösung (40% (v/v) MeOH, 10% (v/v) AcOH) inkubiert, dann für 2 h mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Banden werden entwickelt (25% (v/v) EtOH, 8% (v/v) AcOH) und die Kontraste durch Entfärbung des Hintergrundes (10% (v/v) AcOH) verstärkt. Die Konservierung der Gele erfolgt analog zur Silberfärbung. **Western-Blot**

Für die immunochemische Detektion der durch SDS-PAGE getrennten Proteine werden diese elektrophoretisch vom Gel auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dort werden sie zuerst von einem primären Antikörper erkannt, den sie binden. Der primäre Antikörper wird seinerseits von einem sekundären Antikörper erkannt, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist und so mittels einer Chemiluminiszenzreaktion (Oxidation von Luminol in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) detektiert werden kann.

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 15 min im Transferpuffer äquilibriert und auf eine methanol-befeuchtete PVDF-Membran gelegt. Das Blotting erfolgt für 1 h bei 250 mA unter Eiskühlung in einer Mini-Blot-Apparatur.

Nach dem Proteintransfer werden noch unbesetzte Stellen der Membran mit Blocklösung (4% (w/v) BSA (Albumin Fraktion V) in PBS-T, Inkubationsroller für 1 h bei 25°C oder 16 h bei 4°C) abgesättigt, dann wird die Membran mit PBS-T gewaschen (3 x 10 min). Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Ziege-anti-Sap-B oder -Sap-D-Antikörper in Serum, 1:500, bzw. 1:1000 verdünnt in PBS-T mit 1% (w/v) BSA) erfolgt für 1 h bei 25°C, dann wird wieder gewaschen (wie oben). Analog erfolgen der Inkubations- und Waschschrift mit dem sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase gekoppelt an Kaninchen-anti-Ziegen-IgG-Antikörper - anti-rabbit-IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody - 1:1000 verdünnt, oder Protein-G-HRP-Konjugat, 1:10.000 verdünnt.). Die Detektion mittels Chemoluminiszenz erfolgt nach Anleitung des Western-Blot-Luminol-Reagenz (Santa Cruz Biotechnology) auf Röntgenfilm.

Die Wiederverwendung des Blot mit anderen Antikörpern ist möglich, indem man die Blotmembran für 2 x 10 min mit „Stripping“-Puffer (0,2 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Tween-20) behandelt, dann 2 x 10 min mit PBS-T wäscht und anschließend erneut entwickelt, beginnend mit dem Block-Schritt.

## 6.5 Arbeiten mit Lipiden

### 6.5.1 Darstellung von Liposomen (MacDonald et al., 1991)

Für die Darstellung von unilamellaren Liposomen (*large unilamellar vesicles*, LUVs) werden die Lipide, die als Stocklösungen in organischen Lösungsmitteln vorliegen, in den gewünschten Mengenverhältnissen gemischt und unter Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. Die Lipide werden je nach Verwendungszweck in unterschiedlichen Puffern in geeigneter Konzentration aufgenommen. Die Suspension wird sechsmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut und zwischendurch gevortext. Danach läßt sich die Suspension bei -20°C für einige Wochen lagern.

Die Liposomen werden jedes Mal frisch angesetzt, indem man die aufgetaute Suspension dreimal für je 20 s mit Ultraschall (200 W, Sonifier 250, Branson) behandelt und dann 19 mal durch eine Polycarbonatmembran (Porengröße 50 oder 100 nm) preßt, die in einen Extruder (LiposoFast, Avanti Polar Lipids) eingespannt ist.

## 6.5.2 Bestimmung des Lipidgehalts der Liposomen

Aliquots der Lipidstammlösung und der Liposomensuspension werden im Stickstoffstrom getrocknet, in 50 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und für 1 min im Ultraschallbad sonifiziert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Chloroform/Methanol/Wasser, 60:25:4, v/v/v) und mit einer wäßrigen Lösung von 8% (w/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und 10% (w/v) CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O bei 180°C für 10 min entwickelt. Die Quantifizierung der Lipide erfolgt in Dreifachbestimmungen mittels Photodensitometrie (Densitometer, Shimadzu) bei 595 nm.

Nur für die am häufigsten eingesetzten Liposomen-Varianten wurde auf diese Weise die tatsächliche Lipidzusammensetzung nach der Präparation bestimmt, die bei den Versuchen dann auch angegeben werden. Für alle anderen Liposomenzusammensetzungen werden die theoretischen Werte gemäß der eingesetzten Lipidstammlösungen angegeben.

## 6.5.3 Ultrastrukturuntersuchungen an Liposomen

Verschiedene Liposomen (0,05-0,5 mM Lipide in NaCit-Puffer pH 4,5) werden mit 16 µM Sap für 5 min bei RT inkubiert. Dann werden die Proben auf ein mit Kohlenstoff bedampftes, beschichtetes Kupfer-Gitter (400er Maschennetz) aufgetragen. Nach ca. 30 s ist die Probe getrocknet und wird mit 1%er wäßriger Uranylacetatlösung nachkontrastiert (Peace, 1964). Dazu werden die Grids mit der Probenseite für 1 min auf kleine Tropfen der Uranylacetatlösung (ca. 15 µl, auf Parafilm pipettiert) gelegt, dann mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Liposomen werden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Philips CM 120) bei 80 kV betrachtet und dabei ihr Durchmesser bestimmt.

## 6.5.4 Mobilisierung von Lipiden aus an Säulenmaterial gebundenen Liposomen

In Pasteurpipetten gefüllte Octylsepharose Fast Flow (CV = 250 µl) wird mit einigen Säulenvolumen PBS äquilibriert. Dann werden 2 CV Liposomen, die [<sup>14</sup>C]-PC oder [<sup>14</sup>C]-Chol enthalten, aufgetragen, 0,5 mM Lipide in PBS, ca. 2.000 cpm/µl). Ab diesem Zeitpunkt wird der Gehalt an radioaktiv markiertem Lipid in jeder eluierenden Fraktionen (1 CV) mit einem Flüssigszintillationsgerät bestimmt. Die Säule wird solange mit PBS und dann mit NaCit-Puffer (50 mM, pH 4,2) gewaschen, bis alle überschüssigen Liposomen entfernt sind, das heißt, bis die Meßwerte der Eluate konstant niedrig sind. Dann werden 4 CV einer 5 µM Proteinlösung, ebenfalls in NaCit-Puffer, aufgetragen und wieder mit NaCit-Puffer bis zu konstanten Meßwerten eluiert. Für eine vollständige Bilanzierung des markierten Lipids werden auch die restlichen Liposomen mit 6 CV Chloroform/Methanol (1:1, v/v) vollständig von der Säule gewaschen. Den Prozentsatz an freigesetztem Lipid wird berechnet, indem die eluierte auf die gebundene Radioaktivitätsmenge bezogen wird, korrigiert um den Anteil, der bereits durch NaCit-Puffer alleine eluiert.

## 6.6 Funktionalitäts-Studien

### 6.6.1 Zellkulturstudien

#### *Metabolische Markierung*

Konfluente, pSap-defiziente Fibroblasten (pSap -/-, „Harzer-Zellen“) werden mit den jeweiligen Saps (25 µg/ml Medium) für 24 h in DMEM, supplementiert mit 0,3% fetalem Kälberserum (FKS), vorinkubiert und dann dreimal mit PBS gewaschen. Die Markierung erfolgt mit [<sup>14</sup>C]-Sulfatid (3 nmol/ml, 24 Ci/mol) in ebenfalls FKS- und Sap-haltigem MEM-Medium für 48 h. Anschließend werden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen, mit 0,25% Trypsin/EDTA geerntet und durch Zentrifugation pelletiert. Die Zellpellets werden zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen, getrocknet und eingefroren.

### *Lipidanalyse*

Die eingefrorenen Zellpellets werden in 1 ml Wasser suspendiert und mittels Ultraschall unter Wasserkühlung homogenisiert (3 x 30 s bei 120 W, dazwischen jeweils 10 s Pause). Aliquots des Homogenats werden zur Protein- und Radioaktivitätsbestimmung eingesetzt.

Die Zellsuspension wird mit 4 ml Methanol versetzt, in einem Vortexer gemischt und 15 min sonifiziert. Durch die Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (10:5:1, v/v/v), werden die Lipide bei 37°C für 24 h unter Schütteln extrahiert. Die unlöslichen Zellreste werden pelletiert, der Überstand abgenommen und durch Filtration über Watte gereinigt. Die restlichen Lipide im Schraubkappenglas werden nach einer 5-minütigen Ultraschallbehandlung mit 2 ml Chloroform/Methanol/Wasser (70:30:3, v/v/v) herausgespült und ebenfalls filtriert. Der Gesamtlipidextrakt wird im Stickstoffstrom eingedampft.

Die Lipide werden in 1 ml Chloroform/Methanol (1:1, v/v) gelöst, anschließend gleiche Mengen an Radioaktivität entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und erneut unter Stickstoff eingedampft. Danach werden die Proben in 40 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und mit feinen Glaskapillaren auf Dünnschichtchromatographie (DC)-Kieselgelplatten oder HPTLC-Platten aufgetragen. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden zuerst mit 25 µl und dann mit 10 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v), nachgespült, die ebenfalls aufgetragen werden. Die DC-Platten werden im Vakuum über Kaliumhydroxid getrocknet.

Große DC-Platten (20x20 cm) werden in konventionellen, mit Filterpapier ausgekleidete Glaskammern chromatographiert. Alle Laufmittel werden zur Äquilibration mindestens 1 h vor Beginn der Chromatographie in den Tank gegeben. HPTLC-Platten werden in einer Horizontalentwicklungskammer bei Kammerfüllung chromatographiert. Vor dem Start werden die HPTLC-Platten 15 min im Laufmittel äquilibriert.

Die Entwicklung erfolgt in Chloroform/Methanol/0,22% CaCl<sub>2</sub> in Wasser (60:35:8, v/v/v). Die Visualisierung von radioaktiven Produkten erfolgte mittels eines Phosphoimagers (Fujix BAS 1000, Raytest).

### **6.6.2 Abbau von Sulfatid durch Arylsulfatase A/ Sap-B im mizellaren oder liposomalen Enzymassay**

Die Arylsulfatase A (ASA) benötigt zur Hydrolyse von Sulfatid zu Galaktosylceramid Sap-B oder ein Detergenz. Für den liposomalen Assay wurde der mizellare Assay (Vogel et al., 1991) leicht modifiziert.

Der Ansatz enthält in einem Endvolumen von 50 µl (mizellarer Assay) bzw. 100 µl (liposomaler Assay)

- 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,2
- mizellarer Assay: 0,5 nmol [<sup>14</sup>C]-Sulfatid (58,6 Ci/mol)
- liposomaler Assay: 0,5 nmol [<sup>14</sup>C]-Sulfatid (58,6 Ci/mol) als Bestandteil von Liposomen (5 nmol an Dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholin/Cholesterol/Sulfatid, 80:10:10 mol%)
- 0,33 nmol Sap-B, oder als Positivkontrolle 100 nm Taurodeoxycholat
- 30 mU = 0,5 nkat (mit Nitrochatecholsulfat als Substrat) ASA

Alle Reagenzien werden auf Eis zusammengegeben und gründlich vermischt. Der jeweilige Ansatz wird für 2 h bei 37°C inkubiert, dann wird die Reaktion durch die Zugabe von 1 ml Chloroform/Methanol (1:1, v/v) beendet.

Die Lösung wird unter Stickstoff eingedampft, anschließend in 40 µl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Die Lipide werden in Chloroform/Methanol/0,22% CaCl<sub>2</sub> (60:35:8, v/v/v) entwickelt. Die Visualisierung erfolgt mittels eines Phosphoimagers (Fujix BAS 1000, Raytest), die Quantifizierung mit der Software TINA (Raytest).

