

**Die Protein – Lipid – Bindung
in der epidermalen Permeabilitätsbarriere**

**Entwicklung von Methoden zur massenspektrometrischen
Identifizierung der Protein – Lipid – Bindungsstellen
und
Entwicklung von Inhibitoren der humanen epidermalen ω -Hydroxylase**

Dissertation

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

**vorgelegt von
Barbara Pierstorff
aus Düsseldorf**

Bonn 2005

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert**

Erscheinungsjahr: 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Sandhoff

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. G. van Echten-Deckert

Tag der Prüfung: 2. Dezember 2005-12-07

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis September 2005 unter der Leitung von Prof. Dr. Konrad Sandhoff am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Konrad Sandhoff

2. Referent: Priv.-Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 2. Dezember 2005



für Mama, Papa, Klaus, Nora, Martha und Wolfgang

Publikationen

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten haben zu folgender Publikation beigetragen:

Sawatzki, P., Damm, I., Pierstorff, B., Hupfer, H., Sandhoff, K. und Kolter, T. (2005). Site-specific cleavage--a model system for the identification of lipid-modified glutamate residues in proteins. *ChemBioChem* 6, 178-185.

Übersichtsartikel:

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.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Konrad Sandhoff danke ich für die Ermöglichung und Förderung dieser Arbeit sowie für seine vielen Anregungen.

Frau Priv.-Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die Bereitstellung der Mäuse.

Herr Prof. Dr. Siegfried R. Waldvogel und Herr Prof. Dr. Klaus Mohr haben sich bereit erklärt, zusammen mit Herrn Prof. Dr. K Sandhoff und Frau Priv.-Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert die Promotionskommission zu bilden. Dafür sei Ihnen herzlich gedankt.

Bei Frau Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinic, Herrn Priv.-Doz. Dr. Gottfried Pohlentz und Herrn Dr. Michael Mormann bedanke ich mich für ihre Hilfestellung, das Messen der FT-ICR-Spektren und die freundliche Aufnahme in Münster.

Herrn Dr. Thomas Meyer und seinem OP-Team in der Praxisklinik Grevenbroich danke ich für die Bereitstellung von humanen Vorhäuten.

Bei Frau Petra Speuser bedanke ich mich für die Anzucht und Kultivierung primärer humaner Keratinozyten.

Frau Andrea Raths danke ich für ihre Hilfestellung in der Zellkultur und vor allem für das Töten der Mäuse.

Frau Heike Hupfer danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und die Präparation des Cornified envelope.

Den Damen und Herren der zentralanalytischen Abteilung der Chemischen Institute danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, der FAB- und EI-Massenspektren sowie für die Durchführung der Elementaranalysen.

Frau Dr. Bernadette Breiden und Frau Susanne Brodessa danke ich für die fachliche Unterstützung bei den Zellkulturexperimenten sowie für das Korrekturlesen der Arbeit. Bernadette sei weiterhin für ihre Hilfestellung beim Mikroskopieren gedankt.

Für ausgefallenen Tee, die dazugehörigen Pausen und die zuverlässige moralische Unterstützung danke ich Susanne sehr herzlich.

Herrn Hichem Gallala danke ich für das Einrichten und die Wartung meines Laptops ebenso wie die Hilfestellung beim Ausdrucken.

Auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Kolter danke ich für die Durchsicht dieses Manuskripts ebenso wie für seine zahlreichen Anregungen.

Herrn Dr. Ingo Damm danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und Kritik, das Korrekturlesen der Einleitung, sowie für die schnellste Literaturrecherche der Welt und das Entertainment im Labor.

Allen anderen Kolleginnen und Kollegen, insbesondere den Mitgliedern des zweiten Stocks, sei für das gute und anregende Arbeitsklima gedankt.

Herrn Dr. Wolfgang von Hänisch danke ich für das Korrekturlesen. Bei ihm, meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich für ihre dauerhafte Geduld und die zuverlässige Unterstützung bedanken.

Die DFG hat das Projekt über die Forschergruppe „Keratinozyten – Proliferation und differenzierte Leistung in der Epidermis“ großzügig gefördert. Dafür sei an dieser Stelle gedankt.

Abkürzungen

Abkürzungsverzeichnis:

frei extrahierbare Ceramide:

Ceramid AH	enthält 6-Hydroxysphingosin (H) und α -Hydroxy-Fettsäure (A)
Ceramid AP	enthält Phytosphingosin (P) und α -Hydroxy-Fettsäure (A)
Ceramid AS	enthält Sphingosin (S) und α -Hydroxy-Fettsäure (A)
Ceramid EOH	enthält 6-Hydroxysphingosin (H) und ω -Hydroxy-Fettsäure (O), die mit Linolsäure verestert ist (E)
Ceramid EOP	enthält Phytosphingosin (P) und ω -Hydroxy-Fettsäure (O), die mit Linolsäure verestert ist (E)
Ceramid EOS	enthält Sphingosin (S) und ω -Hydroxy-Fettsäure (O), die mit Linolsäure verestert ist (E)
Ceramid NH	enthält 6-Hydroxysphingosin (H) und nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)
Ceramid NP	enthält Phytosphingosin (P) und nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)
Ceramid NS	enthält Sphingosin (S) und nicht-hydroxylierte Fettsäure (N)

proteingebundene Ceramide:

Ceramid OD	enthält Dihydrosphingosin (D) und ω -Hydroxy – Fettsäure (O)
Ceramid OH	enthält 6-Hydroxysphingosin (H) und ω -Hydroxy – Fettsäure (O)
Ceramid OP	enthält Phytosphingosin (P) und ω -Hydroxy – Fettsäure (O)
Ceramid OS	enthält Sphingosin (S) und ω -Hydroxy – Fettsäure (O)

Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode oder im Einbuchstabencode abgekürzt.

Abb.	Abbildung
ABT	1-Aminobenzotriazol
Abw.	Abweichung
amu	atomare Masseneinheit
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CE	Cornified envelope
Cer	Ceramid
DC	Dünnschichtchromatographie
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation

Abkürzungen

FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
b-GlcCerase	b-Glucoerebrosidase
GlcCer	Glucosylceramid
HOAc	Essigsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (<i>high performance thin layer chromatography</i>)
IRMPD	infrared multiphoton dissociation
IS-24	Tetrakos-11-en-23-insäure
IS-30	Triacont-17-en-29-insäure
LA	Linolsäure
LBE	Lipid bound envelope
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
max.	maximal
MS	Massenspektrum
MS/MS	Fragment-Massenspektrum
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
NHMDS	Natrium-Hexamethyldisilazan
NMR	Kernmagnetresonanz (nuclear magnetic resonance)
OH	Hydroxy
RP	Phasenumkehr (reverse phase)
Sap	Sphingolipid-Aktivator-Protein
SC	Stratum corneum
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SPR	small proline-rich protein
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
ToF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethy)-aminomethan
vs	versus (= im Vergleich zu)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Der Aufbau der Epidermis	3
2.2 Die transepidermale Permeabilitätsbarriere	5
2.3 Der <i>Cornified envelope</i>	8
2.4 Der <i>Lipid bound envelope</i>	13
2.5 Die epidermale ω-Hydroxylase	19
2.6 Zielsetzung	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Entwicklung eines Suizidinhibitors der humanen epidermalen ω-Hydroxylase	22
3.1.1 Gestaltung eines potentiellen Suizidinhibitors der ω-Hydroxylase	22
3.1.2 Chemische Synthese der potentiellen Suizidinhibitoren	24
3.1.3 Wirkung der potentiellen Suizidinhibitoren	27
3.2 Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen	31
3.2.1 Vorarbeiten	31
3.2.2 Abspaltung der proteingebundenen Lipide unter Markierung ihrer Bindungsstellen	34
3.2.3 Präparation von <i>Cornified envelope</i>	42
3.2.4 Untersuchungen an Überstand (7)	51
3.2.5 Untersuchungen an Pellet (8)	55
3.2.6 Affinitätsspaltung	67
4. Diskussion	73
4.1 Entwicklung von Suizidinhibitoren der epidermalen ω-Hydroxylase	73
4.2 Umesterung vom Lipidester zum Methylester	75
4.3 Präparation von <i>Cornified envelope</i>	76
4.4 Proteolytische Spaltung des <i>Cornified envelope</i>	80
4.5 Affinitätsspaltung	84

Inhaltsverzeichnis

5. Material und Methoden	87
5.1 Material	87
5.1.1 Geräte	87
5.1.2 Verbrauchsmaterial	88
5.1.3 Chemikalien	89
5.1.4 Standardsubstanzen	90
5.1.5 Radioaktiv markierte Chemikalien	91
5.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen	91
5.1.7 Biologische Materialien	93
5.2 Methoden	94
5.2.1 Probenpräparation	94
5.2.2 Freisetzung und Extraktion von Lipiden	96
5.2.3 Lipidanalytik	98
5.2.4 Spaltung von SC und CE	100
5.2.5 RP-HPLC	103
5.2.6 Photometrische und fluorometrische Bestimmungen	104
5.2.7 Massenspektrometrie	106
5.2.8 Chemische Synthese	108
5.2.9 Zellkultur	123
6. Literaturverzeichnis	125
7. Lebenslauf	133

1. Zusammenfassung

Die transepidermale Permeabilitätsbarriere ist in der äußersten Schicht der Epidermis, dem Stratum corneum (SC), lokalisiert. Dort sind terminal differenzierte Keratinozyten (Korneozyten) in eine multilamellare Matrix aus Fettsäuren, Cholesterol und einer Familie von hautspezifischen Ceramiden eingebettet. Die Korneozyten besitzen anstelle einer Plasmamembran ein hochgradig quervernetztes Proteingerüst, den Cornified envelope (CE). An die Proteine des CE sind ω -OH-Ceramide gebunden. Sie bilden mit ihrer ω -OH-Gruppe Esterbindungen zu sauren Aminosäureseitenketten des CE aus.

Die Existenz der ω -OH-Ceramide in der Epidermis ist einzigartig und fordert die Funktion einer ω -Hydroxylase. Die Identität dieses Enzyms ist bis heute nicht geklärt. Aufgrund einiger bekannter Eigenschaften des Enzyms wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zielstruktur eines potentiellen Suizidinhibitors entwickelt. Anhand dieser Zielstruktur wurden zwei potentielle Suizidinhibitoren der epidermalen ω -Hydroxylase synthetisiert und ihre Wirkung in humanen kultivierten Keratinozyten untersucht. Beide Substanzen inhibieren das Enzym in mikromolaren Konzentrationen um bis zu 80 %.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten mit massenspektrometrischen Methoden diejenigen Aminosäuren in den Proteinen des CE identifiziert werden, die mit ω -OH-Lipiden verknüpft sind und somit die Protein-Lipid-Bindungsstellen darstellen. Um die Heterogenität der proteingebundenen Lipide und die damit verbundene Komplexität entsprechender Massenspektren zu umgehen, wurde eine Methode entwickelt, bei der die Lipidester durch Behandlung mit Natriummethanolat in Methylester überführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass dabei nur veresterte Glutamate reagieren. Glutamine und freie Glutamate bleiben unverändert. Ferner konnten die entstandenen Glutaminsäuremethylester massenspektrometrisch eindeutig identifiziert werden. In weiteren Untersuchungen in humanem SC konnten nach Umesterung Peptide mit Glutaminsäuremethylestern anstelle von Glutamin oder Glutamat identifiziert werden und den Proteinen Keratin 1 und Keratin 10 zugeordnet werden. Leider zeigte sich in späteren Kontrollexperimenten, dass diese Methylester während einer lang andauernden Extraktion mit Chloroform und Methanol artifiziell entstanden waren.

Um die in großen Mengen vorhandenen und störenden Keratine anzutrennen, wurde CE nach einer beschriebenen Methode isoliert. Für diese Präparation wurde eine Bilanz

1. Zusammenfassung

erstellt, die bezogen auf das Trockengewicht eine Materialausbeute von 1,5 % ergab. Die Menge an proteingebundenen Lipiden konnte dagegen nur um den Faktor 2,5 angereichert werden. Es gelang jedoch bei dieser Präparation, reines CE zu gewinnen und die Keratine vollständig zu entfernen.

Die nun folgende proteolytische Spaltung des CE stellte sich als sehr problematisch heraus. Selbst eine beschriebene Methode zur Spaltung konnte nicht reproduziert werden. Darüber hinaus wurde durch vielfältige Variationen der Proteolyse-Bedingungen wie z.B. der Vorbehandlung der CE-Proben, der verwendeten Protease, der Dauer des Verdaus oder der Konzentrationen von CE bzw. Protease versucht, aus CE Peptide freizusetzen. Trotz dieser zahlreichen Abwandlungen gelang es nicht, Bedingungen zu finden, unter denen reproduzierbar Peptide generiert werden konnten. In einzelnen Experimenten konnten jedoch Peptide anhand von ESI-MS/MS-Spektren sequenziert und als Peptide aus Loricrin identifiziert werden. Teilweise waren die identifizierten Peptide über N^ε-(γ -glutamyl)lysin-Isodipeptidbindungen an andere Peptide gebunden. Die Interpretation dieser Massenspektren erwies sich allerdings als sehr komplex.

Da die oben beschriebene Proteolyse von Peptiden nicht zuverlässig reproduzierbar war, wurde eine Methode entwickelt, bei der Peptidketten durch Behandlung mit Natriummethanolat selektiv N-terminal von Glutaminsäureestern gespalten werden. Dabei entsteht aus dem veresterten Glutamat ein Pyroglutamat, das im MS/MS-Spektrum als b1-Ion der Masse 112,04 amu detektiert wird. Diese Affinitätsspaltung wurde an einem Modellpeptid bewiesen. Durch die Affinitätsspaltung sollten aus CE nur Peptide freigesetzt werden, die sich zwischen zwei Glutaminsäureestern, also zwischen zwei Protein-Lipid-Bindungsstellen, befinden. Nach Optimierung der Bedingungen konnten mit Hilfe der Affinitätsspaltung Peptide erhalten werden, deren ESI-QToF-MS/MS-Spektren einen Peak bei 112 amu zeigten. Diese Spektren waren jedoch nicht interpretierbar, da offensichtlich weitere, bis jetzt nicht bekannte, Modifizierungen stattgefunden haben. Weitergehende Messungen am ESI-FT-ICR-Massenspektrometer, dessen Massengenauigkeit sehr viel höher ist, ergaben außerdem, dass es sich bei dem Fragment mit der Masse 112 amu aus den aus CE freigesetzten Peptiden nicht um das b1-Ion eines Pyroglutamats handelt. Die Bedingungen der Affinitätsspaltung müssen also noch optimiert werden. Zum anderen müssen die Modifizierungen, die vermutlich an den Isodipeptidbindungen stattfinden, aufgeklärt werden.

2. Einleitung

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Mit einer Gesamtfläche, die abhängig von Größe und Gewicht 1,5 – 2 m² beträgt, bedeckt sie den Körper (Jung, 1995). Sie besteht im wesentlichen aus drei Schichten, der Subkutis (Unterhaut), der Dermis (Lederhaut) und der Epidermis (Oberhaut), die von innen nach außen aufeinander folgen.

Die Haut dient als Sinnesorgan für Umweltreize und reagiert darauf (z.B. Gänsehaut mit Aufstellen der Härchen gegen Kälte). Gleichzeitig bietet sie Schutz vor physikalischen, chemischen und biologischen Schädigungen, wie z.B. thermischen oder mechanischen Belastungen, toxischen Substanzen sowie Fremdorganismen. Eine essentielle Lebensvoraussetzung landlebender Säugetiere stellt außerdem der Schutz des Organismus vor transepidermalem Wasserverlust durch die Haut dar.

2.1 Der Aufbau der Epidermis

Die Epidermis ist ein sich selbst erneuerndes, mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, dessen Dicke in Abhängigkeit von Lokalisation, Alter und Geschlecht zwischen 30 und 300 µm variiert (Jung, 1995). Sie besteht neben Melanozyten, T-Lymphozyten, Merkelzellen und Langerhanszellen im wesentlichen aus Keratinozyten.

Die Regeneration der Epidermis erfolgt durch Ablösung postmitotischer Basalzellen von der Basalmembran. Während diese Zellen zur Hautoberfläche wandern, durchlaufen sie verschiedene Differenzierungsstadien und werden nach ca. vier Wochen als Hornschuppen abgeschilfert.

Die verschiedenen Differenzierungsstadien sind in den verschiedenen Schichten der Epidermis zu erkennen (Abb.1):

2. Einleitung

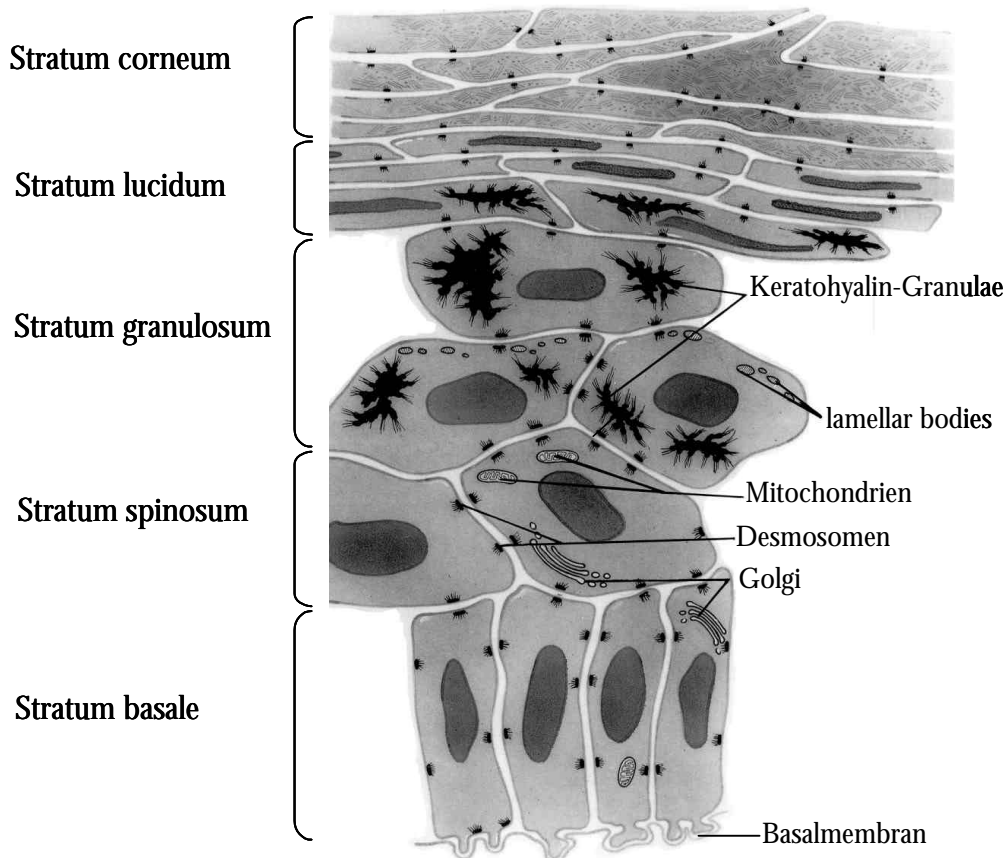


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Epidermis (modifiziert nach Montagna, 1992).

- Stratum basale (Basalzellschicht)

Im Stratum basale befinden sich die mitosefähigen Keratinozyten, so dass dort die Erneuerung der Epidermis stattfindet. Die Basalzellen besitzen relativ große Kerne und wenig Zytoplasma. Neben den Basalzellen findet man im Stratum basale auch vereinzelt Merkelzellen und Melanozyten.

- Stratum spinosum (Stachelzellschicht)

Das Stratum spinosum enthält polygonale Keratinozyten, die durch eine große Zahl von Desmosomen miteinander verbunden sind. Über die Desmosomen sind die Keratinfilamente verankert, welche die Zellen durchziehen und ihre hohe mechanische Stabilität gewährleisten (Plattner und Hentschel, 1997). Mit Beginn der Differenzierung werden statt der im Stratum basale hauptsächlich vorkommenden Keratine 5 und 14 die Keratine 1 und 10 exprimiert. Die aus diesen Keratinen aufgebauten Filamente bleiben bis ins Stratum corneum erhalten und werden mit fortschreitender Differenzierung immer dichter gepackt (Kirfel *et al.*, 2003).

- Stratum granulosum (Körnerzellschicht)

Die Zellen des Stratum granulosum zeigen bereits deutliche Anzeichen der beginnenden Verhornung. Die Zellen werden flacher und verlieren ihre Organellen. Es bilden sich Keratohyalin-Granulae, die Profilaggrin enthalten, das zu Filaggrin prozessiert wird. Filaggrin fördert eine Verdichtung der Keratinfilamente, so dass Keratin 1 und Keratin 10 in den differenzierenden Schichten der Epidermis etwa 60 – 90 % des Proteingehalts ausmachen (Nemes und Steinert, 1999; Kirfel *et al.*, 2003).

- Stratum corneum (Hornschicht)

Das Stratum corneum (SC) ist 8 – 13 µm dick (Jung, 1995) und besteht aus abgestorbenen Keratinozyten, den Korneozyten. Die abgeflachten Zellen enthalten keine Organellen mehr und sind mit dicht gepackten Keratinfilamenten gefüllt. Anstelle einer Plasmamembran besitzen sie eine dreidimensional verknüpfte Proteinschicht, den Cornified envelope (CE), der von außen mit einer Monoschicht aus hautspezifischen Lipiden, dem Lipid bound envelope (LBE) überzogen ist. Die Lipide des LBE sind über kovalente Bindungen mit den Proteinen des CE verbunden. Die Korneozyten sind in eine multilamellare Lipidmatrix eingebettet, die gemeinsam mit dem LBE die Permeabilitätsbarriere im SC bildet.

Die unterste Zellschicht des Stratum corneum, in der die Zellen optisch dichter erscheinen, wird auch als Stratum lucidum bezeichnet. Das Stratum lucidum ist besonders ausgeprägt an Palmar- und Plantarflächen (Handinnenflächen und Fußsohlen).

2.2 Die transepidermale Permeabilitätsbarriere

Die transepidermale Permeabilitätsbarriere ist hauptsächlich im Stratum corneum lokalisiert. Die multilamellare Lipidmatrix, in die die Korneozyten des SC eingebettet sind, enthält neben Cholesterol und Fettsäuren eine Familie einzigartiger Ceramide (Abb. 2). Diese Lipide sind nicht kovalent an die Korneozyten gebunden und lassen sich mit organischen Lösungsmitteln extrahieren. Daher werden die Lipide der extrazellulären Matrix auch als „frei extrahierbare Lipide“ bezeichnet.

Frei extrahierbare Lipide des humanen Stratum corneum

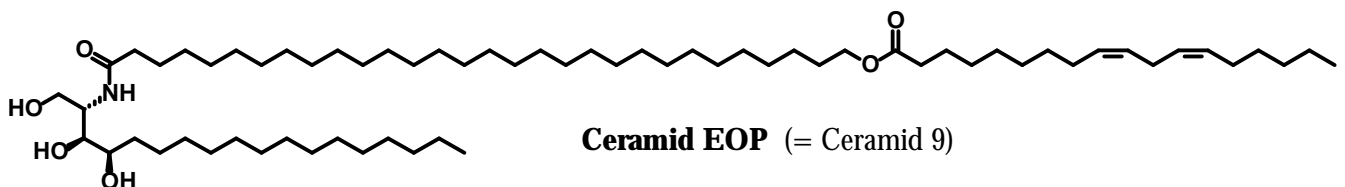
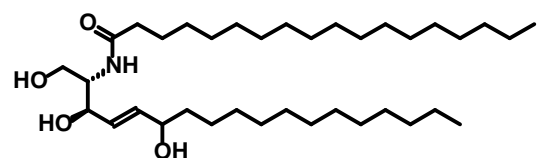
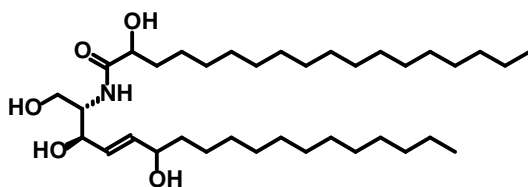
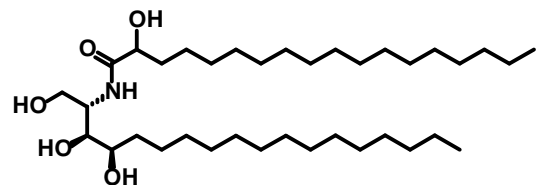
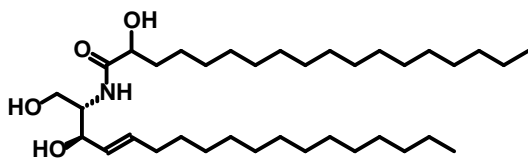
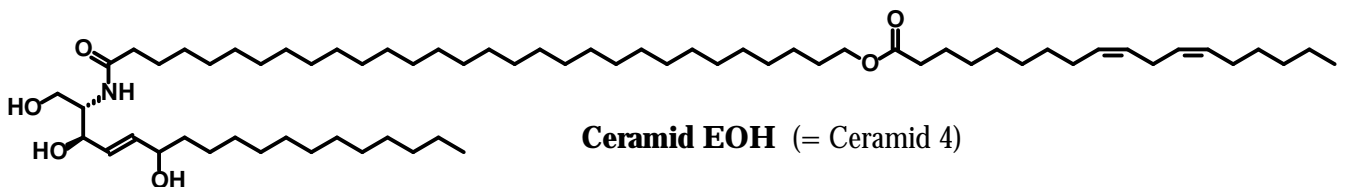
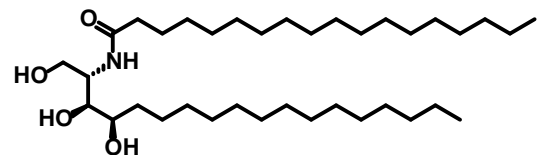
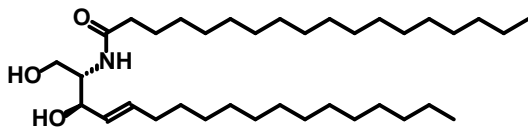
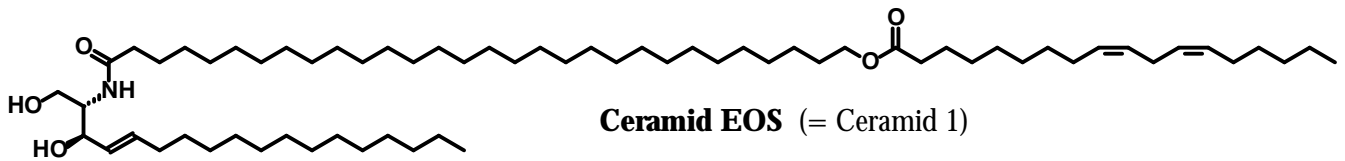


Abb. 2: Frei extrahierbare Ceramide des humanen Stratum corneum.