### 6.6.3 Abbau von Ceramid durch saure Ceramidase/ Sap-D im liposomale Enzymassay

#### *Reaktionsansatz und Aufarbeitung*

Der Reaktionsansatz enthält folgende Reagenzien in einem Endvolumen von 100  $\mu$ l

- 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,2 oder 7,0
- Liposomen, 1 mM Lipidgesamtkonzentration (Zugabe von 40  $\mu$ l der Suspension, 2,5 mM in 2 mM Tris, pH 7,0)
- ruSap-D wie bei den einzelnen Versuchen angegeben
- 3  $\mu$ g rekombinante, gereinigte saure Ceramidase

Alle Reagenzien werden auf Eis zusammengegeben, gründlich vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Versuche erfolgen als Doppelbestimmung mit Negativkontrollen (ohne Aktivator und Enzym, bzw. nur mit Enzym). Die Aktivität der verwendeten sauren rekombinanten Ceramidase wurde vorher in einem analogen mizellaren Assay quantifiziert (Bernardo et al., 1995) und beträgt ca. 250-300 nmol/(mg x h). Das eingesetzte Substrat war in allen Fällen das in der Acylkette verkürzte C18/12-Ceramid.

Die Reaktion wird mit 800  $\mu$ l Chloroform/ Methanol (2:1, v/v) und 200  $\mu$ l Ammoniumhydrogencarbonat (100 mM) abgestoppt. Um die spätere Quantifizierung des Reaktionsproduktes C18-Sphingosin zu ermöglichen, werden als interne Standards je 500 pmol C14- und C16-Sphinganin (gelöst in Ethanol) zugesetzt. Die Proben werden für 10 min bei 25°C geschüttelt, dann für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die untere Chloroformphase, die das abgespaltene Sphingosin und die internen Standards enthält, wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für eine quantitative Ausbeute des Reaktionsproduktes wird die Extraktion mit 600  $\mu$ l Chloroform/ Methanol (2:1, v/v) wiederholt. Die vereinten organischen Phasen werden unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft. Danach werden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

#### *Derivatisierung*

Die eingedampften, organischen Phasen werden in 50  $\mu$ l Ethanol gelöst und für 10 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Die abgekühlten Proben werden mit 10  $\mu$ l des Derivatisierungsreagenz, frisch angesetzt aus aus 500  $\mu$ l O-Phthaldialdehydlösung (OPA reagent solution incomplete; Sigma; enthält 1 mg OPA/ml) und 3  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethenol, versetzt und 10 min bei 25°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des HPLC-Laufmittels (90% Acetonitril, 10% einer 2 mM wäßrigen Lösung von  $K_3PO_4$ ) beendet.

#### *Quantifizierung der Sphingoidbasen mittels HPLC*

Die derivatisierten Sphingoidbasen (Produkt der Ceramidspaltung und interne Standards) werden mit einer Shimadzu LC-10 AT Pumpe einer über eine RP18-Säule (Purosphere™ RP18-e column, 125 x 4 mm, Merck) bei einer Flußrate von 1 ml/min getrennt, Laufmittel ist 90% Acetonitril, 10% 2 mM  $K_3PO_4$  in  $H_2O$ . Die Detektion der Substanzen erfolgt über ihre Fluoreszenz bei 455 nm (Anregung bei 330 nm, Shimadzu RF-10 AX Fluoreszenz-Detektor). Die Menge an umgesetztem Substrat in nmol oder  $\mu$ mol / [Zeit(h) x Enzym(mg)] wird mittels der internen Standards aus den Peakintegralen bestimmt und um die Negativkontrolle (weder Enzym noch Aktivator) korrigiert.

## 6.7 Biophysikalische Methoden

### 6.7.1 Dynamische Lichtstreuung, DLS

Das DLS-Gerät (ALV-NIBS/HPPS High sensitivity version, ALV-GmbH, jetzt Malvern Instruments) mißt bei 633 nm (Helium-Neon-Laser) mit automatisch angepaßter Leistung und detektiert bei einem Winkel von 172°. Dies ermöglicht eine kurze Wegstrecke des Meßlichts durch die Lösung, um Mehrfachstreuung und Artefakte durch Verunreinigungen zu

minimieren. Die Zuverlässigkeit der Daten wurde durch die Vermessung von Latexkugeln bekannter Größe und Mehrfachmessungen kontrolliert. Der Meßbereich des Gerätes liegt bei 0,6-6000 nm oder 1-1000 kDa.

In einer UV-Küvette (1,5 ml) wird die Liposomensuspension (0,5 mM Lipidgesamt-konzentration in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5) vorgelegt und vermessen, dann die Proteinlösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Protein-Endkonzentration beträgt zwischen 0,5 und 50 µM in 300 µl Küvetteninhalt. Die Messungen im DLS-Gerät erfolgen bei 25°C, für jeweils 30-60 s über einen Zeitraum von 30 min.

Die Proteinproben wurden (16 µM in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,5) ebenfalls für 30-60 s bei 25 vermessen.

Die Datenauswertung erfolgte mit der Gerätesoftware, in der Darstellung ist die normierte Massen-Verteilung gezeigt, die gegen den (logarithmischen dargestellten) Radius aufgetragen wurde.

### 6.7.2 Plasmonresonanzspektroskopie, SPR

#### 6.7.2.1 Wechselwirkung von immobilisiertem Sap-D mit Saurer Ceramidase

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von ruSap-D mit der sauren Ceramidase wird das Sap über einen Linker kovalent an einen CM5-Chip gebunden. Die kovalente Immobilisierung (*ligand thiol coupling*) und die Kontrollexperimente werden entsprechend den Angaben des Biacore-Handbuchs durchgeführt.

Die Derivatisierung des Saps erfolgt durch die Reaktion mit SATA (N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat), das bevorzugt am N-Terminus des Proteins geschützte Thiolgruppen einführt. Dazu wird ruSap-D (ca. 150 µg) im Mengenverhältnis 1:20 mit SATA versetzt (in 500 µl 0,1 M NaPP, 0,15 M NaCl, pH 7,2) und 30 min bei RT inkubiert. In einem Zentrifugalkonzentrator (500 µl, MWCO 5 kDa) wird das Protein vom Reagenz getrennt und wieder in 500 µl Puffer (0,5 mM, 25 mM EDTA in 0,1 M NaPP, 0,15 M NaCl, pH 7,2) aufgenommen. Die Entschützung (Deacylierung) der Thiolgruppe erfolgt durch Zugabe von 50 µl Hydroxylamin, Inkubation für 2 h bei RT und erneuter Pufferwechsel über einen Zentrifugalkonzentrator in den Immobilisierungspuffer (10 mM NaCit, 1 mM EDTA, pH 3,8). Durch sukzessive Injektion (mit einer Flußrate von 5 µl/min) der folgenden Reagenzien über einen CM5-Chip im Biacore-Gerät werden erst die Carboxylgruppen auf der Chipoberfläche aktiviert, reaktive Disulfide eingeführt und dann das derivatisierte ruSap-D gekoppelt, anschließend werden ungenutzte reaktive Disulfide deaktiviert:

- 10 µl 50 mM NHS (N-hydroxysulfosuccinimid)/ 200 mM EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid) in Wasser
- 20 µl 80 mM PDEA (2-(2-pyridinyl-dithio)-ethanamin) in 0,1 mM Boratpuffer, pH 8,5
- 0 µg (Zelle 1, Negativkontrolle), 0,875 µg (injiziert als 25 µg/ml-Lösung; Zelle 2), 5,0 µg (als 400 µg/ml-Lösung; Zelle 3) und 130 µg (400 µg/ml-Lösung; Zelle 4) ruSap-D-SH in 10 mM NaCit, 1 mM EDTA, pH 3,8
- 20 µl 50 mM L-Cystein in 100 mM NaAc, 1 M NaCl, pH 4,0

Die gebundene Proteinmenge, die Stabilität der Oberflächenbeladung bei Überleitung des Meßpuffers (50 mM NaCit, 200 mM NaCl, pH 4,2) und die Regeneration (1 M NaCl, dann 0,01 M HEPES, 150 mM NaCl, 3 nM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20) nach Injektion von BSA oder rekombinanter Saurer Ceramidase werden untersucht.

#### 6.7.2.2 Interaktion der Saps mit immobilisierten Liposomen

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem BiaCore 3000 Gerät (Biacore) mit einem Pioneer-L1-Sensorchip (Biacore) durchgeführt. Zur Beladung wird eine Liposomensuspension, 0,5 mM Lipide in PBS-Puffer, verwendet. Davon werden 60 µl mit einer Flußrate von 5 µl/min injiziert, dann wird mit 10 µl NaOH (25 mM) gewaschen und noch einmal 20 µl der Liposomensuspension zugegeben, um alle Bindungsstellen vollständig



abzusättigen. Zuletzt wird zur Entfernung unspezifisch gebundener Liposomen ein zweites mal gewaschen, diesmal mit 10  $\mu$ l NaOH (50 mM) und einer erhöhten Flußrate von 100  $\mu$ l/min.

Nach dem Wechsel zum Meßpuffer wird solange gespült, bis die Grundlinie stabil bleibt, dann wird der erreichte RU-Wert auf Null gesetzt, bevor das Protein, ebenfalls in Meßpuffer, injiziert wird. In der Assoziationsphase werden 60  $\mu$ l der Proteinlösung mit einer Flußrate von 20  $\mu$ l/min (d.h. für 180 s) über den Chip geleitet, dann wird für 220 s mit der gleichen Flußrate reiner Puffer injiziert (Dissoziationsphase).

Die Regeneration des Sensorchips erfolgt durch die Injektion von CHAPS (20 mM, 40  $\mu$ l, 20  $\mu$ l/min) und NaOH (50 mM, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l/min).

## 7 Anhang

### 7.1 Primer

Klonierung von Sap-B

*forward* 5'-A AAA CTG CAG GAA TTC GGG GAC GTT TGC CAG GA-3'  
Pst I, EcoR I

*invers* 5'-CCG GGA TCC GAA TTC CTA ATG ATG ATG ATG CAC CTC ATC  
ACA GAA CCC-3'  
BamH I, EcoR I, *kursiv*: Basen, die für den Tetrahistidintag und das Stopcodon codieren

Klonierung der Sap-B-Varianten

*forward* 5'-GCG CGG GAA TTC TAC GTA GGG GAC GTT TGC CAG GA-3'  
SnaB I

*invers* 5'-GCG CGG TCT AGA CCT AGG CTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG  
CAC CTC ATC ACA GAA CCC-3'  
Avr II, *kursiv*: Basen, die für den Hexahistidintag und das Stopcodon codieren

Klonierung von Sap-D

*forward* 5'-ACG CGT CGA CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GGC TTC  
TGC GAA GTG TGC A-3'  
Xho I, *kursiv*: rekonstituierte Signalsequenz

*invers* 5'-CGG AAT TCT CAG GTG GTG GTG GTG GTG GTG CGA GGG GCA  
GGC TCC AAT-3'  
EcoR I, *kursiv*: Basen, die für den Hexahistidintag und das Stopcodon codieren

Sequenzierung der Vektoren (AOX-Primer)

3'AOX 1 5'-GGC AAA TGG CAT TCT GAC ATC C-3'  
5'AOX 1 5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'

### 7.2 cDNA und Aminosäure-Sequenz des humanen Prosaposins

1	<b>ATG</b> TAC GCC CTC TTC CTC CTG GCC AGC CTC CTG GGC GCG GCT CTA GCC	48
1	<b>Met</b> Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala	16
49	GGC CCG GTC CTT GGA CTG AAA GAA TGC ACC AGG GGC TCG GCA GTG TGG	96
17	Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp	32
97	TGC CAG AAT GTG AAG ACG GCG TCC GAC TGC GGG GCA GTG AAG CAC TGC	144
33	Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys	48
	<b>Sap-A</b> →	
145	CTG CAG ACC GTT TGG AAC AAG CCA ACA GTG AAA <b>TCC CTT CCC TGC GAC</b>	192
49	Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys <b>Ser Leu Pro Cys Asp</b>	64
193	<b>ATA TGC AAA GAC GTT GTC ACC GCA GCT GGT GAT ATG CTG AAG GAC AAT</b>	240
65	<b>Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">Asn</span>	80

241	GCC	ACT	GAG	GAG	GAG	ATC	CTT	GTT	TAC	TTG	GAG	AAG	ACC	TGT	GAC	TGG	288
81	Ala	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Glu	Lys	Thr	<b>Cys</b>	Asp	Trp	96
289	CTT	CCG	AAA	CCG	AAC	ATG	TCT	GCT	TCA	TGC	AAG	GAG	ATA	GTG	GAC	TCC	336
97	Leu	Pro	Lys	Pro	<u>Asn</u>	Met	Ser	Ala	Ser	<b>Cys</b>	Lys	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	112
337	TAC	CTC	CCT	GTC	ATC	CTG	GAC	ATC	ATT	AAA	GGA	GAA	ATG	AGC	CGT	CCT	384
113	Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro	128
385	GGG	GAG	GTG	TGC	TCT	GCT	CTC	AAC	CTC	TGC	GAG	TCT	CTC	CAG	AAG	CAC	432
129	Gly	Glu	Val	<b>Cys</b>	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	<b>Cys</b>	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His	144
433	CTA	GCA	GAG	CTG	AAT	CAC	CAG	AAG	CAG	CTG	GAG	TCC	AAT	AAG	ATC	CCA	480
145	Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	160
481	GAG	CTG	GAC	ATG	ACT	GAG	GTG	GTG	GCC	CCC	TTC	ATG	GCC	AAC	ATC	CCT	528
161	Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro	176
529	CTC	CTC	CTC	TAC	CCT	CAG	GAC	GGC	CCC	CGC	AGC	AAG	CCC	CAG	CCA	AAG	576
177	Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	192
				Sap-B	→												
577	GAT	AAT	GGG	GAC	GTT	TGC	CAG	GAC	TGC	ATT	CAG	ATG	GTG	ACT	GAC	ATC	624
193	Asp	Asn	<b>Gly</b>	<b>Asp</b>	Val	<b>Cys</b>	Gln	<b>Asp</b>	<b>Cys</b>	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile	208
625	CAG	ACT	GCT	GTA	CGG	ACC	AAC	TCC	ACC	TTT	GTC	CAG	GCC	TTG	GTG	GAA	672
209	Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	<u>Asn</u>	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	224
673	CAT	GTC	AAG	GAG	GAG	TGT	GAC	CGC	CTG	GGC	CCT	GGC	ATG	GCC	GAC	ATA	720
225	His	Val	Lys	Glu	Glu	<b>Cys</b>	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile	240
721	TGC	AAG	AAC	TAT	ATC	AGC	CAG	TAT	TCT	GAA	ATT	GCT	ATC	CAG	ATG	ATG	768
241	<b>Cys</b>	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ser	Gln	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Met	Met	256
769	ATG	CAC	ATG	<u>CAG</u>	<u>GAT</u>	<u>CAG</u>	CAA	CCC	AAG	GAG	ATC	TGT	GCG	CTG	GTT	GGG	816
257	Met	His	Met	<u>Gln</u>	<u>Asp</u>	<u>Gln</u>	Gln	Pro	Lys	Glu	Ile	<b>Cys</b>	Ala	Leu	Val	Gly	272
817	TTC	TGT	GAT	GAG	GTG	AAA	GAG	ATG	CCC	ATG	CAG	ACT	CTG	GTC	CCC	GCC	864
273	Phe	<b>Cys</b>	Asp	Glu	Val	Lys	Glu	Met	Pro	Met	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala	288
865	AAA	GTG	GCC	TCC	AAG	AAT	GTC	ATC	CCT	GCC	CTG	GAA	CTG	GTG	GAG	CCC	912
289	Lys	Val	Ala	Ser	Lys	Asn	Val	Ile	Pro	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	304
				Sap-C	→												
913	ATT	AAG	AAG	CAC	GAG	GTC	CCA	GCA	AAG	TCT	GAT	GTT	TAC	TGT	GAG	GTG	960
305	Ile	Lys	Lys	His	Glu	Val	Pro	Ala	Lys	<b>Ser</b>	<b>Asp</b>	<b>Val</b>	<b>Tyr</b>	<b>Cys</b>	Glu	Val	320
961	TGT	GAA	TTC	CTG	GTG	AAG	GAG	GTG	ACC	AAG	CTG	ATT	GAC	AAC	<u>AAC</u>	AAG	1008
321	<b>Cys</b>	Glu	Phe	Leu	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Asp	Asn	<u>Asn</u>	Lys	336
1009	ACT	GAG	AAA	GAA	ATA	CTC	GAC	GCT	TTT	GAC	AAA	ATG	TGC	TCG	AAG	CTG	1056
337	Thr	Glu	Lys	Glu	Ile	Leu	Asp	Ala	Phe	Asp	Lys	Met	<b>Cys</b>	Ser	Lys	Leu	352
1057	CCG	AAG	TCC	CTG	TCG	GAA	GAG	TGC	CAG	GAG	GTG	GTG	GAC	ACG	TAC	GGC	1104
353	Pro	Lys	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	<b>Cys</b>	Gln	Glu	Val	Val	Asp	Thr	Tyr	Gly	368
1105	AGC	TCC	ATC	CTG	TCC	ATC	CTG	CTG	GAG	GAG	GTC	AGC	CCT	GAG	CTG	GTG	1152
369	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Ser	Pro	Glu	Leu	Val	384
1153	TGC	AGC	ATG	CTG	CAC	CTC	TGC	TCT	GGC	ACG	CGG	CTG	CCT	GCA	CTG	ACC	1200
385	<b>Cys</b>	Ser	Met	Leu	His	Leu	<b>Cys</b>	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	400
				Sap-D	→												
1201	GTT	CAC	GTG	ACT	CAG	CCA	AAG	GAC	GGT	GGC	TTC	TGC	GAA	GTG	TGC	AAG	1248
401	Val	His	Val	Thr	Gln	Pro	Lys	Asp	Gly	<b>Gly</b>	Phe	<b>Cys</b>	Glu	Val	<b>Cys</b>	Lys	416

## Anhang

1249	<b>AAG CTG GTG GGT TAT TTG GAT CGC AAC CTG GAG AAA AAC AGC ACC AAG</b>	1296
417	<b>Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys <u>Asn</u> Ser Thr Lys</b>	423
1297	<b>CAG GAG ATC CTG GCT GCT CTT GAG AAA GGC TGC AGC TTC CTG CCA GAC</b>	1344
433	<b>Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly <b>Cys</b> Ser Phe Leu Pro Asp</b>	448
1345	<b>CCT TAC CAG AAG CAG TGT GAT CAG TTT GTG GCA GAG TAC GAG CCC GTG</b>	1392
449	<b>Pro Tyr Gln Lys Gln <b>Cys</b> Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val</b>	464
1392	<b>CTG ATC GAG ATC CTG GTG GAG GTG ATG GAT CCT TCC TTC GTG TGC TTG</b>	1440
465	<b>Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val <b>Cys</b> Leu</b>	480
1441	<b>AAA ATT GGC GCC TGC CCC TCG GCC CAT AAG CCC TTG TTG GGA ACT GAG</b>	1488
481	<b>Lys Ile Gly Ala <b>Cys</b> Pro Ser</b> Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu	496
1489	AAG TGT ATA TGG GGC CCA AGC TAC TGG TGC CAG AAC ACA GAG ACA GCA	1536
497	Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala	512
1537	GCC CAG TGC AAT GCT GTC GAG CAT TGC AAA CGC CAT GTG TGG AAC <b>TAG</b>	1584
513	Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn *	518
1585	GAG GAG GAA TAT TCC ATC TTG GCA GAA ACC ACA GCA TTG GTT TTT TTC	1632
1633	TAC TTG TGT GTC TGG GGG AAT GAA CGC ACA GAT CTG TTT GAC TTT GTT	1680
1681	ATA AAA ATA GGG CTC CCC CAC CTC CCC CAT TTC TGT GTC CTT TAT TGT	1728
1729	AGC ATT GCT GTC TGC AAG GGA GCC CCT AGC CCC TGG CAG ACA TAG CTG	1776
1777	CTT CAG TGC CCC TTT TCT CTC TGC TAG ATG GAT GTT GAT GCA CTG GAG	1824
1825	GTC TTT TAG CCT GCC CTT GCA TGG CGC CTG CTG GAG GAG AGA GCT	1872
1873	CTG CTG GCA TGA GCC ACA GTT TCT TGA CTG GAG GCC ATC AAC CCT CTT	1920
1921	GGT TGA GGC CTT GTT CTG AGC CCT GAC ATG TGC TTG GGC ACT GGT GGG	1968
1969	CCT GGG CTT CTG AGG TGG CCT CCT GCC CTG ATC AGG GAC CCT CCC CGC	2016
2017	TTC CCT GGG CCT CTC AGT TGA ACA AAG CAG CAA AAC AAA GGC AGT TTT	2064
2065	ATA TGA AAG ATT AGA AGC CTG GAA TAA TCA GGC TTT TTA AAT GAT GTA	2112
2113	ATT CCC ACT GTA ATA GCA TAG GGA TTT TGG AAG CAG CTG CTG GTG GCT	2160
2161	TGG GAC ATC AGT GGG GCC AAG GGT TCT CTG TCC CTG GTT CAA CTG TGA	2208
2209	TTT GGC TTT CCC GTG TCT TTC CTG GTG ATG CCT TGT TTG GGG TTC TGT	2256
2257	GGG TTT GGG TGG GAA GAG GGC CAT CTG CCT GAA TGT AAC CTG CTA GCT	2304
2305	CTC GCA AGG CCC TGC GGG CCT GGC TTG TGT GAG CGT GTG GAC AGT GGT	2352
2353	GGC CGC GCT GTG CCT GCT CGT GTT GCC TAC ATG TCC CTG GCT GTT GAG	2400
2401	GCG CTG CTT CAG CCT GCA CCC CTC CCT TGT CTC ATA GAT GCT CCT TTT	2448
2449	GAC CTT TTC AAA TCC CTC TGG ATG GCG AGC TCC TAG GCC TCT GGC TTC	2496
2497	CTG GTA GAG GGC GGC ATG CCG AAG GGT CTG CTG GGT GTG GAT TGG ATG	2544
2545	CTG GGG TGT GGG GGT TGG AAG CTG TCT GTG GCC CAC TTG GGC ACC CAC	2592
2593	GCT TCT GTC CAC TTC TGG TTG CCA GGA GAC AGC AAG CAA AGC CAG CAG	2640
2641	GAC ATG AAG TTG CAT TTA AAT GGA CTT CGT GAT TTT TGT TTT GCA CTA	2688
2689	AAG TTT CTG TGA TTT AAC AAT AAA ATT CTG TTA GAA AG	

Die Signalsequenz und die vier Sap-Domänen (A,B,C,D) sind fettgedruckt. Das Startcodon (ATG) und das Stoppcodon (TAG) sind grau hinterlegt, Cysteine sind rot dargestellt, die Asparagine potentieller Glycosylierungsstellen umrandet. Splicevarianten: die bei der 9er-Variante zusätzlichen 9 Basen von Exon 8 sind unterstrichen, die 6er-Variante besitzt davon nur die letzten 6 Basen, die 0er-Variante hat kein zusätzlichen Basen.

Die Sequenzen von Wildtyp Sap-B und Sap-D enthalten zusätzliche C- und/ oder N-terminale Aminosäuren, die den MALDI-Spektren zu entnehmen sind (s. Abb. 3-11, Abb. 3-13 und 7.3); die varianten Formen von Sap-B unterscheiden sich wie folgt

rvSap-B N215H (Patient): A643C

rvSap-B N215Q: A643C, C645G

### 7.3 MALDI-Spektren

Vergleich der theoretischen und gemessenen Massen (M) in Da; kursiv dargestellt sind alternative Zuordnungen.

zu Abb. 3-11

	M theor.	M gem.
[ValGluPhe-Sap-B-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	9892	9892
[TyrValGluPhe-Sap-B-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	10057	10055
[GluAla-TyrValGluPhe-Sap-B-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	10257	10255
[GluAlaGluAla-TyrValGluPhe-Sap-B-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	10457	10458

zu Abb. 3-12

	M theor.	M gem.
[Man <sub>7</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	1581,53	1582,43
[Man <sub>8</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	1743,58	1744,46
[Man <sub>9</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	1905,63	1905,51
[Man <sub>10</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2067,69	2068,51
[Man <sub>11</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2229,74	2230,60
[Man <sub>12</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2391,80	2392,56
[Man <sub>13</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2553,85	2554,61
[Man <sub>14</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2715,90	2716,67
[Man <sub>15</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	2877,95	2878,47
[Man <sub>16</sub> (GlcNAc) <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	3040,00	3040,41

zu Abb. 3-13

	M theor.	M gem.
[Sap-D-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	9290	9285
[Sap-D-His <sub>5</sub> +H] <sup>+</sup>	9427	9429
[Sap-D-His <sub>6</sub> +H] <sup>+</sup>	9564	9562