Die Nomenklatur nach Motta et al. beschreibt mit dem ersten bzw. den ersten beiden Buchstaben den Fettsäureteil des Ceramids, mit dem letzten Buchstaben die Sphingoidbase. Die Buchstaben bedeuten: S = Sphingosin, P = Phytosphingosin, H = 6-Hydroxysphingosin, N = nicht hydroxylierte Fettsäure, A = α -Hydroxy-Fettsäure, O = ω -Hydroxy-Fettsäure, E = mit Linolsäure verestert. Die entsprechende Nummerierung der Ceramide ist in Klammern gesetzt (Ponec *et al.*, 2003).

Bis heute hat man in humanem Stratum corneum neun verschiedene Ceramide gefunden (Wertz und Downing, 1983; Wertz *et al.*, 1985; Robson *et al.*, 1994; Stewart und Downing, 1999; Ponec *et al.*, 2003). Die Ceramide setzen sich aus jeweils einer Sphingoidbase und einer Fettsäure zusammen. Bei der Sphingoidbase der epidermalen Ceramide kann es sich um Sphingosin (S), Phytosphingosin (P) oder 6-Hydroxysphingosin (H) handeln. Die Fettsäure kann α -hydroxyliert (A), ω -hydroxyliert (O) oder nicht-hydroxyliert (N) sein. Die ω -OH-Fettsäure ist bei den frei extrahierbaren Ceramiden mit Linolsäure verestert (E).

Bei der allgemein verwendeten Nomenklatur nach Motta (Motta *et al.*, 1993) wird zuerst der Buchstabe für die Fettsäure, dann der Buchstabe für die Sphingoidbase angegeben (Abb. 2). Alternativ werden die Ceramide gemäß ihres Laufverhaltens im Dünnschichtchromatogramm nummeriert (Cer 1 – Cer 9). Cer 1 hat den größten, Cer 7 den kleinsten R_f -Wert (Bouwstra *et al.*, 2003). Cer 8 (Stewart und Downing, 1999) und Cer 9 (Ponec *et al.*, 2003) wurden erst später identifiziert.

Die Kettenlängen beider Ceramid-Bausteine sind variabel. Die nicht-hydroxylierten Fettsäuren sind 14 – 30 Kohlenstoffatome lang, die α -hydroxylierten Fettsäuren 16 – 28 und die ω -hydroxylierten 24 – 32 Kohlenstoffatome, wobei auch ungerade Kettenlängen möglich sind (Wertz *et al.*, 1987). Zusätzlich können die Fettsäuren gesättigt oder ein- bzw. mehrfach ungesättigt sein (Wertz *et al.*, 1989). Die Sphingoidbasen können zwischen 16 und 26 Kohlenstoffatomen lang sein, Sphingosin wird sowohl mit einer als auch ohne Doppelbindung, also als Sphinganin, beschrieben (Wertz *et al.*, 1987).

Die Zusammensetzung der frei extrahierbaren Lipide variiert in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht ebenso wie von der betrachteten Hautstelle (Lampe *et al.*, 1983; Weerheim und Ponec, 2001).

Die frei extrahierbaren Lipide bilden geordnete Schichten um die Korneozyten (Bouwstra *et al.*, 2003). Man geht davon aus, dass die kovalent gebundenen Lipide des LBE für die Organisation der Barrierelipide in der extrazellulären Matrix verantwortlich (Schreiner *et al.*, 2000) und somit essentiell für die Wasserbarriere der Haut sind. Störungen des Stoffwechsels der epidermalen Lipide gehen mit einer verminderten Barriereleistung (Holleran *et al.*, 1993; Doering *et al.*, 1999a; Behne *et al.*, 2000) und Krankheiten wie Neurodermitis einher (Macheleidt *et al.*, 2002) oder Psoriasis (Alessandrini *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2004; Farwanah *et al.*, 2005).

Einen weiteren Barrierebaustein bilden die *tight junctions* (zonulae occludentes, Schlussleisten), undurchlässige Zell-Zell-Verbindungen, die benachbarte Zellen so dicht verbinden, dass sie den Interzellulärraum ausfüllen und abdichten. Man spricht auch von

2. Einleitung

„kissing points“ (Morita und Miyachi, 2003). *Tight junctions* wurden in humanem Stratum granulosum nachgewiesen. Sie bestehen hauptsächlich aus Proteinen wie Occludin, Claudin 1, Claudin 4, ZO 1 und ZO 2 (Brandner *et al.*, 2002; Langbein *et al.*, 2002; Morita und Miyachi, 2003). Die Bedeutung der *tight junctions* für die Permeabilitätsbarriere illustriert die Claudin 1-*knock out*-Maus, die am ersten Tag nach der Geburt an transepidermalem Wasserverlust stirbt (Furuse *et al.*, 2002).

2.3 Der *Cornified Envelope*

Die Korneozyten besitzen anstelle einer Plasmamembran ein 10 nm dickes dreidimensional verknüpftes Protein-Netzwerk, den *Cornified Envelope*, an den die Lipide des Lipid Bound Envelope kovalent gebunden sind (Kalinin *et al.*, 2002).

Als CE wird in der Literatur der unlösliche Rückstand bezeichnet, der von epithelialen Geweben nach erschöpfendem Kochen in denaturierenden und reduzierenden Lösungen zurück bleibt (Rice und Green, 1977; Kalinin *et al.*, 2002).

Die Quervernetzung der Proteine des CE erfolgt zum einen durch Disulfidbrücken, zum anderen durch N^ε-(*γ*-glutamyl)lysin-Isodipeptidbindungen (Abernethy *et al.*, 1977; Rice und Green, 1977), deren Bildung durch die Ca²⁺-abhängigen Transglutaminasen 1, 2, 3 und 5 katalysiert wird (Candi *et al.*, 1995; Tarcsa *et al.*, 1998; Candi *et al.*, 1999; Candi *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2005). Dabei greift die Transglutaminase einen Glutaminrest eines CE-Proteins an und überführt ihn in ein Thioacyl-Enzym-Intermediat. Der Angriff eines Nucleophils, in diesem Falle die ϵ -Aminogruppe eines Lysins eines anderen CE-Proteins, beendet die Reaktion unter Bildung der N^ε-(*γ*-glutamyl)lysin-Isodipeptidbindung (Folk und Finlayson, 1977; Kalinin *et al.*, 2002; Eckert *et al.*, 2005).

Das CE ist aus einer Reihe von Proteinen aufgebaut (Tab. 1), von denen sich viele durch ungewöhnliche Aminosäure-Zusammensetzungen auszeichnen. So hat beispielsweise Loricrin, der Hauptbestandteil des CE, einen der höchsten Glycin-Gehalte aller bekannten Proteine, die SPRs (small proline-rich proteins) haben die höchsten Prolin-Gehalte. Involucrin und Trichohyalin enthalten besonders viele geladene Aminosäuren. Die Proteine des CE sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die angegebenen relativen Häufigkeiten, mit denen sie im CE vorkommen, sind einer älteren Arbeit entnommen (Nemes und Steinert, 1999). Inzwischen wurden noch weitere CE-Proteine identifiziert.

Die Zahlen stellen nur grobe Anhaltspunkte dar, spiegeln die Mengenverhältnisse im CE dennoch gut wider.

CE-Protein	relative Häufigkeit*	Referenz
Loricrin	80%	Mehrel <i>et al.</i> , 1990 Hohl <i>et al.</i> , 1991
SPRs	3 - 5%	Kartasova und van de Putte, 1988 Steven und Steinert, 1994
Cystastatin a	2 - 5%	Kartasova <i>et al.</i> , 1987 Steven und Steinert, 1994
Involucrin	2 - 5%	Rice und Green, 1979 Watt und Green, 1981 Eckert und Green, 1986 Steven und Steinert, 1994
Filaggrin	< 1%	Steven und Steinert, 1994
Elafin	< 1%	Steven und Steinert, 1994 Steinert, 1995
Keratine	< 1%	Steven und Steinert, 1994 Candi <i>et al.</i> , 1998
Desmoplakin	< 1%	Steinert und Marekov, 1995
Envoplakin	< 1%	Ruhrberg <i>et al.</i> , 1996
Periplakin	< 1%	Ruhrberg <i>et al.</i> , 1997
Annexin 1	< 1%	Robinson <i>et al.</i> , 1997
S100 A1 – A13	< 1%	Robinson <i>et al.</i> , 1997 Kalinin <i>et al.</i> , 2002
Sciellin		Kvedar <i>et al.</i> , 1992 Champlaud <i>et al.</i> , 1998
Trichohyalin		Lee <i>et al.</i> , 1993
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2		Jensen <i>et al.</i> , 1995
Repetin		Krieg <i>et al.</i> , 1997
LEP / XP5 – Proteine		Marshall <i>et al.</i> , 2001

Tab. 1: Bisher bekannte Proteine des Cornified Envelope und ihre relative Häufigkeiten.

* Angaben nach Nemes und Steinert, 1999. Zu den Proteinen ohne Zahlwert liegen keine Angaben vor. Vermutlich liegen auch diese Häufigkeiten bei < 1%.

2. Einleitung

Aus den Arbeiten der Gruppe um P. Steinert hat sich ein Model für den Aufbau des CE entwickelt (Kalinin *et al.*, 2001; Kalinin *et al.*, 2002), das sich in drei Phasen gliedert (Abb. 3).

Während der ersten Phase (Abb. 3, Bild 1) löst ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Expression von Envoplakin (rot) und Periplakin (orange) aus, die sich anschließend an die Keratinfilamente und an Verbindungsstellen wie Desmosomen anlagern. Bei weiter steigender Ca^{2+} -Konzentration bilden Envoplakin und Periplakin Hetero-Tetramere, die sich entlang der anionischen Plasmamembran verteilen. Die Anwesenheit von Annexinen könnte diesen Prozess unterstützen. *In vitro*-Experimente mit rekombinant exprimiertem Envoplakin und Periplakin ergaben, dass diese beiden Proteine Heterodimere und -multimere bilden, die sich in Gegenwart von Ca^{2+} an synthetische Lipidvesikel anlagern (Kalinin *et al.*, 2004).

Während sich Envoplakin und Periplakin entlang der Plasmamembran anordnen, beginnt die Expression von Involucrin (grün) und Transglutaminase 1 (gelb), die sich ebenfalls an die Membran anlagern. Durch eine weiter ansteigende bzw. lokal erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wird eine Vernetzung von Involucrin mit sich selbst oder zwischen Involucrin und Envoplakin bewirkt. Modellexperimente mit Involucrin und Transglutaminase 1 an synthetischen Lipidvesikeln zeigen, dass sich sowohl Involucrin als auch Transglutaminase 1 Ca^{2+} -abhängig an die Vesikel anlagern (Nemes *et al.*, 1999b). Auch die Bildung von Isodipeptidbindungen ist abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration. Im angelagerten Zustand entstehen die Isodipeptidbindungen spezifisch an nur 5 der 150 Glutaminreste des Involucrins. In Lösung hingegen werden 23 Glutamine verwendet (Nemes *et al.*, 1999b).

Die frühesten CE-Fragmente, die aus differenzierenden Keratinozyten isoliert und analysiert wurden, bestanden zu großen Teilen aus Envoplakin und Involucrin (Steinert und Marekov, 1999).

Auch andere Proteine der Zellperipherie und der Zell-Zell-Kontakte werden in die Vernetzung miteinbezogen, so dass die Verbindungen und die Kommunikation zwischen den Zellen aufgehoben werden (Kee und Steinert, 2001). Man kann davon ausgehen, dass sich eine monomolekulare Schicht aus Involucrin, Envoplakin, Periplakin und wahrscheinlich einigen anderen Proteinen entlang der Zellmembran ausbildet. Diese Schicht könnte als Gerüst dienen, an dem sich das CE aufbaut (Kalinin *et al.*, 2002).