	M theor.	M gem.
<i>[GluAlaGluAla-Sap-D-His<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup></i>	9553	9562
[GluAlaGluAla-Sap-D-His <sub>4</sub> +H] <sup>+</sup>	9690	9697
[GluAlaGluAla-Sap-D-His <sub>5</sub> +H] <sup>+</sup>	9827	9834
[GluAlaGluAla-Sap-D-His <sub>6</sub> +H] <sup>+</sup>	9965	9961



## 8 Literatur

- Ahn, V. E., Faull, K. F., Whitelegge, J. P., Fluharty, A. L., and Prive, G. G. (2003) Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 38-43
- Ahn, V. E., Leyko, P., Alattia, J. R., Chen, L., and Prive, G. G. (2006) Crystal structures of saposins A and C. *Protein Sci* **15**, 1849-1857
- Alattia, J. R., Shaw, J. E., Yip, C. M., and Prive, G. G. (2006) Direct visualization of saposin remodelling of lipid bilayers. *J Mol Biol* **362**, 943-953
- Amidon, B., Brown, A., and Waite, M. (1996) Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemistry* **35**, 13995-14002
- Anderluh, G., Besenicar, M., Kladnik, A., Lakey, J. H., and Macek, P. (2005) Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Anal Biochem* **344**, 43-52
- Ardhammar, M., Lincoln, P., and Norden, B. (2002) Invisible liposomes: refractive index matching with sucrose enables flow dichroism assessment of peptide orientation in lipid vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15313-15317
- Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., and Hauser, H. (1988) Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* **68**, 213-219
- Azuma, N., O'Brien, J. S., Moser, H. W., and Kishimoto, Y. (1994) Stimulation of acid ceramidase activity by saposin D. *Arch Biochem Biophys* **311**, 354-357
- Babalola, J. O., Wendeler, M., Breiden, B., Arenz, C., Schwarzmann, G., Locatelli-Hoops, S., and Sandhoff, K. (2007) Development of an assay for the Intermembrane Transfer of Cholesterol by Niemann-Pick C2 Protein. *in press*
- Baird, C. L., Courtenay, E. S., and Myszka, D. G. (2002) Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Anal Biochem* **310**, 93-99
- Becker, D. M., and Guarente, L. (1991) High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* **194**, 182-187
- Berent, S. L., and Radin, N. S. (1981) Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochim Biophys Acta* **664**, 572-582
- Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H., and Sandhoff, K. (1995) Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem* **270**, 11098-11102
- Berne, B. J., and Pecora, R. (2000) *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, unabridged (August 2000) Ed., Dover Publications Inc., Mineola, NY
- Bieberich, E., and Yu, R. K. (1999) Multi-enzyme kinetic analysis of glycolipid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1432**, 113-124
- Bierfreund, U., Lemm, T., Hoffmann, A., Uhlhorn-Dierks, G., Childs, R. A., Yuen, C. T., Feizi, T., and Sandhoff, K. (1999) Recombinant GM2-activator protein stimulates in vivo degradation of GA2 in GM2 gangliosidosis AB variant fibroblasts but exhibits no detectable binding of GA2 in an in vitro assay. *Neurochem Res* **24**, 295-300
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99

- Bosio, A., Binczek, E., und Stoffel, W. (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13280-13285
- Bradová, V., Šmíd, F., Ulrich-Bott, B., Roggendorf, W., Paton, B. C., und Harzer, K. (1993) Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet* **92**, 143-152
- Brigl, M., und Brenner, M. B. (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **22**, 817-890
- Brotherus, J., und Renkonen, O. (1977) Subcellular distributions of lipids in cultured BHK cells: evidence for the enrichment of lysobisphosphatidic acid and neutral lipids in lysosomes. *J Lipid Res* **18**, 191-202
- Brown, D. A., und London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-136
- Brown, D. A., und London, E. (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **275**, 17221-17224
- Bruhn, H. (2005) A short guided tour through functional and structural features of saposin-like proteins. *Biochem J* **389**, 249-257
- Burkhardt, J. K., Hüttler, S., Klein, A., Möbius, W., Habermann, A., Griffiths, G., und Sandhoff, K. (1997) Accumulation of sphingolipids in SAP-precursor (prosaposin)-deficient fibroblasts occurs as intralysosomal membrane structures and can be completely reversed by treatment with human SAP-precursor. *Eur J Cell Biol* **73**, 10-18
- Campana, W. M., Darin, S. J., und O'Brien, J. S. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase mediate IGF-I- and prosaptide-induced survival in Schwann cells. *J Neurosci Res* **57**, 332-341
- Campana, W. M., Eskeland, N., Calcutt, N. A., Misasi, R., Myers, R. R., und O'Brien, J. S. (1998a) Prosaptide prevents paclitaxel neurotoxicity. *Neurotoxicology* **19**, 237-244
- Campana, W. M., Hiraiwa, M., Addison, K. C., und O'Brien, J. S. (1996) Induction of MAPK phosphorylation by prosaposin and prosaptide in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 706-712
- Campana, W. M., Hiraiwa, M., und O'Brien, J. S. (1998b) Prosaptide activates the MAPK pathway by a G-protein-dependent mechanism essential for enhanced sulfatide synthesis by Schwann cells. *Faseb J* **12**, 307-314
- Campana, W. M., Mohiuddin, L., Misasi, R., O'Brien, J. S., und Calcutt, N. A. (2000) Prosaposin-derived peptides enhanced sprouting of sensory neurons in vitro and induced sprouting at motor endplates in vivo. *J Peripher Nerv Syst* **5**, 126-130
- Cereghino, G. P., Sunga, A. J., Cereghino, L. J., und Cregg, J. M. (2001) Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Eng (N Y)* **23**, 157-169
- Cereghino, J. L., und Cregg, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 45-66
- Chain, E., und Kemp, I. (1934) The isoelectric points of lecithin and sphingomyelin. *Biochem J* **28**, 2052-2055
- Chalfant, C. E., und Spiegel, S. (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* **118**, 4605-4612
- Chang, M. H., Bindloss, C. A., Grabowski, G. A., Qi, X., Winchester, B., Hopwood, J. J., und Meikle, P. J. (2000) Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin Chem* **46**, 167-174



- Chen, B., Rigat, B., Curry, C., und Mahuran, D. J. (1999) Structure of the GM2A gene: identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-frame deletion of exon 2. *Am J Hum Genet* **65**, 77-87
- Chen, H. M., Clayton, A. H., Wang, W., und Sawyer, W. H. (2001) Kinetics of membrane lysis by custom lytic peptides and peptide orientations in membrane. *Eur J Biochem* **268**, 1659-1669
- Cheng, Z. J., Singh, R. D., Marks, D. L., und Pagano, R. E. (2006) Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. *Mol Membr Biol* **23**, 101-110
- Chester, M. A. (1997) Nomenclature of glycolipids. *Pure and Applied Chemistry* **69**, 2475-2487
- Christomanou, H., Aignesberger, A., und Linke, R. P. (1986) Immunochemical characterization of two activator proteins stimulating enzymic sphingomyelin degradation in vitro. Absence of one of them in a human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe Seyler* **367**, 879-890
- Christomanou, H., Chabas, A., Pampols, T., und Guardiola, A. (1989) Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr* **67**, 999-1003
- Chu, Z., Witte, D. P., und Qi, X. (2005) Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp Cell Res* **303**, 300-307
- Ciaffoni, F., Salvioli, R., Tatti, M., Arancia, G., Crateri, P., und Vaccaro, A. M. (2001) Saposin D solubilizes anionic phospholipid-containing membranes. *J Biol Chem* **276**, 31583-31589
- Ciaffoni, F., Tatti, M., Boe, A., Salvioli, R., Fluharty, A., Sonnino, S., und Vaccaro, A. M. (2006) Saposin B binds and transfers phospholipids. *J Lipid Res* **47**, 1045-1053
- Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., und Vaccaro, A. M. (2003) Interaction of saposin D with membranes: effect of anionic phospholipids and sphingolipids. *Biochem J* **373**, 785-792
- Clarke, C. J., Snook, C. F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., und Hannun, Y. A. (2006) The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* **45**, 11247-11256
- Cochrane, C. G., und Revak, S. D. (1991) Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. *Science* **254**, 566-568
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., und Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* **86**, 209-219
- Coffey, J. W., und De Duve, C. (1968) Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **243**, 3255-3263
- Conzelmann, E., Burg, J., Stephan, G., und Sandhoff, K. (1982) Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM2. *Eur J Biochem* **123**, 455-464
- Conzelmann, E., und Sandhoff, K. (1979) Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **360**, 1837-1849
- Conzelmann, E., und Sandhoff, K. (1983) Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* **6**, 58-71
- Conzelmann, E., und Sandhoff, K. (1987) Activator proteins for lysosomal glycolipid hydrolysis. *Methods Enzymol* **138**, 792-815
- Cooper, M. A. (2004) Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit* **17**, 286-315
- Cooper, M. A., Hansson, A., Löfås, S., und Williams, D. H. (2000) A Vesicle Capture Sensor Chip for Kinetic Analysis of Interactions with Membrane-Bound Receptors. *Analytical Biochemistry* **277**, 196-205

- Cooper, M. A., Try, A. C., Carroll, J., Ellar, D. J., und Williams, D. H. (1998) Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* **1373**, 101-111
- Cregg, J. M., Madden, K. R., Barringer, K. J., Thill, G. P., und Stillman, C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **9**, 1316-1323
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., und Raschke, W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* **11**, 905-910
- Dawkins, J. L., Hulme, D. J., Brahmabhatt, S. B., Auer-Grumbach, M., und Nicholson, G. A. (2001) Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet* **27**, 309-312
- de Alba, E., Weiler, S., und Tjandra, N. (2003) Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **42**, 14729-14740
- De Rosa, M. F., Sillence, D., Ackerley, C., und Lingwood, C. (2004) Role of multiple drug resistance protein 1 in neutral but not acidic glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 7867-7876
- Diaz-Font, A., Cormand, B., Santamaria, R., Vilageliu, L., Grinberg, D., und Chabas, A. (2005) A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. *Hum Genet* **117**, 275-277
- Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L. V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., und von Figura, K. (2003) Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* **113**, 435-444
- Doering, T., Holleran, W. M., Potratz, A., Vielhaber, G., Elias, P. M., Suzuki, K., und Sandhoff, K. (1999) Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem* **274**, 11038-11045
- Duchemin, A. M., Ren, Q., Mo, L., Neff, N. H., und Hadjiconstantinou, M. (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. *J Neurochem* **81**, 696-707
- Eckford, P. D., und Sharom, F. J. (2005) The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J* **389**, 517-526
- Elleder, M., Jerabkova, M., Befekadu, A., Hrebicek, M., Berna, L., Ledvinova, J., Hulkova, H., Rosewich, H., Schymik, N., Paton, B. C., und Harzer, K. (2005) Prosaposin deficiency -- a rarely diagnosed, rapidly progressing, neonatal neurovisceral lipid storage disease. Report of a further patient. *Neuropediatrics* **36**, 171-180
- Eskelinen, E. L., Tanaka, Y., und Saftig, P. (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* **13**, 137-145
- Faull, K. F., Johnson, J., Kim, M. J., To, T., Whitelegge, J. P., Stevens, R. L., Fluharty, C. B., und Fluharty, A. L. (2000) Structure of the asparagine-linked sugar chains of porcine kidney and human urine cerebroside sulfate activator protein. *J Mass Spectrom* **35**, 1416-1424
- Fingerhut, R., van der Horst, G. T., Verheijen, F. W., und Conzelmann, E. (1992) Degradation of gangliosides by the lysosomal sialidase requires an activator protein. *Eur J Biochem* **208**, 623-629
- Fischer, G., und Jatzkewitz, H. (1975) The activator of cerebroside sulphatase. Purification from human liver and identification as a protein. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **356**, 605-613
- Fischer, G., und Jatzkewitz, H. (1977) The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein. *Biochim Biophys Acta* **481**, 561-572

- Fischer, G., und Jatzkewitz, H. (1978) Studies on the function of the activator of sulphatase A. *Adv Exp Med Biol* **101**, 573-582
- Fluharty, A. L., Katona, Z., Meek, W. E., Frei, K., und Fowler, A. V. (1992) The cerebroside sulfate activator from pig kidney: purification and molecular structure. *Biochem Med Metab Biol* **47**, 66-85
- Fluharty, A. L., Lombardo, C., Louis, A., Stevens, R. L., Whitelegge, J., Waring, A. J., To, T., Fluharty, C. B., und Faull, K. F. (1999) Preparation of the cerebroside sulfate activator (CSAct or saposin B) from human urine. *Mol Genet Metab* **68**, 391-403
- Fujibayashi, S., Kao, F. T., Jones, C., Morse, H., Law, M., und Wenger, D. A. (1985) Assignment of the gene for human sphingolipid activator protein-2 (SAP-2) to chromosome 10. *Am J Hum Genet* **37**, 741-748
- Fujibayashi, S., und Wenger, D. A. (1986) Synthesis and processing of sphingolipid activator protein-2 (SAP-2) in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* **261**, 15339-15343
- Fujita, N., Suzuki, K., Vanier, M. T., Popko, B., Maeda, N., Klein, A., Henseler, M., Sandhoff, K., und Nakayasu, H. (1996) Targeted disruption of the mouse sphingolipid activator protein gene: a complex phenotype, including severe leukodystrophy and wide-spread storage of multiple sphingolipids. *Hum Mol Genet* **5**, 711-725
- Fürst, W., Machleidt, W., und Sandhoff, K. (1988) The precursor of sulfatide activator protein is processed to three different proteins. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**, 317-328
- Fürst, W., und Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta* **1126**, 1-16
- Gärtner, S., Conzelmann, E., und Sandhoff, K. (1983) Activator protein for the degradation of globotriaosylceramide by human alpha-galactosidase. *J Biol Chem* **258**, 12378-12385
- Gemmill, T. R., und Trimble, R. B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 227-237
- Giehl, A., Lemm, T., Bartelsen, O., Sandhoff, K., und Blume, A. (1999) Interaction of the GM2-activator protein with phospholipid-ganglioside bilayer membranes and with monolayers at the air-water interface. *Eur J Biochem* **261**, 650-658
- Gieselmann, V. (2005) What can cell biology tell us about heterogeneity in lysosomal storage diseases? *Acta Paediatr Suppl* **94**, 80-86
- Gillard, B. K., Clement, R. G., und Marcus, D. M. (1998) Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**, 885-890
- Gopalakrishnan, M. M., Grosch, H. W., Locatelli-Hoops, S., Werth, N., Smolenova, E., Nettersheim, M., Sandhoff, K., und Hasilik, A. (2004) Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *Biochem J* **383**, 507-515
- Gutsmann, T., Riekens, B., Bruhn, H., Wiese, A., Seydel, U., und Leippe, M. (2003) Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* **42**, 9804-9812
- Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* **50**, 733-764
- Hakomori, S. (2004) Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J* **21**, 125-137
- Hanada, E., und Suzuki, K. (1979) Activation of human brain galactosylceramidase by phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta* **575**, 410-420
- Hanada, K. (2005) Sphingolipids in infectious diseases. *Jpn J Infect Dis* **58**, 131-148
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., und Nishijima, M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809

- Hancock, J. F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 456-462
- Harzer, K., Hiraiwa, M., und Paton, B. C. (2001) Saposins (sap) A and C activate the degradation of galactosylsphingosine. *FEBS Lett* **508**, 107-110
- Harzer, K., Paton, B. C., Poulos, A., Kustermann-Kuhn, B., Roggendorf, W., Grisar, T., und Popp, M. (1989) Sphingolipid activator protein deficiency in a 16-week-old atypical Gaucher disease patient and his fetal sibling: biochemical signs of combined sphingolipidoses. *Eur J Pediatr* **149**, 31-39
- Hazkani-Covo, E., Altman, N., Horowitz, M., und Graur, D. (2002) The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem- duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J Mol Evol* **54**, 30-34
- Heerklotz, H., Szadkowska, H., Anderson, T., und Seelig, J. (2003) The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. *J Mol Biol* **329**, 793-799
- Henseler, M. (1993), Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Henseler, M., Klein, A., Glombitza, G. J., Suzuki, K., und Sandhoff, K. (1996a) Expression of the three alternative forms of the sphingolipid activator protein precursor in baby hamster kidney cells and functional assays in a cell culture system. *J Biol Chem* **271**, 8416-8423.
- Henseler, M., Klein, A., Reber, M., Vanier, M. T., Landrieu, P., und Sandhoff, K. (1996b) Analysis of a splice-site mutation in the sap-precursor gene of a patient with metachromatic leukodystrophy. *Am J Hum Genet* **58**, 65-74.
- Hepbildikler, S. T., Sandhoff, R., Kölzer, M., Proia, R. L., und Sandhoff, K. (2002) Physiological substrates for human lysosomal beta -hexosaminidase S. *J Biol Chem* **277**, 2562-2572
- Herbst, R., Marciano-Cabral, F., und Leippe, M. (2004) Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J Biol Chem* **279**, 25955-25958
- Hermann, A. (1997), Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Hiesberger, T., Hüttler, S., Rohlmann, A., Schneider, W., Sandhoff, K., und Herz, J. (1998) Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Embo J* **17**, 4617-4625
- Higgins, D. R., und Cregg, J. M. (1998) *Pichia Protocols*. Methods in Molecular Biology (Higgins, D. R., und Cregg, J. M., Eds.), 103, Humana Press, Totowa, NJ
- Hineno, T., Sano, A., Kondoh, K., Ueno, S., Kakimoto, Y., und Yoshida, K. (1991) Secretion of sphingolipid hydrolase activator precursor, prosaposin. *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 668-674
- Hiraiwa, M., Campana, W. M., Mizisin, A. P., Mohiuddin, L., und O'Brien, J. S. (1999) Prosaposin: a myelinotrophic protein that promotes expression of myelin constituents and is secreted after nerve injury. *Glia* **26**, 353-360
- Hiraiwa, M., Soeda, S., Kishimoto, Y., und O'Brien, J. S. (1992) Binding and transport of gangliosides by prosaposin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11254-11258
- Hiraiwa, M., Soeda, S., Martin, B. M., Fluharty, A. L., Hirabayashi, Y., O'Brien, J. S., und Kishimoto, Y. (1993) The effect of carbohydrate removal on stability and activity of saposin B. *Arch Biochem Biophys* **303**, 326-331
- Hiraiwa, M., Taylor, E. M., Campana, W. M., Darin, S. J., und O'Brien, J. S. (1997) Cell death prevention, mitogen-activated protein kinase stimulation, and increased sulfatide concentrations in Schwann cells and oligodendrocytes by prosaposin and prosaptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4778-4781
- Ho, M. W., und O'Brien, J. S. (1971) Gaucher's disease: deficiency of 'acid' -glucosidase and reconstitution of enzyme activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2810-2813

- Holleran, W. M., Takagi, Y., Menon, G. K., Jackson, S. M., Lee, J. M., Feingold, K. R., and Elias, P. M. (1994) Permeability barrier requirements regulate epidermal beta-glucocerebrosidase. *J Lipid Res* **35**, 905-912
- Holleran, W. M., Takagi, Y., and Uchida, Y. (2006) Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* **580**, 5456-5466
- Holtschmidt, H., Sandhoff, K., Kwon, H. Y., Harzer, K., Nakano, T., and Suzuki, K. (1991) Sulfatide activator protein. Alternative splicing that generates three mRNAs and a newly found mutation responsible for a clinical disease. *J Biol Chem* **266**, 7556-7560.
- Homola, J., Yee, S. S., and Gauglitz, G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **54**, 3-15
- Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., and Taniguchi, N. (2002) Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4227-4232
- Hulkova, H., Cervenkova, M., Ledvinova, J., Tochackova, M., Hrebicek, M., Poupetova, H., Befekadu, A., Berna, L., Paton, B. C., Harzer, K., Boor, A., Smid, F., and Elleder, M. (2001) A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation. *Hum Mol Genet* **10**, 927-940
- Hunkapiller, M. W., Hewick, R. M., Dreyer, W. J., and Hood, L. E. (1983) High-sensitivity sequencing with a gas-phase sequenator. *Methods Enzymol* **91**, 399-413
- Inokuchi, J., Kabayama, K., Uemura, S., and Igarashi, Y. (2004) Glycosphingolipids govern gene expression. *Glycoconj J* **20**, 169-178
- Inui, K., Kao, F. T., Fujibayashi, S., Jones, C., Morse, H. G., Law, M. L., and Wenger, D. A. (1985) The gene coding for a sphingolipid activator protein, SAP-1, is on human chromosome 10. *Hum Genet* **69**, 197-200
- Inui, K., and Wenger, D. A. (1983) Concentrations of an activator protein for sphingolipid hydrolysis in liver and brain samples from patients with lysosomal storage diseases. *J Clin Invest* **72**, 1622-1628
- Ito, K., Takahashi, N., Takahashi, A., Shimada, I., Arata, Y., O'Brien, J. S., and Kishimoto, Y. (1993) Structural study of the oligosaccharide moieties of sphingolipid activator proteins, saposins A, C and D obtained from the spleen of a Gaucher patient. *Eur J Biochem* **215**, 171-179
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4569-4574
- Jatzkewitz, H. (1978) Existence, localization and some properties of the activators of sphingolipid hydrolases. *Adv Exp Med Biol* **101**, 561-571
- Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N., van Meer, G., and Wieland, F. (1992) Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* **117**, 259-267
- John, M., Wendeler, M., Heller, M., Sandhoff, K., and Kessler, H. (2006) Characterization of human saposins by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 5206-5216
- Kang, S. J., and Cresswell, P. (2004) Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* **5**, 175-181
- Kao, F. T., Law, M. L., Hartz, J., Jones, C., Zhang, X. L., Dewji, N., O'Brien, J. S., and Wenger, D. A. (1987) Regional localization of the gene coding for sphingolipid activator protein SAP-1 on human chromosome 10. *Somat Cell Mol Genet* **13**, 685-688

- Kawai, H., Allende, M. L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J. N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K., und Proia, R. L. (2001) Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem* **276**, 6885-6888
- Kawai, H., Sango, K., Mullin, K. A., und Proia, R. L. (1998) Embryonic stem cells with a disrupted GD3 synthase gene undergo neuronal differentiation in the absence of b-series gangliosides. *J Biol Chem* **273**, 19634-19638
- Kishimoto, Y., Hiraiwa, M., und O'Brien, J. S. (1992) Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res* **33**, 1255-1267
- Kiss, R. S., Ma, Z., Nakada-Tsukui, K., Brugnera, E., Vassiliou, G., McBride, H. M., Ravichandran, K. S., und Marcel, Y. L. (2006) The LRP adapter protein GULP mediates trafficking of the LRP ligand prosaposin, leading to sphingolipid and free cholesterol accumulation in late endosomes and impaired efflux. *J. Biol. Chem.* **281**, 12081-12092
- Klein, A., Henseler, M., Klein, C., Suzuki, K., Harzer, K., und Sandhoff, K. (1994) Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 1440-1448
- Kleinschmidt, T., Christomanou, H., und Braunitzer, G. (1987) Complete amino-acid sequence and carbohydrate content of the naturally occurring glucosylceramide activator protein (A1 activator) absent from a new human Gaucher disease variant. *Biol Chem Hoppe Seyler* **368**, 1571-1578
- Klingenstein, R. (2002), Dissertation, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., und Gruenberg, J. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197
- Kolter, T., Magin, T. M., und Sandhoff, K. (2000) Biomolecule function: no reliable prediction from cell culture. *Traffic* **1**, 803-804
- Kolter, T., Proia, R. L., und Sandhoff, K. (2002) Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 25859-25862
- Kolter, T., und Sandhoff, K. (1998) Enzymology of Lysosomal Glycolipid Catabolism. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **10**, 455-468
- Kolter, T., und Sandhoff, K. (1999) Sphingolipids - Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 1532-1568
- Kolter, T., und Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 81-103
- Kolter, T., und Sandhoff, K. (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2057-2079
- Kolter, T., Winau, F., Schaible, U. E., Leippe, M., und Sandhoff, K. (2005) Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J Biol Chem* **280**, 41125-41128
- Kölzer, M., Ferlinz, K., Bartelsen, O., Hoops, S. L., Lang, F., und Sandhoff, K. (2004a) Functional characterization of the postulated intramolecular sphingolipid activator protein domain of human acid sphingomyelinase. *Biol Chem* **385**, 1193-1195
- Kölzer, M., Werth, N., und Sandhoff, K. (2004b) Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS Lett* **559**, 96-98
- Kondoh, K., Hineno, T., Sano, A., und Kakimoto, Y. (1991) Isolation and characterization of prosaposin from human milk. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 286-292