In der zweiten Phase (Abb. 3, Bild 2) des Models ist die Bildung des LBE angesiedelt, auf die in Kapitel 2.4 näher eingegangen wird.

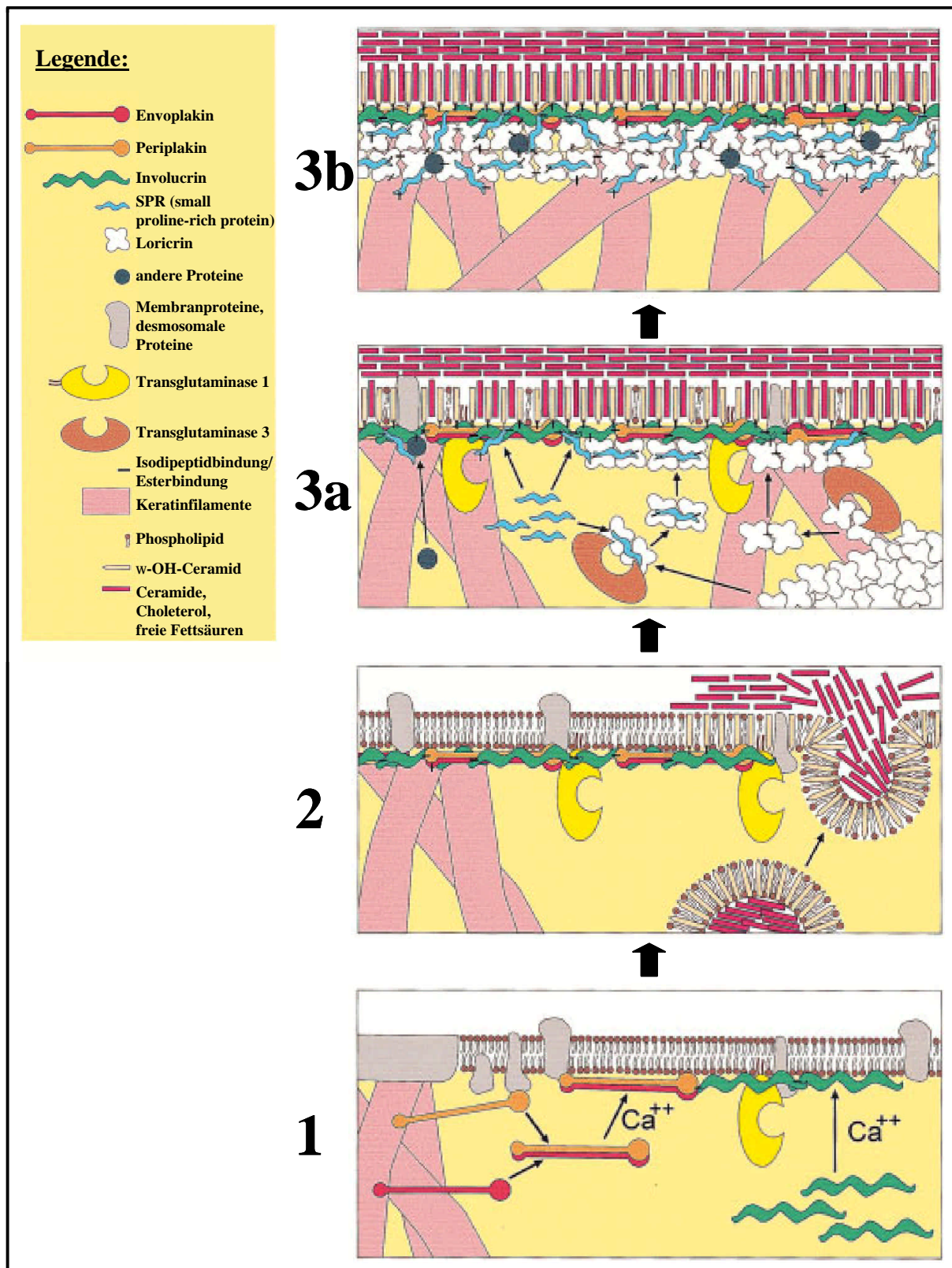


Abb. 3: Modell zur Biogenese des Cornified envelope nach Kalinin *et al.*, 2002.
Zur Erläuterung s. Kap. 2.3.

2. Einleitung

In der dritten Phase (Abb. 3, Bild 3a) wird das anfänglich gebildete CE-Gerüst durch Loricrin (weiss), die SPRs (hellblau), Keratine (rosa Balken) und kleine Mengen anderer Proteine (dunkelblau) wie Repetin, Trichohyalin, Cystatin α und Elafin verstärkt.

Eine Analyse der Isodipeptidbindungen in CE-Präparationen zeigte Bindungen von Loricrin mit sich selbst und mit SPR 1, SPR 2, Elafin, Filaggrin und den Keratinen 1, 2e, 5 und 10 (Steinert und Marekov, 1995; Candi *et al.*, 1998). Bei den Bindungen der Keratine zum CE wird in jedem Keratin spezifisch nur eins der Lysine zur Bindung herangezogen (Candi *et al.*, 1998). Auch für Trichohyalin sind Isodipeptidbindungen zu CE-Proteinen beschrieben (Tarcza *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 2003).

Loricrin ist in physiologischen Puffern schwer löslich und akkumuliert im Zytosol des Stratum granulosum. Im Gegensatz dazu sind die SPRs gut löslich. Sowohl Loricrin als auch die SPRs werden als Substrate der Transglutaminase 3 *in vitro* beide zu Oligomeren verbunden (Candi *et al.*, 1995; Tarcza *et al.*, 1998; Candi *et al.*, 1999). Daraus resultiert die Annahme, dass die Transglutaminase 3 *in vivo* schwerlösliches Loricrin und gutlösliches SPR zu Komplexen verbindet, die leichter zum CE-Gerüst gelangen können. Da die Menge an SPRs je nach Körperregion und Belastung schwankt, vermutet man ferner, dass die SPRs für die mechanische Stabilität der Haut bedeutsam sind (Steinert *et al.*, 1998).

Abb. 3, Bild 3b zeigt schematisch das vollständig aufgebaute CE. Auf der zytosolischen Seite befinden sich vorwiegend Loricrin und die SPRs, während die extrazelluläre Seite hauptsächlich aus Involucrin, Envoplakin und Periplakin aufgebaut ist, an die das LBE gebunden ist.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass sich Loricrin und die SPRs auf derjenigen Seite des CE befinden, auf der sich die Lipide des LBE nicht befinden. Diese Proteine werden bei einem proteolytischen Abbau des CE als erste abgebaut, da sie nicht durch das LBE geschützt sind (Steinert und Marekov, 1995). Dazu passt, dass Antikörper gegen Loricrin nur eine Seite des CE markieren (Steinert und Marekov, 1997). CEs mit LBE werden von Antikörpern gegen Desmoplakin, Involucrin und Keratin 1 nicht markiert. Bei CEs, deren LBE entfernt wurde, markieren die Antikörper gegen Desmoplakin und Involucrin die Seite, auf der sich das Loricrin nicht befindet. Der Keratin 1-Antikörper markiert beide Seiten (Steinert und Marekov, 1997). Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass sich Involucrin (Abb. 3, Bild 3b) und Desmoplakin (in Bild 3b nicht gezeigt) auf der Außenseite, der LBE-Seite, des CE befinden, Loricrin dagegen innen.

2.4 Der Lipid Bound Envelope

Nachdem alle frei extrahierbaren Lipide aus Stratum corneum extrahiert wurden, lassen sich durch milde alkalische Hydrolyse weitere Lipide abspalten (Wertz und Downing, 1987), die „proteingebundenen Lipide“ bzw. der Lipid Bound Envelope. Diese Lipide sind im Transmissions-Elektronen-Mikroskop als 4 nm dickes elektronendichtes Band rund um den Korneozyten zu sehen (Lavker, 1976; Swartzendruber *et al.*, 1987). Berechnungen ergaben, dass in Schweinehaut ein Korneozyt von einer Monoschicht von Lipiden umgeben ist, wobei als Ausgangspunkt die Dichten von Korneozyten, Horn (als Maß für CE) und Lipiden dienen, ebenso wie der Gewichtsanteil proteingebundener Lipide von Korneozyten (Swartzendruber *et al.*, 1987). Später wurden für humane Epidermis vergleichbare Werte errechnet (Wertz *et al.*, 1989; Marekov und Steinert, 1998). Bei den Lipiden des LBE handelt es sich um ω -OH-Fettsäuren und Ceramide, deren Fettsäuren ω -hydroxyliert sind (Abb. 5). Diese Fettsäuren sind 28 – 34 Kohlenstoffatome lang und können gesättigt oder ein- bzw. zweifach ungesättigt sein (Wertz *et al.*, 1989; Marekov und Steinert, 1998). Als Sphingoidbase sind bisher Sphingosin, Phytosphingosin und 6-Hydroxysphingosin bekannt (Wertz und Downing, 1987; Wertz *et al.*, 1989), deren Kettenlängen zwischen 16 und 22 Kohlenstoffatomen liegen (Marekov und Steinert, 1998). Wie bei den frei extrahierbaren Lipiden findet man auch hier Sphingosin ohne Doppelbindung (Marekov und Steinert, 1998), also ein Sphinganin, das auch mit „D“ (Dihydro-) bezeichnet wird.

Die Länge der ω -OH-Fettsäuren beträgt ca. 4 nm und entspricht damit der Dicke des LBE und in etwa der Dicke einer Lipiddoppelschicht (Swartzendruber *et al.*, 1987).

Die Lipide des LBE sind mit ihrer ω -OH-Gruppe über eine Esterbindung an den CE gebunden (Swartzendruber *et al.*, 1987; Stewart und Downing, 2001). Da eine Esterbindung aus der Kondensation eines Alkohols und einer Carbonsäure entsteht, muss der Bindungspartner im CE eine saure Aminosäureseitenkette, wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure sein.

Frühere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Lipide des LBE an Glutamine und Glutaminsäuren von Involucrin, Periplakin, Desmoplakin und Envoplakin gebunden sind (Marekov und Steinert, 1998).

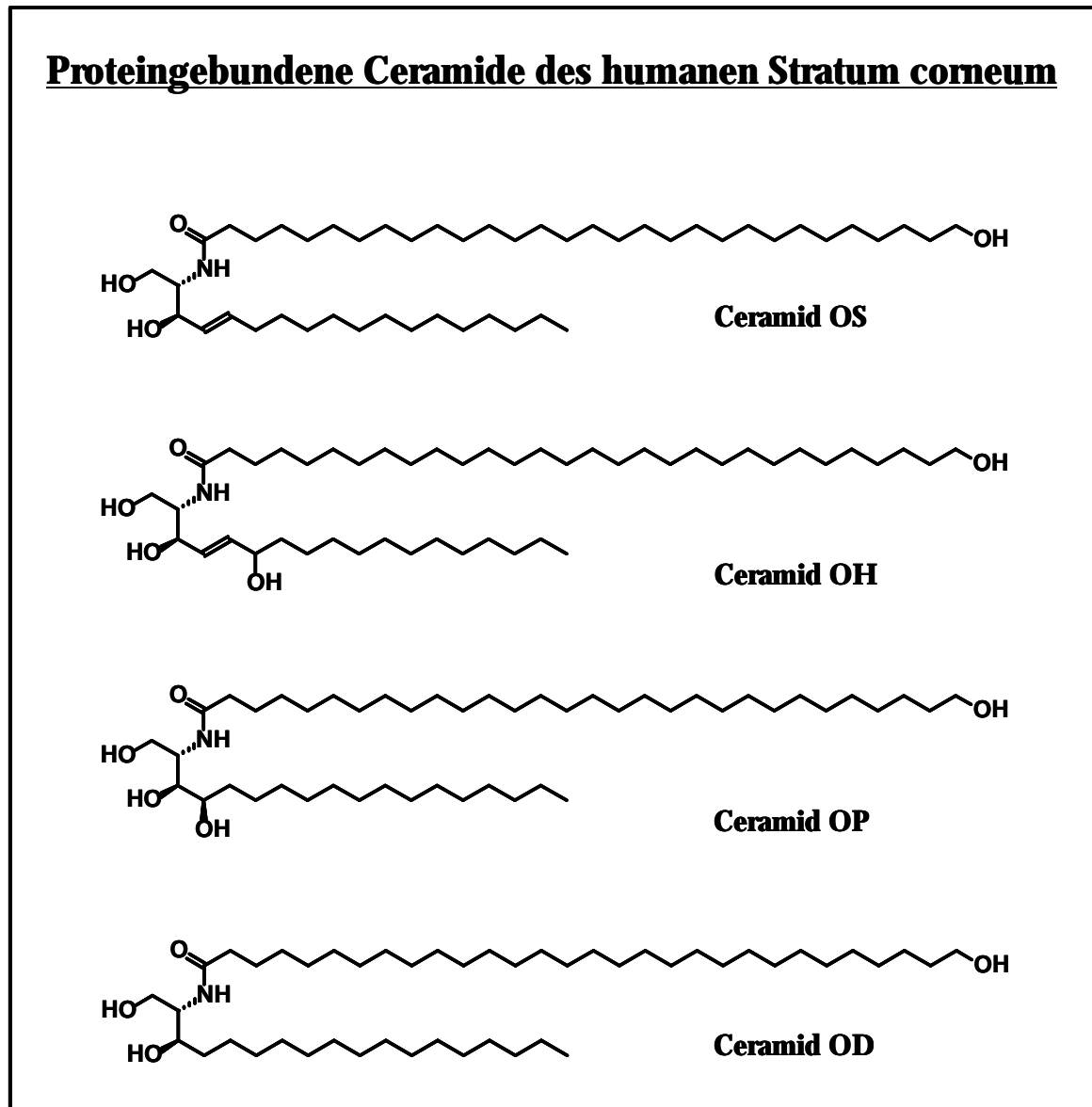


Abb. 4: Proteingebundene Ceramide des humanen Stratum corneum.
Die Nomenklatur erfolgt wie in Abb. 2 nach Motta et al., 1993. (D = Dihydrosphingosin)