- Koochekpour, S., Sartor, O., Hiraiwa, M., Lee, T. J., Rayford, W., Rimmel, N., Sandhoff, K., Minokadeh, A., und Patten, D. Y. (2005) Saposin C stimulates growth and invasion, activates p42/44 and SAPK/JNK signaling pathways of MAPK and upregulates uPA/uPAR expression in prostate cancer and stromal cells. *Asian J Androl* **7**, 147-158
- Koochekpour, S., Sartor, O., Lee, T. J., Zieske, A., Patten, D. Y., Hiraiwa, M., Sandhoff, K., Rimmel, N., und Minokadeh, A. (2004) Prosaptide TX14A stimulates growth, migration, and invasion and activates the Raf-MEK-ERK-RSK-Elk-1 signaling pathway in prostate cancer cells. *Prostate* **61**, 114-123
- Kotani, Y., Matsuda, S., Wen, T. C., Sakanaka, M., Tanaka, J., Maeda, N., Kondoh, K., Ueno, S., und Sano, A. (1996) A hydrophilic peptide comprising 18 amino acid residues of the prosaposin sequence has neurotrophic activity in vitro and in vivo. *J Neurochem* **66**, 2197-2200
- Kretschmann, E., und Raether, H. (1968) Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. *Zeitschrift für Naturforschung, Teil A: Astrophysik, Physik und Physikalische Chemie* **23**, 2135-2136
- Kretz, K. A., Carson, G. S., Morimoto, S., Kishimoto, Y., Fluharty, A. L., und O'Brien, J. S. (1990) Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2541-2544
- Kronenberg, M. (2004) Presenting fats with SAPs. *Nat Immunol* **5**, 126-127
- Kusumi, A., Koyama-Honda, I., und Suzuki, K. (2004) Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic* **5**, 213-230
- Lamontagne, S., und Potier, M. (1994) Modulation of human saposin B sphingolipid-binding specificity by alternative splicing. A study with saposin B-derived synthetic peptides. *J Biol Chem* **269**, 20528-20532
- Lannert, H., Bunning, C., Jeckel, D., und Wieland, F. T. (1994) Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett* **342**, 91-96
- Lapchak, P. A., Araujo, D. M., Shackelford, D. A., und Zivin, J. A. (2000) Prosaptide exacerbates ischemia-induced behavioral deficits in vivo; an effect that does not involve mitogen-activated protein kinase activation. *Neuroscience* **101**, 811-814
- Laurent-Matha, V., Lucas, A., Hüttler, S., Sandhoff, K., Garcia, M., und Rochefort, H. (2002) Procathepsin D interacts with prosaposin in cancer cells but its internalization is not mediated by LDL receptor-related protein. *Exp Cell Res* **277**, 210-219
- Ledeen, R. W., und Yu, R. K. (1982) Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol* **83**, 139-191
- Lee, T. J., Sartor, O., Luftig, R. B., und Koochekpour, S. (2004) Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer* **3**, 31
- Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M., und Morales, C. R. (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J* **22**, 6430-6437
- Leonova, T., Qi, X., Bencosme, A., Ponce, E., Sun, Y., und Grabowski, G. A. (1996) Proteolytic processing patterns of prosaposin in insect and mammalian cells. *J Biol Chem* **271**, 17312-17320
- Li, S. C., Kihara, H., Serizawa, S., Li, Y. T., Fluharty, A. L., Mayes, J. S., und Shapiro, L. J. (1985) Activator protein required for the enzymatic hydrolysis of cerebroside sulfate. Deficiency in urine of patients affected with cerebroside sulfatase activator deficiency and identity with activators for the enzymatic hydrolysis of GM1 ganglioside and globotriaosylceramide. *J Biol Chem* **260**, 1867-1871

- Li, S. C., Sonnino, S., Tettamanti, G., und Li, Y. T. (1988) Characterization of a nonspecific activator protein for the enzymatic hydrolysis of glycolipids. *J Biol Chem* **263**, 6588-6591
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M., und Otting, G. (1997) Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat Struct Biol* **4**, 793-795
- Lineweaver, H., und Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658-666
- Lingwood, C. A., Boyd, B., und Nutikka, A. (2000) Analysis of interactions between glycosphingolipids and microbial toxins. *Methods Enzymol* **312**, 459-473
- Linke, T., Wilkening, G., Lansmann, S., Moczall, H., Bartelsen, O., Weisgerber, J., und Sandhoff, K. (2001a) Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem* **382**, 283-290
- Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Moczall, H., Bernardo, K., Schuchman, E., und Sandhoff, K. (2001b) Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J Biol Chem* **276**, 5760-5768
- Liu, A., Wenzel, N., und Qi, X. (2005) Role of lysine residues in membrane anchoring of saposin C. *Arch Biochem Biophys* **443**, 101-112
- Liu, Y., Li, R., und Ladisch, S. (2004) Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J Biol Chem* **279**, 36481-36489
- Locatelli-Hoops, S. (2006), Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Locatelli-Hoops, S., Rimmel, N., Klingenstein, R., Breiden, B., Rossocha, M., Schoeniger, M., Koenigs, C., Saenger, W., und Sandhoff, K. (2006) Saposin A Mobilizes Lipids from Low Cholesterol and High Bis(monoacylglycerol)phosphate-containing Membranes: Patient variant saposin A lacks lipid extraction capacity. *J Biol Chem* **281**, 32451-32460
- Löfås, S. (1995) Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance. *Pure and Applied Chemistry* **67**, 829-834
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., und Harvey, L. M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249-270
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., und Hu, L. R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta* **1061**, 297-303
- Maceyka, M., Milstien, S., und Spiegel, S. (2005) Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 15-22
- Matsuda, J., Kido, M., Tadano-Aritomi, K., Ishizuka, I., Tominaga, K., Toida, K., Takeda, E., Suzuki, K., und Kuroda, Y. (2004) Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse. *Hum Mol Genet* **13**, 2709-2723
- Matsuda, J., Vanier, M. T., Saito, Y., Tohyama, J., und Suzuki, K. (2001) A mutation in the saposin A domain of the sphingolipid activator protein (prosaposin) gene results in a late-onset, chronic form of globoid cell leukodystrophy in the mouse. *Hum Mol Genet* **10**, 1191-1199
- Matsuo, H., Chevaller, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F., und Gruenberg, J. (2004) Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-534
- Matsuzawa, Y., und Hostetler, K. Y. (1979) Degradation of bis(monoacylglycerol)phosphate by an acid phosphodiesterase in rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **254**, 5997-6001



- Maxfield, F. R., und McGraw, T. E. (2004) Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 121-132
- Maxfield, F. R., und Yamashiro, D. J. (1987) Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* **225**, 189-198
- Mehl, E., und Jatzkewitz, H. (1964) [A cerebroside-sulfatase from swine kidney]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **339**, 260-276
- Meier, E. M., Schwarzmann, G., Furst, W., und Sandhoff, K. (1991) The human GM2 activator protein. A substrate specific cofactor of beta-hexosaminidase A. *J Biol Chem* **266**, 1879-1887
- Mellman, I., Fuchs, R., und Helenius, A. (1986) Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700
- Merrill, A. H., Jr. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* **277**, 25843-25846
- Miernyk, J. A., und Johnston, M. L. (2006) Chemical cross-linking immobilized concanavalin A for use in proteomic analyses. *Prep Biochem Biotechnol* **36**, 203-214
- Miljan, E. A., Meuillet, E. J., Mania-Farnell, B., George, D., Yamamoto, H., Simon, H. G., und Bremer, E. G. (2002) Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* **277**, 10108-10113
- Millat, G., Verot, L., Rodriguez-Lafrasse, C., DiMarco, J., Rimet, Y., Poujol, A., Girard, N., Monges, G., Livet, M., und Vanier, M. (2003) in *Book of Abstracts, 14th ESGLD Workshop, Prague* (Elleder, M., Ledinová, J., Hrebicek, M., Pouprtová, H., und Kozich, V., eds), pp. 81
- Misasi, R., Garofalo, T., Di Marzio, L., Mattei, V., Gizzi, C., Hiraiwa, M., Pavan, A., Grazia Cifone, M., und Sorice, M. (2004) Prosaposin: a new player in cell death prevention of U937 monocytic cells. *Exp Cell Res* **298**, 38-47
- Misasi, R., Sorice, M., Carson, G. S., Griggi, T., Lenti, L., Pontieri, G. M., und O'Brien, J. S. (1996) Prosaposin and prosaptide, a peptide from prosaposin, induce an increase in ganglioside content on NS20Y neuroblastoma cells. *Glycoconj J* **13**, 195-202
- Misasi, R., Sorice, M., Di Marzio, L., Campana, W. M., Molinari, S., Cifone, M. G., Pavan, A., Pontieri, G. M., und O'Brien, J. S. (2001) Prosaposin treatment induces PC12 entry in the S phase of the cell cycle and prevents apoptosis: activation of ERKs and sphingosine kinase. *Faseb J* **15**, 467-474
- Mitsuyama, T., Gasa, S., Nojima, T., Taniguchi, N., und Makita, A. (1985) Purification and properties of galactosylceramide sulfatase activator from human liver. *J Biochem (Tokyo)* **98**, 605-613
- Möbius, W., Herzog, V., Sandhoff, K., und Schwarzmann, G. (1999a) Gangliosides are transported from the plasma membrane to intralysosomal membranes as revealed by immuno-electron microscopy. *Biosci Rep* **19**, 307-316
- Möbius, W., Herzog, V., Sandhoff, K., und Schwarzmann, G. (1999b) Intracellular distribution of a biotin-labeled ganglioside, GM1, by immunoelectron microscopy after endocytosis in fibroblasts. *J Histochem Cytochem* **47**, 1005-1014
- Möbius, W., van Donselaar, E., Ohno-Iwashita, Y., Shimada, Y., Heijnen, H. F., Slot, J. W., und Geuze, H. J. (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* **4**, 222-231
- Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., und Cremata, J. A. (1998) Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* **14**, 197-207
- Morales, C. R., und Badran, H. (2003) Prosaposin ablation inactivates the MAPK and Akt signaling pathways and interferes with the development of the prostate gland. *Asian J Androl* **5**, 57-63

- Morales, C. R., Zhao, Q., El-Alfy, M., und Suzuki, K. (2000a) Targeted disruption of the mouse prosaposin gene affects the development of the prostate gland and other male reproductive organs. *J Androl* **21**, 765-775
- Morales, C. R., Zhao, Q., Lefrancois, S., und Ham, D. (2000b) Role of prosaposin in the male reproductive system: effect of prosaposin inactivation on the testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles. *Arch Androl* **44**, 173-186
- Morimoto, S., Martin, B. M., Kishimoto, Y., und O'Brien, J. S. (1988) Saposin D: a sphingomyelinase activator. *Biochem Biophys Res Commun* **156**, 403-410
- Morimoto, S., Martin, B. M., Yamamoto, Y., Kretz, K. A., O'Brien, J. S., und Kishimoto, Y. (1989) Saposin A: second cerebroside activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3389-3393
- Morimoto, S., Yamamoto, Y., O'Brien, J. S., und Kishimoto, Y. (1990) Distribution of saposin proteins (sphingolipid activator proteins) in lysosomal storage and other diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 3493-3497
- Munford, R. S., Sheppard, P. O., und O'Hara, P. J. (1995) Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J Lipid Res* **36**, 1653-1663
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-388
- Nakano, T., Sandhoff, K., Stumper, J., Christomanou, H., und Suzuki, K. (1989) Structure of full-length cDNA coding for sulfatide activator, a Co-beta-glucosidase and two other homologous proteins: two alternate forms of the sulfatide activator. *J Biochem (Tokyo)* **105**, 152-154
- Nettersheim, M. (2001), Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Norris, A. J., Whitelegge, J. P., Yaghoubian, A., Alattia, J. R., Prive, G. G., Toyokuni, T., Sun, H., Brooks, M. N., Panza, L., Matto, P., Compostella, F., Rimmel, N., Klingenstein, R., Sandhoff, K., Fluharty, C., Fluharty, A., und Faull, K. F. (2005) A novel mass spectrometric assay for the cerebroside sulfate activator protein (saposin B) and arylsulfatase A. *J Lipid Res* **46**, 2254-2264
- O'Brien, J. S., Carson, G. S., Seo, H. C., Hiraiwa, M., und Kishimoto, Y. (1994) Identification of prosaposin as a neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9593-9596
- O'Brien, J. S., Kretz, K. A., Dewji, N., Wenger, D. A., Esch, F., und Fluharty, A. L. (1988) Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus. *Science* **241**, 1098-1101
- Ordal, M. A., Long, L. L., Bell, R. J., Bell, S. E., Bell, R. R., Alexander, J., R. W., und Ward, C. A. (1983) Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. *Applied Optics* **22**, 1099-1119
- Pagano, R. E. (2003) Endocytic trafficking of glycosphingolipids in sphingolipid storage diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 885-891
- Patterson, M. C. (2003) A riddle wrapped in a mystery: understanding Niemann-Pick disease, type C. *Neurologist* **9**, 301-310
- Peace, D. C. (1964) *Histological techniques for electron microscopy*, 2nd Ed., Academic Press, New York-London
- Pohlentz, G., Klein, D., Schwarzmann, G., Schmitz, D., und Sandhoff, K. (1988) Both GA2, GM2, and GD2 synthases and GM1b, GD1a, and GT1b synthases are single enzymes in Golgi vesicles from rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7044-7048
- Ponting, C. P. (1994) Acid sphingomyelinase possesses a domain homologous to its activator proteins: saposins B and D. *Protein Sci* **3**, 359-361
- Posse de Chaves, E. I. (2006) Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1995-2015
- Qi, X., und Chu, Z. (2004) Fusogenic domain and lysines in saposin C. *Arch Biochem Biophys* **424**, 210-218

- Qi, X., und Grabowski, G. A. (1998) Acid beta-glucosidase: intrinsic fluorescence and conformational changes induced by phospholipids and saposin C. *Biochemistry* **37**, 11544-11554
- Qi, X., Leonova, T., und Grabowski, G. A. (1994) Functional human saposins expressed in *Escherichia coli*. Evidence for binding and activation properties of saposins C with acid beta-glucosidase. *J Biol Chem* **269**, 16746-16753
- Qi, X., Qin, W., Sun, Y., Kondoh, K., und Grabowski, G. A. (1996) Functional organization of saposin C. Definition of the neurotrophic and acid beta-glucosidase activation regions. *J Biol Chem* **271**, 6874-6880
- Rafi, M. A., de Gala, G., Zhang, X. L., und Wenger, D. A. (1993) Mutational analysis in a patient with a variant form of Gaucher disease caused by SAP-2 deficiency. *Somat Cell Mol Genet* **19**, 1-7
- Rafi, M. A., Zhang, X. L., DeGala, G., und Wenger, D. A. (1990) Detection of a point mutation in sphingolipid activator protein-1 mRNA in patients with a variant form of metachromatic leukodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* **166**, 1017-1023
- Rawat, S. S., Johnson, B. T., und Puri, A. (2005) Sphingolipids: modulators of HIV-1 infection and pathogenesis. *Biosci Rep* **25**, 329-343
- Regis, S., Filocamo, M., Corsolini, F., Caroli, F., Keulemans, J. L., van Diggelen, O. P., und Gatti, R. (1999) An Asn > Lys substitution in saposin B involving a conserved amino acidic residue and leading to the loss of the single N-glycosylation site in a patient with metachromatic leukodystrophy and normal arylsulphatase A activity. *Eur J Hum Genet* **7**, 125-130
- Rommel, N. (1996), Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
- Rende, M., Brizi, E., Donato, R., Provenzano, C., Bruno, R., Mizisin, A. P., Garrett, R. S., Calcutt, N. A., Campana, W. M., und O'Brien, J. S. (2001) Prosaposin is immunolocalized to muscle and prosaptides promote myoblast fusion and attenuate loss of muscle mass after nerve injury. *Muscle Nerve* **24**, 799-808
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., und Tettamanti, G. (1997) The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* **36**, 153-195
- Rorman, E. G., Scheinker, V., und Grabowski, G. A. (1992) Structure and evolution of the human prosaposin chromosomal gene. *Genomics* **13**, 312-318
- Sadeghlar, F., Rommel, N., Breiden, B., Klingenstein, R., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (2003) Physiological relevance of sphingolipid activator proteins in cultured human fibroblasts. *Biochimie* **85**, 439-448
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491
- Salamon, Z., Macleod, H. A., und Tollin, G. (1997a) Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles. *Biochim Biophys Acta* **1331**, 117-129
- Salamon, Z., Macleod, H. A., und Tollin, G. (1997b) Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems. *Biochim Biophys Acta* **1331**, 131-152
- Salvioli, R., Tatti, M., Ciaffoni, F., und Vaccaro, A. M. (2000) Further studies on the reconstitution of glucosylceramidase activity by Sap C and anionic phospholipids. *FEBS Lett* **472**, 17-21
- Salvioli, R., Tatti, M., Scarpa, S., Moavero, S. M., Ciaffoni, F., Felicetti, F., Kaneski, C. R., Brady, R. O., und Vaccaro, A. M. (2005) The N370S (Asn370-->Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C. *Biochem J* **390**, 95-103

- Sandhoff, K., und Kolter, T. (1996) Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol* **6**, 98-103
- Sandhoff, K., Kolter, T., und Harzer, K. (2001) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., und Valle, D., eds) Vol. 3, 8th Ed., pp. 3371-3388, McGraw-Hill, New York
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
- Sano, A., Hineno, T., Mizuno, T., Kondoh, K., Ueno, S., Kakimoto, Y., und Inui, K. (1989) Sphingolipid hydrolase activator proteins and their precursors. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 1191-1197
- Sano, A., Matsuda, S., Wen, T. C., Kotani, Y., Kondoh, K., Ueno, S., Kakimoto, Y., Yoshimura, H., und Sakanaka, M. (1994) Protection by prosaposin against ischemia-induced learning disability and neuronal loss. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 994-1000
- Sano, A., Mizuno, T., Kondoh, K., Hineno, T., Ueno, S., Kakimoto, Y., und Morita, N. (1992) Saposin-C from bovine spleen; complete amino acid sequence and relation between the structure and its biological activity. *Biochim Biophys Acta* **1120**, 75-80
- Sano, A., und Radin, N. S. (1988) The carbohydrate moiety of the activator protein for glucosylceramide beta-glucosidase. *Biochem Biophys Res Commun* **154**, 1197-1203
- Schägger, H., und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379
- Schätzel, K. (1987) Correlation techniques in dynamic light scattering. *Applied Physics B: Lasers and Optics* **V42**, 193-213
- Schepers, U., Glombitza, G., Lemm, T., Hoffmann, A., Chabas, A., Ozand, P., und Sandhoff, K. (1996) Molecular analysis of a GM2-activator deficiency in two patients with GM2-gangliosidosis AB variant. *Am J Hum Genet* **59**, 1048-1056
- Schlote, W., Harzer, K., Christomanou, H., Paton, B. C., Kustermann-Kuhn, B., Schmid, B., Seeger, J., Beudt, U., Schuster, I., und Langenbeck, U. (1991) Sphingolipid activator protein 1 deficiency in metachromatic leucodystrophy with normal arylsulphatase A activity. A clinical, morphological, biochemical, and immunological study. *Eur J Pediatr* **150**, 584-591
- Schnabel, D., Schröder, M., Fürst, W., Klein, A., Hurwitz, R., Zenk, T., Weber, J., Harzer, K., Paton, B. C., Poulos, A., und et al. (1992) Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene. *J Biol Chem* **267**, 3312-3315
- Schnabel, D., Schröder, M., und Sandhoff, K. (1991) Mutation in the sphingolipid activator protein 2 in a patient with a variant of Gaucher disease. *FEBS Lett* **284**, 57-59
- Schröder, M., Schnabel, D., Hurwitz, R., Young, E., Suzuki, K., und Sandhoff, K. (1993) Molecular genetics of GM2-gangliosidosis AB variant: a novel mutation and expression in BHK cells. *Hum Genet* **92**, 437-440
- Schröder, M., Schnabel, D., Suzuki, K., und Sandhoff, K. (1991) A mutation in the gene of a glycolipid-binding protein (GM2 activator) that causes GM2-gangliosidosis variant AB. *FEBS Lett* **290**, 1-3
- Schueler, U. H., Kolter, T., Kaneski, C. R., Blusztajn, J. K., Herkenham, M., Sandhoff, K., und Brady, R. O. (2003) Toxicity of glucosylsphingosine (glucopsychosine) to cultured neuronal cells: a model system for assessing neuronal damage in Gaucher disease type 2 and 3. *Neurobiol Dis* **14**, 595-601
- Schuette, C. G., Pierstorff, B., Huettler, S., und Sandhoff, K. (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology* **11**, 81R-90R

- Schulz, A., Mousallem, T., Venkataramani, M., Persaud-Sawin, D. A., Zucker, A., Luberto, C., Bielawska, A., Bielawski, J., Holthuis, J. C., Jazwinski, S. M., Kozhaya, L., Dbaibo, G. S., und Boustany, R. M. (2006) The CLN9 protein, a regulator of dihydroceramide synthase. *J Biol Chem* **281**, 2784-2794
- Serrano, A. G., Cruz, A., Rodriguez-Capote, K., Possmayer, F., und Perez-Gil, J. (2005) Intrinsic structural and functional determinants within the amino acid sequence of mature pulmonary surfactant protein SP-B. *Biochemistry* **44**, 417-430
- Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W., und Schnaar, R. L. (1999) Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7532-7537
- Shigematsu, H., Morimoto, S., Kishimoto, Y., Weiler, S., Tomich, J., Barranger, J., Shinohara, M., Yeager, A. M., und O'Brien, J. S. (1990) Saposins (sphingolipid activator proteins) in the twitcher mutant mouse. *J Neurochem* **55**, 1659-1662
- Sikora, J., Harzer, K., und Elleder, M. (2007) Neurolysosomal pathology in human prosaposin deficiency suggests essential neurotrophic function of prosaposin. *Acta Neuropathol (Berl)* **113**, 163-175
- Sillence, D. J., und Platt, F. M. (2003) Storage diseases: new insights into sphingolipid functions. *Trends Cell Biol* **13**, 195-203
- Simons, K., und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Simons, K., und Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39
- Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D. A., Neville, D. C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M. A., Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M., und Crosby, A. H. (2004) Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet* **36**, 1225-1229
- Sims, K. J., Spassieva, S. D., Voit, E. O., und Obeid, L. M. (2004) Yeast sphingolipid metabolism: clues and connections. *Biochem Cell Biol* **82**, 45-61
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., und Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85
- Soeda, S., Hiraiwa, M., O'Brien, J. S., und Kishimoto, Y. (1993) Binding of cerebroside and sulfatides to saposins A-D. *J Biol Chem* **268**, 18519-18523
- Spiegel, R., Bach, G., Sury, V., Mengistu, G., Meidan, B., Shalev, S., Shneor, Y., Mandel, H., und Zeigler, M. (2005) A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans. *Mol Genet Metab* **84**, 160-166
- Sreekrishna, K., Brankamp, R. G., Kropp, K. E., Blankenship, D. T., Tsay, J. T., Smith, P. L., Wierschke, J. D., Subramaniam, A., und Birkenberger, L. A. (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55-62
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., und Urbaniczky, C. (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **143**, 513-526
- Stern, E. A., und Ferrell, R. A. (1960) Surface Plasma Oscillations of a Degenerate Electron Gas. *Physical Review* **120**, 130 LP - 136
- Stevens, R. L., Faull, K. F., Conklin, K. A., Green, B. N., und Fluharty, A. L. (1993) Porcine cerebroside sulfate activator: further structural characterization and disulfide identification. *Biochemistry* **32**, 4051-4059