Die Biogenese des LBE beginnt im äußeren Stratum granulosum mit der Bildung von Lamellar Bodies (Abb. 3), zytosolischen Strukturen, die am weit auseinanderlaufenden *trans* Golgi-Netzwerk gebildet werden (Elias *et al.*, 1998). Die Biogenese der Lamellar Bodies ist nicht geklärt. Sie enthalten große Mengen an Glucosylceramiden, die im allgemeinen im Golgi-Apparat synthetisiert werden (Jeckel *et al.*, 1992). Daher wird angenommen, dass die Lamellar Bodies durch Abschnürung aus dem Golgi-Apparat entstehen.

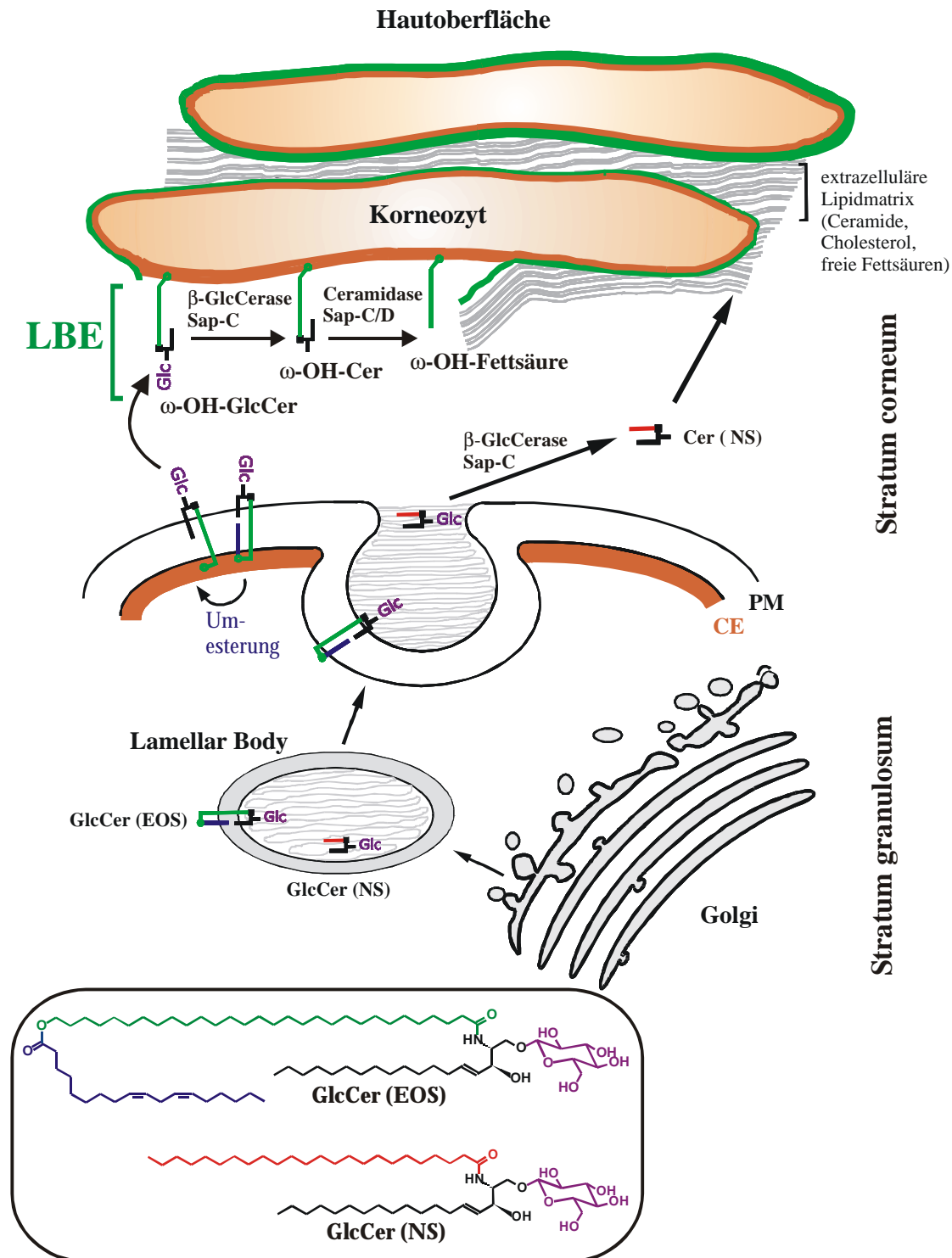


Abb. 5: Extrazellulärer Metabolismus der Glucosylceramide (GlcCer) und Bildung des Lipid Bound Envelope (LBE, grün), modifiziert nach Schuette *et al.*, 1999.

Im Stratum granulosum bilden sich Lamellar Bodies, in deren Innern sich Glucosylceramide befinden. Die ω -hydroxylierten und veresterten Glucosylceramide reichern durch die umgebende Membran der Lamellar Bodies hindurch. Wenn diese mit der Plasmamembran (PM) fusionieren, werden die ω -OH-Glucosylceramide durch Umesterung an den Cornified Envelope (CE, orange) gebunden, wobei die Linolsäure abgespalten wird. Im Extrazellulärraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum werden dann vermutlich sowohl die proteingebundenen als auch die freien Glucosylceramide durch β -Glucocerebrosidase (β -GlcCerase) und Sphingolipid-Aktivator-Protein C (Sap-C) zu den entsprechenden Ceramiden (Cer) deglucosyliert. Die Ceramide können von der sauren Ceramidase und Sap-C oder D in Fettsäuren überführt werden.

2. Einleitung

In den Lamellar Bodies befinden sich die *pro barrier*-Lipide. Das sind polare Lipide wie Glucosyl-Derivate aller epidermaler Ceramide, die Glucosylceramide (GlcCer) (Hamanaka *et al.*, 2002), und Sphingomyeline (Uchida *et al.*, 2000). Die Linolsäureveresterten *w*-OH-Glucosylceramide können sich so in die begrenzende Membran der Lamellar Bodies einlagern, dass ihre langen *w*-OH-Fettsäuren durch die gesamte Lipiddoppelschicht reichen und sich die Estergruppe auf der zytosolischen und die Glucosyl-Kopfgruppe auf der luminalen Seite der Membran befinden. Die Linolsäure, mit der die *w*-OH-Gruppe verestert ist, kann wieder in die Membran eintauchen (Abb. 5).

Die Lamellar Bodies wandern zur Plasmamembran, fusionieren mit ihr und schütten ihren Inhalt in den Extrazellulärraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum aus (Landmann, 1986) (s. Abb. 4 und 5). Dabei verbleiben die Linolsäureveresterten *w*-OH-Glucosylceramide in der Membran und können durch eine Umesterung an saure Aminosäureseitenketten von CE-Proteinen gebunden werden (Abb. 6). Die Linolsäure fungiert dabei formal als Abgangsgruppe.

Wie diese Umesterung abläuft, ist nicht geklärt. Modellversuche mit einem synthetischen *w*-OH-Ceramid-Analogon, rekombinanter Transglutaminase 1, Involucrin und synthetischen Lipidvesikeln zeigten, dass die Transglutaminase 1 unter diesen *in vitro*-Bedingungen die Veresterung des Ceramid-Analogons mit 5 verschiedenen Glutamin-Resten des Involucrins katalysiert (Nemes *et al.*, 1999a). Bis dahin war von der Transglutaminase nur bekannt, dass sie Isodipeptidbindungen zwischen Glutamin und Lysin bildet. Die Experimente zeigten weiterhin, dass die Esterbindungen ausschließlich an der *w*-OH-Gruppe des Ceramid-Analogons gebildet wurde (Nemes *et al.*, 1999a) und auch nur an dem Analogon, das lang genug war (C_{34}), die Lipiddoppelschicht des Vesikels zu durchziehen. Ein kürzeres Ceramid (C_{16}) wurde nicht erkannt. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass die Ceramid-Kopfgruppe des Lipids ins Innere des Vesikels ragt, so dass eine andere Hydroxylgruppe nicht zugänglich ist.

Zwei der fünf veresterten Glutamine wurden ebenfalls als mögliche Lipidbindungsstellen identifiziert (Marekov und Steinert, 1998). Diese 5 Glutamine sind allerdings auch identisch mit jenen, die in einer anderen Arbeit als einzige Glutamine von der Transglutaminase 1 für Isodipeptidbindungen innerhalb von Involucrin benutzt wurden (Nemes *et al.*, 1999b).

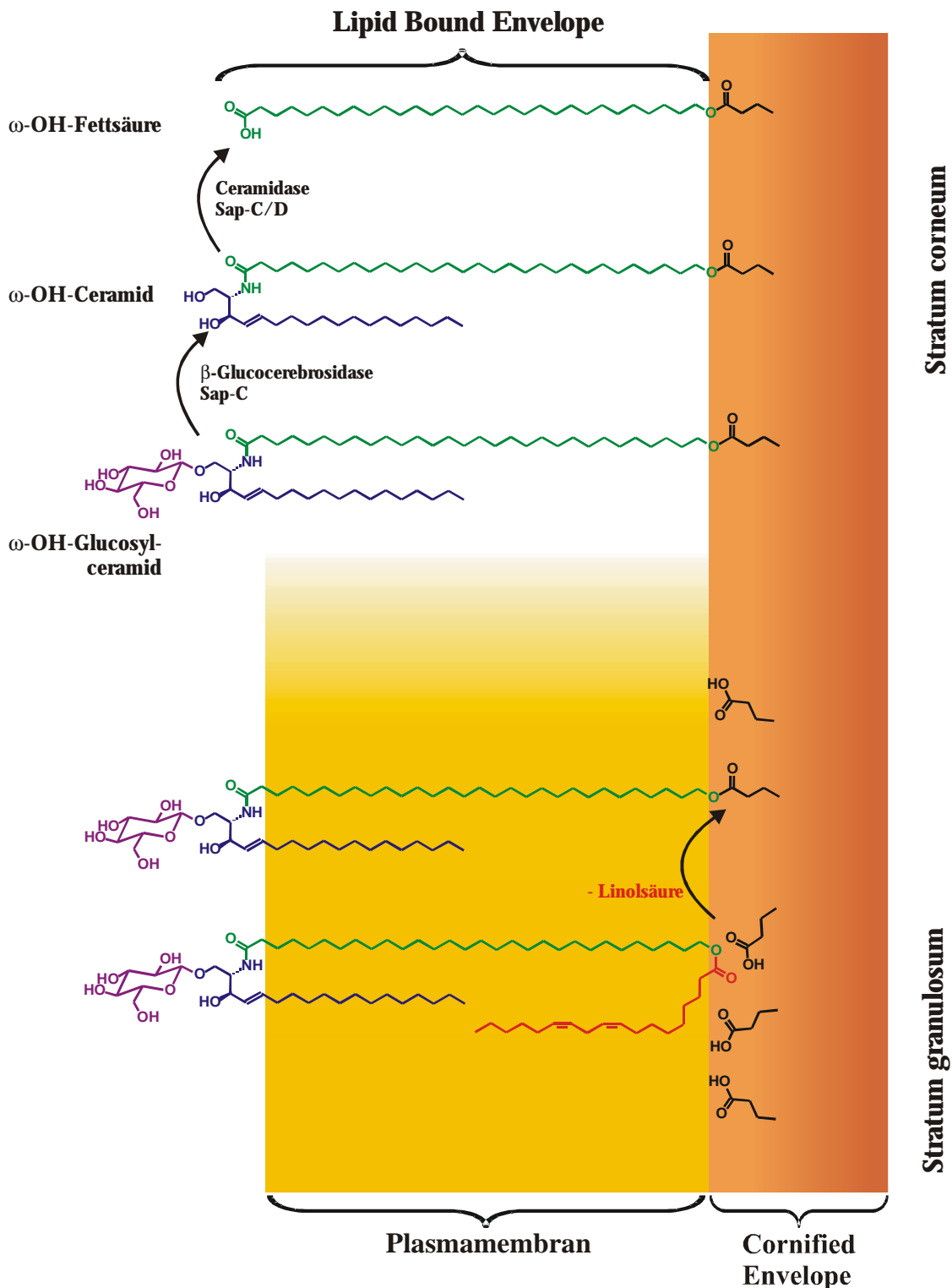


Abb. 6: Modell der Anbindung der ω -OH-Glucosylceramide an saure Aminosäureseitenketten des CE. Im Stratum granulosum durchspannen die ω -OH-Glucosylceramide die noch vorhandene Plasmamembran (gelb). Sie werden durch Umesterung an saure Aminosäureseitenketten des CE (orange) gebunden. Dabei fungiert Linolsäure (rot) als Abgangsgruppe. Beim Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum verschwindet die Plasmamembran und an ihre Stelle treten die proteingebundenen Lipide, der LBE. Die β -Glucoerebrosidase spaltet beim Übergang vom Stratum granulosum zu Stratum corneum mit Hilfe des Sphingolipid-Aktivator-Proteins C (Sap-C) vermutlich die Glucose (violett) ab, so dass ω -OH-Ceramide entstehen. Von diesen könnte die Ceramidase mit Hilfe von -C oder D die Sphingoidbase (blau) abspalten, so dass eine ω -OH-Fettsäure (grün) am CE-Protein gebunden bleibt.

2. Einleitung

Die an den CE gebundenen *w*-OH-Glucosylceramide werden vermutlich durch die *b*-Glucocerebrosidase (Glucosylceramid-*b*-glucosidase und das Sphingolipid-Aktivator-Protein C (Sap-C) zu *w*-Hydroxy-Ceramiden deglucosyliert (Abb. 5 und 6), wie es im Lysosom von Glucosylceramid bekannt ist (Ho und O'Brien, 1971; Wilkening *et al.*, 1998). In *knock out*-Mäusen führt das Fehlen von *b*-Glucocerebrosidase bzw. Prosaposin (Vorläuferprotein von Sap A, B, C und D) zu einer Akkumulation von *w*-OH-Glucosylceramid in der Epidermis. Dazu passend nimmt die Menge der *w*-OH-Ceramide ab (Holleran *et al.*, 1993; Doering *et al.*, 1999a; Doering *et al.*, 1999b). Die *b*-Glucocerebrosidase und das Sap-C können ebenfalls durch die Lamellar Bodies in den Extrazellulärraum gelangen, da Lamellar Bodies lysosomale Hydrolasen enthalten (Freinkel und Traczyk, 1985; Grayson *et al.*, 1985).

Die Ceramidase spaltet mit Hilfe von Sap-C oder Sap-D Ceramide in Fettsäure und Sphingosin (Klein *et al.*, 1994; Linke *et al.*, 2001). Analog könnten die gebundenen *w*-OH-Ceramide in *w*-OH-Fettsäuren überführt werden (Abb. 5 und 6).

Die von den Lamellar bodies ebenfalls in den Extrazellulärraum ausgeschütteten Glucosylderivate der frei extrahierbaren Ceramide werden vermutlich ebenfalls durch die *b*-Glucocerebrosidase und Sap-C deglucosyliert (Abb. 5 und 6) und könnten anschließend auch partiell durch Ceramidase und Sap-C oder Sap-D in die entsprechenden freien Fettsäuren überführt werden.

2.5 Die epidermale ω -Hydroxylase

Zur Biosynthese der ω -OH-Fettsäuren, -Ceramide und -Glucosylceramide muss die Existenz einer epidermalen ω -Hydroxylase gefordert werden, deren Substrate langkettige Fettsäuren, eventuell als Teil eines Ceramids oder Glucosylceramids, sind.

Häufig werden ω -Hydroxylierungen an langkettigen Fettsäuren von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert (Chuang *et al.*, 2004, Voet und Voet, 1994). Dabei handelt es sich um Häm-Proteine, die im endoplasmatischen Reticulum Oxidationen, vor allem Hydroxylierungen, katalysieren. Das bei der Hydroxylierung eingebaute Sauerstoffatom stammt aus molekularem Sauerstoff. Das andere Sauerstoffatom des O_2 -Moleküls wird zu Wasser reduziert. Die notwendigen Reduktionsäquivalente stammen von NADH oder NADPH und werden durch eine eigenständige Reduktase auf die Hämgruppe übertragen.

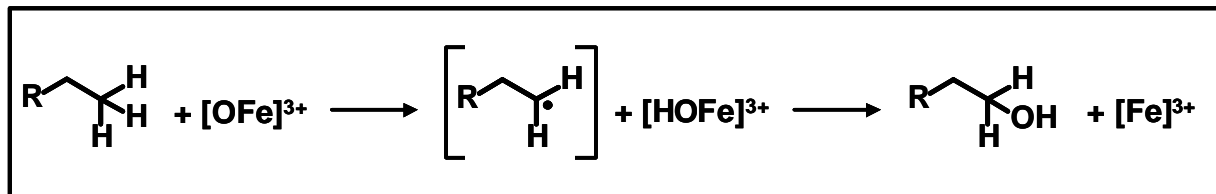


Abb. 7: Mechanismus der Alkan-Hydroxylierung (Sono *et al.*, 1996).

Durch die homolytische Spaltung der C-H-Bindung entsteht am Substrat ein Radikal, während das Wasserstoffatom auf die Hämgruppe übertragen wird. Durch Rekombination des Substratradikals mit der Hydroxylgruppe am Eisen der Hämgruppe bildet sich dann der Alkohol.

Die Cytochrom P450-katalysierte Alkan-Hydroxylierung beginnt mit der homolytischen Spaltung der C-H-Bindung (Abb. 7). Das Wasserstoffatom wird auf den Sauerstoff übertragen, der an das Eisen der Hämgruppe gebunden ist, das Substrat verbleibt als radikalische Zwischenstufe. Danach rekombiniert das Substrat-Radikal mit der Hydroxylgruppe am Eisen der Hämgruppe zum Alkohol (Sono *et al.*, 1996).

Ein häufig verwendeter Inhibitor von Cytochrom P450-Enzymen ist 1-Aminobenzotriazol (ABT, Abb. 8), das die Hämgruppe durch Arylierung blockiert (Dierks *et al.*, 1998; Ortiz de Montellano und Reich, 1984).

2. Einleitung

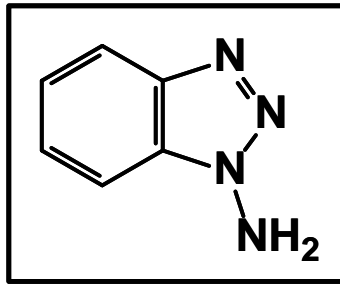


Abb. 8: 1-Aminobenzotriazol, ein Inhibitor von Cytochrom P450-Enzymen.

In humanen kultivierten Keratinozyten inhibiert ABT die Biosynthese von ω -OH-Fettsäuren und den entsprechenden ω -OH-Ceramiden und -Glucosylceramiden, wohingegen die Synthese von nicht hydroxylierten Fettsäuren und Ceramiden nicht beeinflusst wird (Behne *et al.*, 2000). Auch die Menge der gebildeten α -OH-Fettsäuren ändert sich nicht signifikant. Durch diese Ergebnisse wird die Vermutung verstärkt, dass es sich bei der epidermalen ω -Hydroxylase um ein Cytochrom P450-Enzym handelt, das durch ABT inhibiert wird. Auch die Barriereleistung der Haut sinkt bei Mäusen durch Auftragen von ABT auf die Haut beträchtlich (Behne *et al.*, 2000), was die Bedeutung dieses Enzyms für den Aufbau der Wasserbarriere belegt.

Beim Substrat der ω -Hydroxylase handelt es sich um langkettige Fettsäuren (C_{24} und länger), die noch nicht mit einer Sphingoidbase zum Ceramid verbunden sind, wie in Experimenten mit synthetischen Inhibitoren an kultivierten humanen Keratinozyten gezeigt wurde (Holleran, 1998).

2.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diejenigen Stellen an den Proteinen des CE identifiziert werden, an die die Lipide des LBE gebunden sind. Dazu sollte eine Methode entwickelt werden, mit der die Bindungsstellen möglichst vollständig einer massenspektrometrischen Identifizierung zugänglich gemacht werden können.

Zu diesem Zweck musste ein Verfahren entwickelt werden, mit dem der CE in Peptide gespalten werden kann. Seine hohe Quervernetzung verleiht dem CE eine extrem hohe Stabilität gegenüber Proteasen. Der LBE, der die Korneozyten umschließt, erschwert den Zugang zum CE zusätzlich. Einige Protein-Lipid-Bindungsstellen konnten identifiziert werden, nachdem der LBE partiell abgespalten worden war (Marekov und Steinert, 1998). Die partielle Abspaltung der Lipidhülle erleichtert zwar den Angriff von Proteasen, führt jedoch zu Informationsverlusten, da die Bindungsstellen nach der Esterspaltung nicht mehr zu erkennen sind. Ausgehend von der genannten Arbeit sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Methoden entwickelt werden, aus CE unter Erhalt aller Lipid-Bindungsstellen Peptide zu generieren, die eine solche Bindungsstelle enthalten. Diese Peptide sollten sich durch massenspektrometrische Analyse einem Protein zuordnen lassen. Außerdem sollte die Aminosäure, an die das Lipid gebunden war, eindeutig zu identifizieren sein.

Eine zweite Fragestellung betrifft die Identität der humanen epidermalen w-Hydroxylase. Um dieses Enzym isolieren und identifizieren zu können, sollte ein Suizidinhibitor entwickelt werden. Aufgrund der bisherigen Informationen über die w-Hydroxylase sollte es möglich sein, eine Struktur zu konzipieren, die das Enzym durch eine kovalente Bindung inhibiert. Dieses Zielmolekül sollte synthetisiert und seine Inhibitorwirkung an humanen Keratinozyten untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Suizidinhibitors der humanen epidermalen ω -Hydroxylase

Ein Suizidinhibitor ist eine relativ unreaktive Verbindung, die dem Substrat des zu inhibierenden Enzyms ähnlich ist und daher als Substrat erkannt wird. Durch das Enzym wird der Suizidinhibitor in eine reaktive Verbindung überführt. Diese Aktivierung erfolgt üblicherweise durch die vom Enzym katalysierte Reaktion, meistens durch deren Initialschritt. Die entstandene reaktive Zwischenstufe inhibiert dann das Enzym durch eine kovalente Bindung, häufig im aktiven Zentrum des Enzyms (Silverman, 1995).

3.1.1 Gestaltung eines potentiellen Suizidinhibitors der ω -Hydroxylase

Aufgrund der Existenz von ω -OH-Fettsäuren unter den Lipiden der Epidermis kann die Anwesenheit einer epidermalen ω -Hydroxylase postuliert werden. Die genaue Identität dieses Enzyms ist jedoch bisher nicht bekannt. Es gibt begründete Anhaltspunkte, dass es sich bei der ω -Hydroxylase um ein Cytochrom P450-Enzym handelt, dessen Substrate langkettige Fettsäuren (C_{24} und länger) sind (Holleran, 1998; Behne *et al.*, 2000). Deshalb ist eine langkettige Fettsäure (C_{24} und länger), die an der ω -Position funktionalisiert ist, als potentieller Suizidinhibitor der ω -Hydroxylase denkbar.

Cytochrom P450_{LAW} aus Rattenleber, das Laurinsäure (Dodecansäure) zu 12-OH-Dodecansäure oxidiert, wird durch 11-Dodecinsäure inhibiert (Ortiz de Montellano und Reich, 1984; CaJacob *et al.*, 1988). Dabei wird der Inhibitor an der ω -Position hydroxyliert, wie es dem Katalysemechanismus des Enzyms entspricht. Das entsprechende Inol lagert sich zum Keten um (Abb. 9), an das nucleophile Seitenketten (z.B. Aminogruppen) des Enzyms kovalent binden können (CaJacob *et al.*, 1988).