- Stinshoff, K., und Jatzkewitz, H. (1975) Comparison of the cerebroside sulphatase and the arylsulphatase activity of human sulphatase A in the absence of activators. *Biochim Biophys Acta* **377**, 126-138
- Stratton, J., Chiruvolu, V., und Meagher, M. (1998) High cell-density fermentation. *Methods Mol Biol* **103**, 107-120
- Sun, Y., Qi, X., Witte, D. P., Ponce, E., Kondoh, K., Quinn, B., und Grabowski, G. A. (2002) Prosaposin: threshold rescue and analysis of the "neuritogenic" region in transgenic mice. *Mol Genet Metab* **76**, 271-286
- Sun, Y., Witte, D. P., Zamzow, M., Ran, H., Quinn, B., Matsuda, J., und Grabowski, G. A. (2007) Combined saposin C and D deficiencies in mice lead to a neuronopathic phenotype, glucosylceramide and  $\alpha$ -hydroxy ceramide accumulation, and altered prosaposin trafficking. *Hum Mol Genet*
- Sun-Wada, G. H., Wada, Y., und Futai, M. (2003) Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct Funct* **28**, 455-463
- Svennerholm, L. (1963) Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* **10**, 613-623
- Svensson, M., Platt, F. M., und Svanborg, C. (2006) Glycolipid receptor depletion as an approach to specific antimicrobial therapy. *FEMS Microbiol Lett* **258**, 1-8
- Sylvester, S. R., Skinner, M. K., und Griswold, M. D. (1984) A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biol Reprod* **31**, 1087-1101
- Taha, T. A., Mullen, T. D., und Obeid, L. M. (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 2027-2036
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., und Aizawa, S. (1996) Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 10662-10667
- Tatti, M., Salvioli, R., Ciaffoni, F., Pucci, P., Andolfo, A., Amoresano, A., und Vaccaro, A. M. (1999) Structural and membrane-binding properties of saposin D. *Eur J Biochem* **263**, 486-494
- Tettamanti, G. (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J* **20**, 301-317
- Tyynela, J., Palmer, D. N., Baumann, M., und Haltia, M. (1993) Storage of saposins A and D in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *FEBS Lett* **330**, 8-12
- Unuma, K., Chen, J., Saito, S., Kobayashi, N., Sato, K., Saito, K., Wakisaka, H., Mominoki, K., Sano, A., und Matsuda, S. (2005) Changes in expression of prosaposin in the rat facial nerve nucleus after facial nerve transection. *Neurosci Res* **52**, 220-227
- Vaccaro, A. M., Ciaffoni, F., Tatti, M., Salvioli, R., Barca, A., Tognozzi, D., und Scerch, C. (1995a) pH-dependent conformational properties of saposins and their interactions with phospholipid membranes. *J Biol Chem* **270**, 30576-30580
- Vaccaro, A. M., Salvioli, R., Barca, A., Tatti, M., Ciaffoni, F., Maras, B., Siciliano, R., Zappacosta, F., Amoresano, A., und Pucci, P. (1995b) Structural analysis of saposin C and B. Complete localization of disulfide bridges. *J Biol Chem* **270**, 9953-9960
- Vaccaro, A. M., Salvioli, R., Tatti, M., und Ciaffoni, F. (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem Res* **24**, 307-314
- Vaccaro, A. M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Barca, A., und Scerch, C. (1997) Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *J Biol Chem* **272**, 16862-16867

- Vaccaro, A. M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Maras, B., und Barca, A. (1993) Function of saposin C in the reconstitution of glucosylceramidase by phosphatidylserine liposomes. *FEBS Lett* **336**, 159-162
- Vaccaro, A. M., Tatti, M., Ciaffoni, F., Salvioli, R., Serafino, A., und Barca, A. (1994) Saposin C induces pH-dependent destabilization and fusion of phosphatidylserine-containing vesicles. *FEBS Lett* **349**, 181-186
- van Meer, G., und Lisman, Q. (2002) Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem* **277**, 25855-25858
- Varki, A. P., Reitman, M. L., und Kornfeld, S. (1981) Identification of a variant of mucopolipidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7773-7777
- Vellodi, A. (2005) Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* **128**, 413-431
- Vielhaber, G., Hurwitz, R., und Sandhoff, K. (1996) Biosynthesis, processing, and targeting of sphingolipid activator protein (SAP) precursor in cultured human fibroblasts. Mannose 6-phosphate receptor-independent endocytosis of SAP precursor. *J Biol Chem* **271**, 32438-32446
- Vogel, A., Fürst, W., Abo-Hashish, M. A., Lee-Vaupel, M., Conzelmann, E., und Sandhoff, K. (1987) Identity of the activator proteins for the enzymatic hydrolysis of sulfatide, ganglioside GM1, and globotriaosylceramide. *Arch Biochem Biophys* **259**, 627-638
- Vogel, A., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (1991) Glycosphingolipid specificity of the human sulfatide activator protein. *Eur J Biochem* **200**, 591-597
- Waring, A. J., Chen, Y., Faull, K. F., Stevens, R., Sherman, M. A., und Fluharty, A. L. (1998) Porcine cerebroside sulfate activator (saposin B) secondary structure: CD, FTIR, and NMR studies. *Mol Genet Metab* **63**, 14-25
- Weiler, S., Carson, W., Lee, Y., Teplow, D. B., Kishimoto, Y., O'Brien, J. S., Barranger, J. A., und Tomich, J. M. (1993) Synthesis and characterization of a bioactive 82-residue sphingolipid activator protein, saposin C. *J Mol Neurosci* **4**, 161-172
- Weiler, S., Kishimoto, Y., O'Brien, J. S., Barranger, J. A., und Tomich, J. M. (1995) Identification of the binding and activating sites of the sphingolipid activator protein, saposin C, with glucocerebrosidase. *Protein Sci* **4**, 756-764
- Wendeler, M., Hoernschemeyer, J., Hoffmann, D., Kolter, T., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (2004a) Photoaffinity labelling of the human GM2-activator protein. Mechanistic insight into ganglioside GM2 degradation. *Eur J Biochem* **271**, 614-627
- Wendeler, M., Hoernschemeyer, J., John, M., Werth, N., Schoeniger, M., Lemm, T., Hartmann, R., Kessler, H., und Sandhoff, K. (2004b) Expression of the GM2-activator protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, purification, isotopic labeling, and biophysical characterization. *Protein Expr Purif* **34**, 147-157
- Wendeler, M., Lemm, T., Weisgerber, J., Hoernschemeyer, J., Bartelsen, O., Schepers, U., und Sandhoff, K. (2003) Expression of recombinant human GM2-activator protein in insect cells: purification and characterization by mass spectrometry. *Protein Expr Purif* **27**, 259-266
- Wendeler, M., Werth, N., Maier, T., Schwarzmann, G., Kolter, T., Schoeniger, M., Hoffmann, D., Lemm, T., Saenger, W., und Sandhoff, K. (2006) The enzyme-binding region of human GM2-activator protein. *FEBS J* **273**, 982-991
- Wenger, D. A., DeGala, G., Williams, C., Taylor, H. A., Stevenson, R. E., Pruitt, J. R., Miller, J., Garen, P. D., und Balentine, J. D. (1989) Clinical, pathological, and biochemical studies on an infantile case of sulfatide/GM1 activator protein deficiency. *Am J Med Genet* **33**, 255-265
- Wenger, D. A., und Inui, K. (1984) in *Molecular Basis of Lysosomal*

- storage Disorders* (Brady, R. O., und Barranger, J., eds), pp. 61-78, Academic Press, New York
- Wenger, D. A., Sattler, M., und Roth, S. (1982) A protein activator of galactosylceramide beta-galactosidase. *Biochim Biophys Acta* **712**, 639-649
- Werth, N., Schuette, C. G., Wilkening, G., Lemm, T., und Sandhoff, K. (2001) Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by beta -hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J Biol Chem* **276**, 12685-12690
- Wertz, P. W., Miethke, M. C., Long, S. A., Strauss, J. S., und Downing, D. T. (1985) The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* **84**, 410-412
- Whitelegge, J. P., Ahn, V., Norris, A. J., Sung, H., Waring, A., Stevens, R. L., Fluharty, C. B., Prive, G., Faull, K. F., und Fluharty, A. L. (2003) Characterization of a recombinant molecule covalently indistinguishable from human cerebroside-sulfate activator protein (CSAct or Saposin B). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49**, 799-807
- Wilkening, G., Linke, T., und Sandhoff, K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem* **273**, 30271-30278
- Wilkening, G., Linke, T., Uhlhorn-Dierks, G., und Sandhoff, K. (2000) Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. *J Biol Chem* **275**, 35814-35819
- Winau, F., Schwierzeck, V., Hurwitz, R., Rimmel, N., Sieling, P. A., Modlin, R. L., Porcelli, S. A., Brinkmann, V., Sugita, M., Sandhoff, K., Kaufmann, S. H., und Schaible, U. E. (2004) Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat Immunol* **5**, 169-174
- Wright, C. S., und Li, S. C. (1997) Crystallization and preliminary X-ray characterization of GM2-activator protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 211-212
- Wright, C. S., Li, S. C., und Rastinejad, F. (2000) Crystal structure of human GM2-activator protein with a novel beta-cup topology. *J Mol Biol* **304**, 411-422
- Wright, C. S., Mi, L. Z., Lee, S., und Rastinejad, F. (2005) Crystal Structure Analysis of Phosphatidylcholine-GM2-Activator Product Complexes: Evidence for Hydrolase Activity(.). *Biochemistry* **44**, 13510-13521
- Wright, C. S., Zhao, Q., und Rastinejad, F. (2003) Structural analysis of lipid complexes of GM2-activator protein. *J Mol Biol* **331**, 951-964
- Wrobe, D., Henseler, M., Huettler, S., Pascual Pascual, S. I., Chabas, A., und Sandhoff, K. (2000) A non-glycosylated and functionally deficient mutant (N215H) of the sphingolipid activator protein B (SAP-B) in a novel case of metachromatic leukodystrophy (MLD). *J Inherit Metab Dis* **23**, 63-76
- Xie, B., Wang, W., und Mahuran, D. J. (1992) A Cys138-to-Arg substitution in the GM2 activator protein is associated with the AB variant form of GM2 gangliosidosis. *Am J Hum Genet* **50**, 1046-1052
- Yamada, M., Inui, K., Hamada, D., Nakahira, K., Yanagihara, K., Sakai, N., Nishigaki, T., Ozono, K., und Yanagihara, I. (2004) Analysis of recombinant human saposin A expressed by *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 588-593
- Yamashita, K., Inui, K., Totani, K., Kochibe, N., Furukawa, M., und Okada, S. (1990) Characteristics of asparagine-linked sugar chains of sphingolipid activator protein 1 purified from normal human liver and GM1 gangliosidosis (type 1) liver. *Biochemistry* **29**, 3030-3039
- Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., und Proia, R. L. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3445-3449



- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., und Proia, R. L. (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9142-9147
- Yamashita, T., Wu, Y. P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J. M., Dupree, J. L., Geyer, R., Sandhoff, K., und Proia, R. L. (2005) Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2725-2730
- You, H. X., Qi, X., und Yu, L. (2004) Direct AFM observation of saposin C-induced membrane domains in lipid bilayers: from simple to complex lipid mixtures. *Chem Phys Lipids* **132**, 15-22
- Yuan, W., Qi, X., Tsang, P., Kang, S. J., Illarionov, P. A., Besra, G. S., Gumperz, J., und Cresswell, P. (2007) Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5551-5556
- Zarghooni, M., Bukovac, S., Tropak, M., Callahan, J., und Mahuran, D. (2004) An alpha-subunit loop structure is required for GM2 activator protein binding by beta-hexosaminidase A. *Biochem Biophys Res Commun* **324**, 1048-1052
- Zhang, X. L., Rafi, M. A., DeGala, G., und Wenger, D. A. (1990) Insertion in the mRNA of a metachromatic leukodystrophy patient with sphingolipid activator protein-1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1426-1430
- Zhang, X. L., Rafi, M. A., DeGala, G., und Wenger, D. A. (1991) The mechanism for a 33-nucleotide insertion in mRNA causing sphingolipid activator protein (SAP-1)-deficient metachromatic leukodystrophy. *Hum Genet* **87**, 211-215
- Zhao, Q., Hay, N., und Morales, C. R. (1997) Structural analysis of the mouse prosaposin (SGP-1) gene reveals the presence of an exon that is alternatively spliced in transcribed mRNAs. *Mol Reprod Dev* **48**, 1-8
- Zhou, D., Cantu, C., 3rd, Sagiv, Y., Schrantz, N., Kulkarni, A. B., Qi, X., Mahuran, D. J., Morales, C. R., Grabowski, G. A., Benlagha, K., Savage, P., Bendelac, A., und Teyton, L. (2004a) Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science* **303**, 523-527
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y. P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R. L., Lavery, S. B., Savage, P. B., Teyton, L., und Bendelac, A. (2004b) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786-1789
- Zschoche, A., Fürst, W., Schwarzmann, G., und Sandhoff, K. (1994) Hydrolysis of lactosylceramide by human galactosylceramidase and GM1-beta-galactosidase in a detergent-free system and its stimulation by sphingolipid activator proteins, sap-B and sap-C. Activator proteins stimulate lactosylceramide hydrolysis. *Eur J Biochem* **222**, 83-90