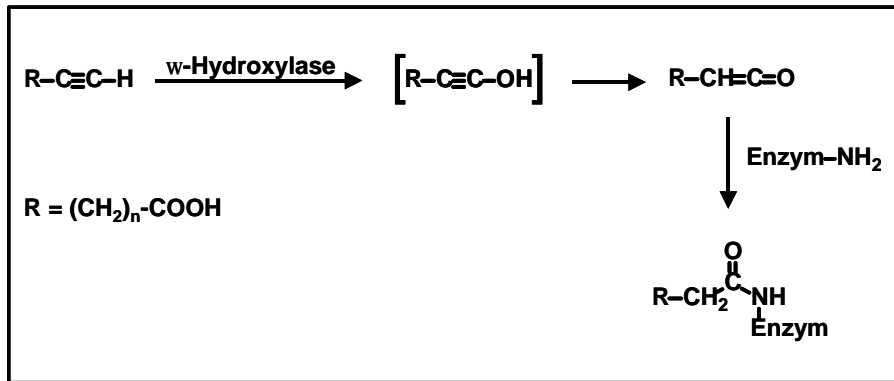


Abb. 9: Inhibierungsmechanismus einer ω -Hydroxylierung durch eine terminale Dreifachbindung. Das zu inhibierende Enzym, eine ω -Hydroxylase, hydroxyliert den Inhibitor in ω -Position, das entstandene Inol lagert zum Keten um und kann z.B. an eine Aminogruppe des Enzyms binden.

Daraus ergibt sich als möglicher Suizidinhibitor der epidermalen ω -Hydroxylase eine langkettige Fettsäure (C_{24} und länger) mit terminaler Dreifachbindung (Abb. 10).

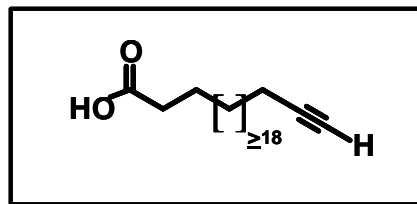


Abb. 10: Möglicher Suizidinhibitor der epidermalen ω -Hydroxylase. Die Fettsäure ist wie die Substrate mindestens 24 Kohlenstoffatome lang und trägt terminal eine Dreifachbindung.

Die optimale Kettenlänge des Zielmoleküls ist schwer einzuschätzen. Eine eher kurzkettige Fettsäure (C_{24}) ist eventuell zu kurz, um als Substrat erkannt zu werden, eine zu lange Fettsäure wird in Zellkultur schlechter von der Zelle aufgenommen. Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedlich lange Fettsäuren mit terminaler Dreifachbindung synthetisiert (Abb. 11): Tetrakos-11-en-23-insäure (IS-24) und Triacont-17-en-29-insäure (IS-30).

3. Ergebnisse

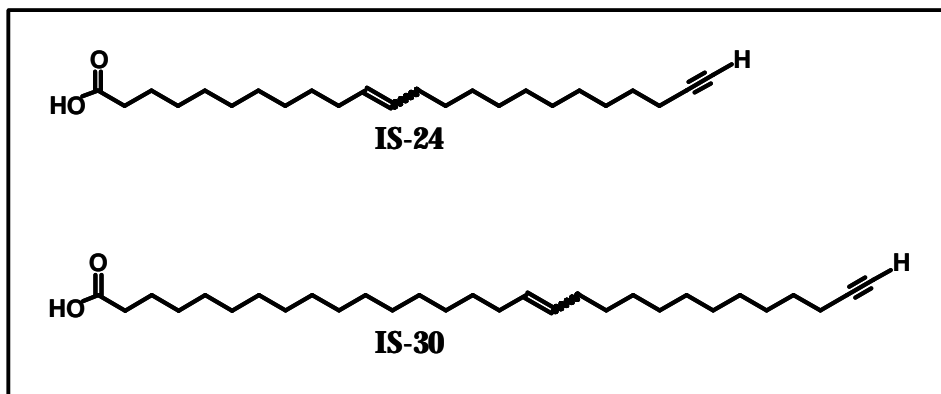


Abb. 11: Zielmoleküle, die als potentielle Suizidinhibitoren der epidermalen ω -Hydroxylase synthetisiert werden: Tetracos-11-en-23-insäure (IS-24) und Triacont-17-en-29-insäure (IS-30).

Die in den Zielmolekülen enthaltene Doppelbindung resultiert aus dem Syntheseweg und lässt sich in Anwesenheit der Dreifachbindung nicht ohne weiteres hydrieren. Da aber auch die ω -hydroxylierten Fettsäuren in den Ceramiden der Epidermis ungesättigte Fettsäuren enthalten (Marekov und Steinert, 1998), sollte dies die Inhibierungswirkung der Zielmoleküle nicht weiter beeinträchtigen.

3.1.2 Chemische Synthese der potentiellen Suizidinhibitoren

Der Baustein, der die Dreifachbindung in das Molekül einbringt, war für beide Zielmoleküle identisch (Abb. 12). Die Dreifachbindung entstand in einer Substitutionsreaktion durch einen nucleophilen Angriff von im Überschuss angebotenem Lithiumacetylid auf 11-Bromundecanol in 53 % Ausbeute (Smith und Beumel Jr., 1974). Das entstandene Tridec-12-in-1-ol (1) wurde durch eine Swern-Oxidation mit 51 % Ausbeute in den entsprechenden Aldehyd (2) überführt.

Die andere funktionelle Gruppe, die Carbonsäuregruppe, wurde als Methylester in den Reaktionsweg eingebracht und im letzten Schritt durch Verseifung freigesetzt (Abb. 13 und 14).

Das Hauptproblem der Synthese lag in der Länge der Fettsäureketten in den Zielmolekülen, die keine funktionellen Gruppen und damit keine retrosynthetischen Ansätze boten. Die Schlüsselreaktion zum Aufbau der Ketten war eine Wittig-Reaktion, bei der ein Aldehyd und ein Bromalkan unter Bildung einer C-C-Doppelbindung miteinander verknüpft wurden (Abb. 13 und 14).

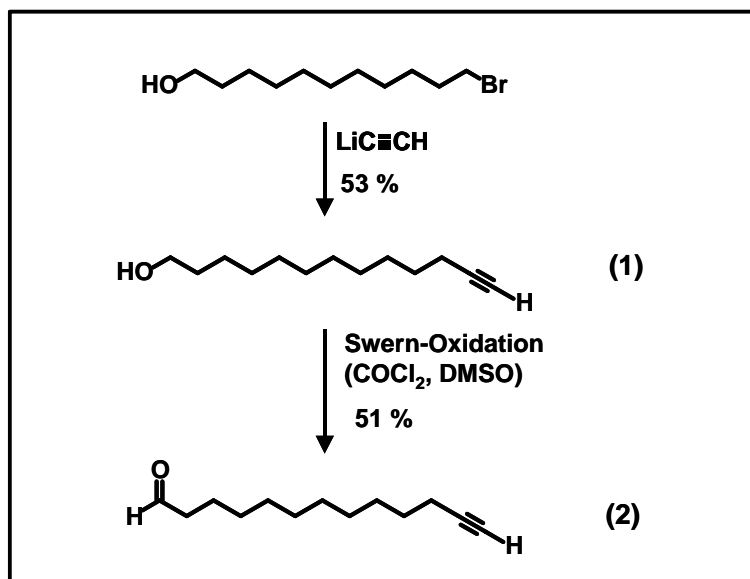


Abb. 12: Syntheschema des Bausteins (2), der die Dreifachbindung trägt.

Die Dreifachbindung wurde durch eine nucleophile Substitution durch Lithiumacetylid (Überschuß) an 11-Bromundecanol mit 53 % Ausbeute eingeführt. Danach wurde das entstandene Tridec-12-in-1-ol (1) durch eine Swern-Oxidation mit 51 % Ausbeute in den entsprechenden Aldehyd (2) überführt.

Zur Synthese des kürzeren Zielmoleküls IS-24 wurde käuflicher 11-Bromundecansäuremethylester mit Triphenylphosphin in das entsprechende Phosphoniumsalz überführt (Reist und Christie, 1970), mit Natrium-Hexamethyldisilazan (NHMDS) zum Ylid deprotoniert (Bestmann *et al.*, 1976) und durch eine Wittig-Reaktion mit dem Aldehyd (2) in das Olefin (3) überführt (Abb. 13). Dabei wurde der selbst synthetisierte Aldehyd im Unterschuss eingesetzt und Substanz (3) mit 32 % Ausbeute erhalten. Die Konfiguration der neu entstandenen Doppelbindung ließ sich nicht eindeutig bestimmen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum fallen die Signale der beiden olefinischen Protonen zusammen und ergeben ein gemeinsames Multiplett, das sich weder durch eine E- noch durch eine Z-Konfiguration erklären lässt. Daraus kann geschlossen werden, dass ein E/Z-Isomeren-Gemisch vorliegt. Es war jedoch nicht möglich, die Isomeren säulenchromatographisch voneinander zu trennen. Der Methylester (3) wurde mit methanolischer Kalilauge verseift und ergab mit 29 % Ausbeute die Säure IS-24 (Abb. 13).

3. Ergebnisse

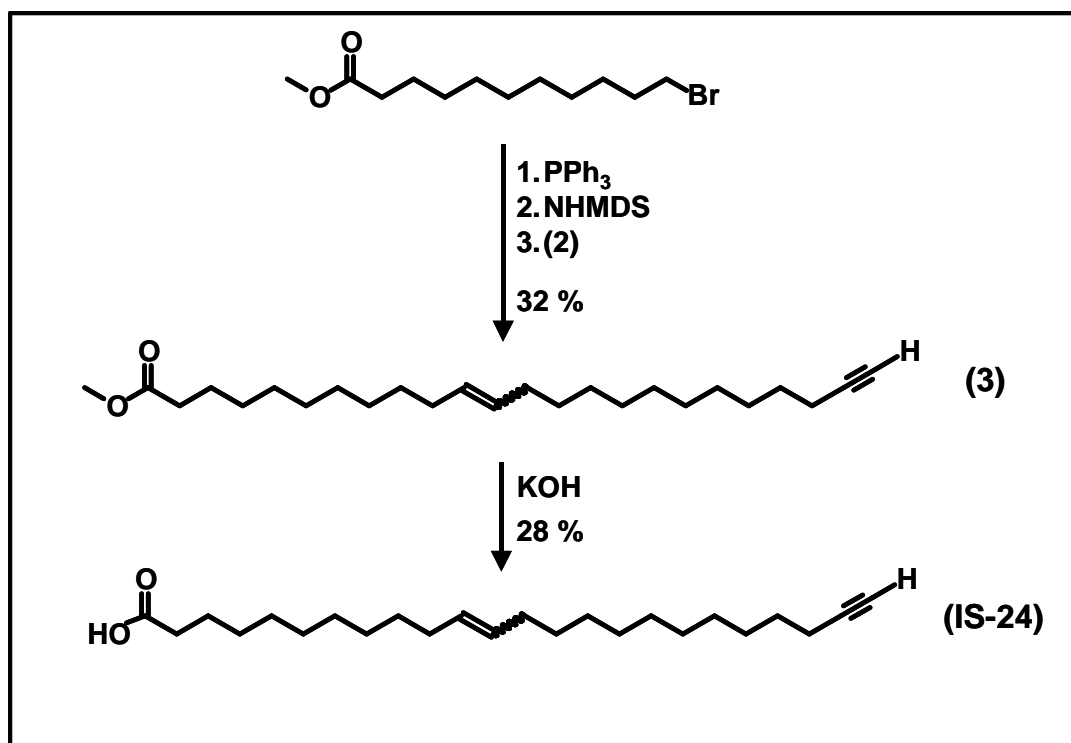


Abb. 13: Syntheschema des Zielmoleküls IS-24.

Zur Synthese des kürzeren Zielmoleküls IS-24 wurde 11-Bromundecansäuremethylester mit Triphenylphosphin in das entsprechende Phosphoniumsalz überführt, mit Natrium-Hexamethyldisilazan (NHMDS) zum Ylid deprotoniert und mit einer Ausbeute von 32 % durch eine Wittig-Reaktion mit dem Aldehyd (2) in das Olefin (3) überführt. Der Methylester (3) wurde mit methanolischer Kalilauge verseift und ergab mit 28 % Ausbeute die Säure IS-24.

Zur Synthese des längerkettigen Analogons IS-30 (Abb. 14) wurde der 11-Bromundecansäuremethylester um sechs Kohlenstoffatome verlängert. Dazu wurde 6-Bromhexanol in einer Swern-Oxidation zum entsprechenden Aldehyd (4) umgesetzt. Durch Wittig-Reaktion des Aldehyds (4) mit 11-Bromundecansäuremethylester entstand Verbindung (5). Durch Hydrierung der Doppelbindung in Verbindung (5) wurde 17-Bromheptadecansäuremethylester (6) als längerkettiges Analogon des 11-Bromundecansäuremethylesters in 7,5 % Ausbeute ausgehend von 6-Bromhexanol erhalten. Die Dreifachbindung wurde mittels einer weiteren Wittig-Reaktion zwischen Verbindung (6) und dem Aldehyd (2) eingeführt. Dabei entstand Verbindung (7) in 35 % Ausbeute. Die olefinischen Protonen im Ester spalteten im NMR-Spektrum in das gleiche Multipllett auf wie die in IS-24 bzw. die im entsprechenden Methylester (3). Auch Verbindung (7) liegt also als E/Z-Isomerengemisch vor, dessen Komponenten säulenchromatographisch nicht zu trennen waren. Der Methylester (7) wurde durch Verseifung mit 14 % Ausbeute in das zweite Zielmolekül IS-30 überführt.

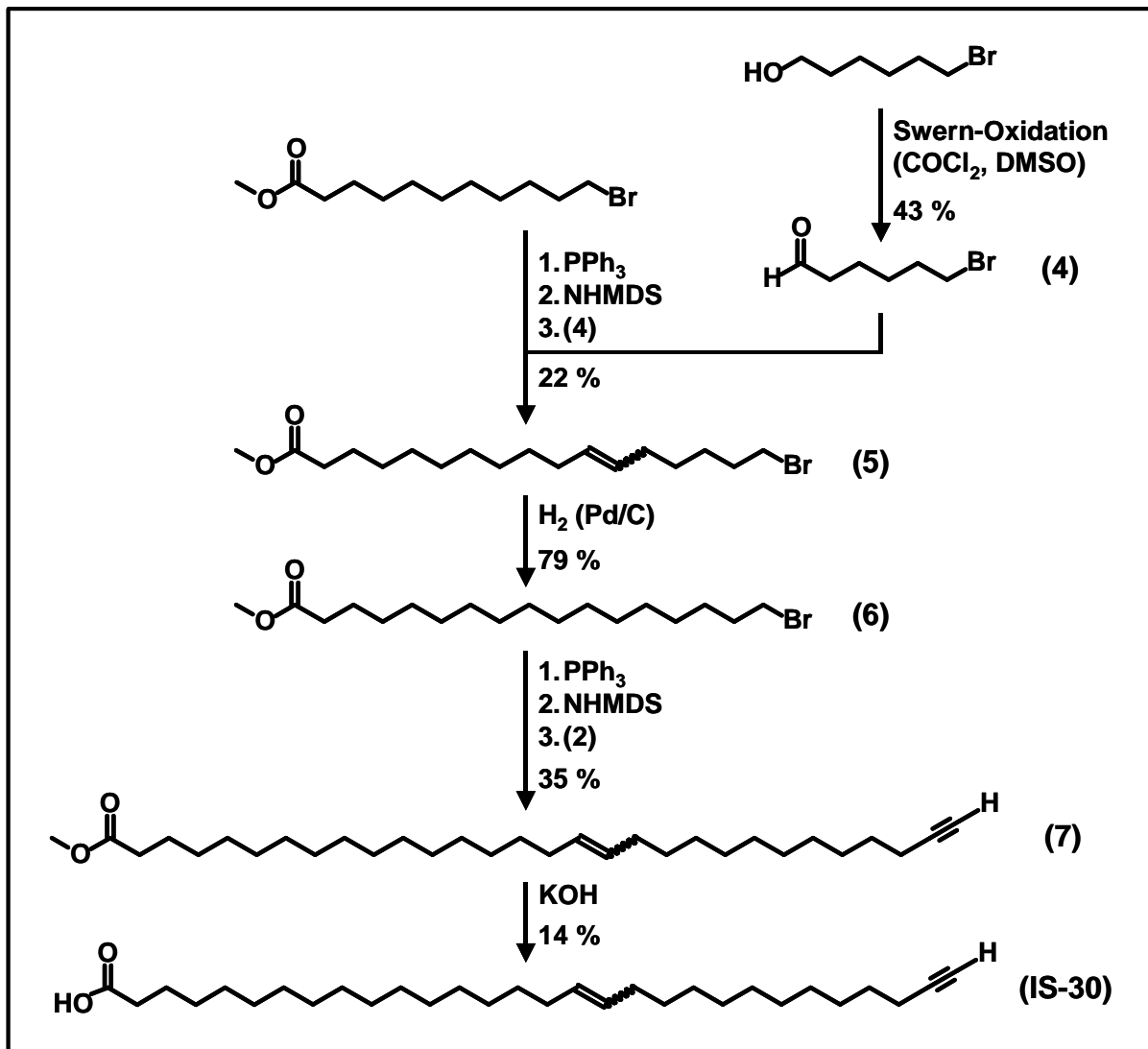


Abb. 14: Syntheschema des Zielmoleküls IS-30

6-Bromhexanol wurde durch eine Swern-Oxidation zum entsprechenden Aldehyd (**4**) oxidiert. Dieser wurde durch eine Wittig-Reaktion an 11-Bromundecansäuremethylester gebunden, so dass Substanz (**5**) entstand. Anschließend wurde die Doppelbindung hydriert und es entstand 17-Bromheptadecansäuremethylester (**6**) als längerkettiges Analogon des 11-Bromundecansäuremethylesters mit 7,5 % Ausbeute ausgehend von 6-Bromhexanol. Mittels einer erneuten Wittig-Reaktion wurde an Substanz (**6**) der Aldehyd (**2**) gebunden, so dass mit 35 % Ausbeute Substanz (**7**) entstand. Dieser Methylester wurde durch Verseifung mit 14 % Ausbeute in das zweite Zielmolekül IS-30 überführt.

3.1.3 Wirkung der potentiellen Suizidinhibitoren

Die potentiellen Suizidinhibitoren IS-24 und IS-30 sollten nun in Zellkultur auf ihre inhibierende Wirkung auf die humane epidermale ω -Hydroxylase getestet werden. Dazu wurden kultivierte humane Keratinozyten mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach Extraktion der Lipide aus dem Zellhomogenat wurde deren Verteilung dünnschicht-

3. Ergebnisse

chromatographisch analysiert Eine Inhibierung der ω -Hydroxylase sollte die Synthese von ω -OH-Ceramiden und damit auch von mit Linolsäure veresterten Ceramiden wie Cer (EOS), Cer (EOH) und Cer (EOP) hemmen.

Zur Stimulation der Biosynthese der komplexen Ceramide wurden die Keratinozyten durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Medium von 0,1 mM auf 1,1 mM und Zusatz von 10 μM Linolsäure zur Differenzierung angeregt (Döring, 1999; Breiden, 2003; Gallala *et al.*, 2004). Nach 24-stündiger Vorinkubation mit den in Ethanol gelösten Inhibitoren wurden die Ceramide durch Fütterung von $[3\text{-}^3\text{H}]$ -Sphingosin in Gegenwart der Inhibitoren metabolisch markiert. Da die Zellen nur für 2 h mit $[3\text{-}^3\text{H}]$ -Sphingosin inkubiert wurden, war zu erwarten, dass nur die Sphingosin-haltigen Ceramide Cer (EOS), Cer (NS) und Cer (AS) markiert werden würden. Als Negativkontrollen in der Dünnschichtchromatographie (Abb. 15) dienten Lipidextrakte aus Keratinozyten, denen kein Inhibitor zugesetzt wurde (Abb. 15, Bahn 3) und Keratinozyten, deren Medium mit 0,5 % Ethanol versetzt wurde (Bahn 1). Dies entspricht der Menge an Ethanol bei der höchsten Inhibitorkonzentration von 50 μM . Als Positivkontrolle (Bahn 2) wurden die Lipide aus unbehandelten Keratinozyten alkalisch hydrolysiert, wobei alle mit Linolsäure veresterten Ceramide gespalten wurden. Eine weitere Positivkontrolle bestand aus dem Lipidextrakt aus Zellen, die mit 10 mM ABT inkubiert wurden (Bahn 10). ABT ist ein bekannter Inhibitor von Cytochrom P450-Enzymen, inhibiert also auch die postulierte ω -Hydroxylase (Behne *et al.*, 2000).

Abb. 15 zeigt die dünnschichtchromatographische Analyse der Lipide aus differenzierten Keratinozyten unter Einfluss von Testsubstanz IS-24. Aufgetragen wurden Lipidmengen, die gleichen Proteinmengen entsprachen. Da sowohl die Einbaurate von $[3\text{-}^3\text{H}]$ -Sphingosin als auch das Verhältnis von Radioaktivitäts- zu Proteinmenge in allen Proben vergleichbar war, wurden damit auch etwa gleiche Mengen an Radioaktivität aufgetragen. In beiden Negativkontrollen (Bahn 1 und 3) ist deutlich die Bande von Cer (EOS) zu sehen, die durch alkalische Hydrolyse erwartungsgemäß verschwand (Bahn 2). Durch Zugabe von IS-24 in mikromolaren Konzentrationen nahm die Menge an Cer (EOS) ab, ebenso durch Zugabe von 10 mM ABT.

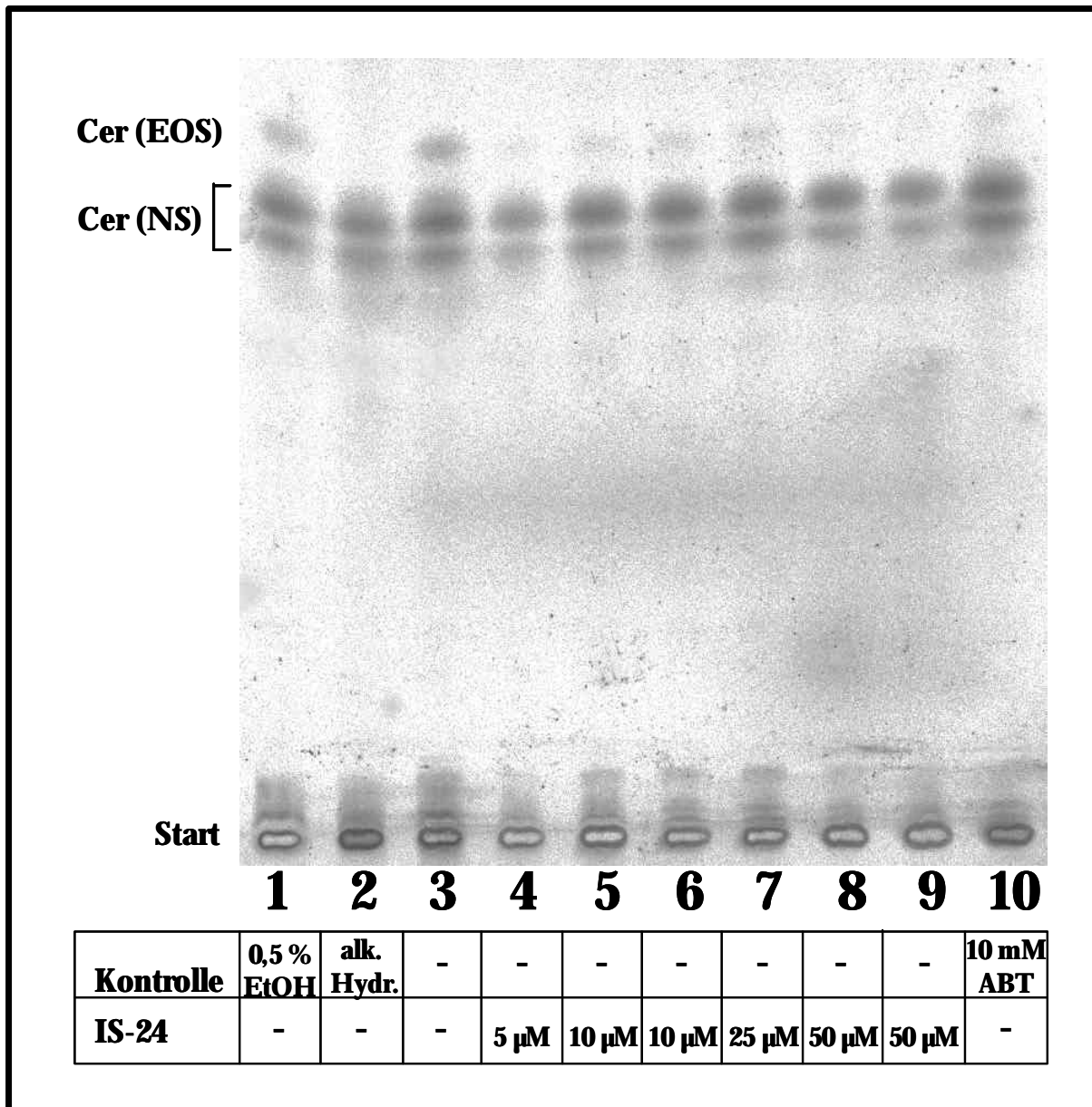


Abb. 15: Wirkung von IS-24 auf das Lipidmuster differenzierter kultivierter Keratinozyten.

Differenzierte kultivierte Keratinozyten wurden über 24 h mit IS-24 inkubiert und anschließend für 2 h zusätzlich mit [^3H]-Sphingosin metabolisch markiert. Die Lipide wurden extrahiert und dünnschichtchromatographisch analysiert, indem gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden und die Platte zweimal in Chloroform/Methanol/Essigsäure 190/9/1 (v/v/v) entwickelt wurde. Die Identifizierung der Lipidbanden erfolgte durch authentische Standards.

Als Negativkontrollen dienten Lipidextrakte aus Keratinozyten, denen nichts zugesetzt wurde (Bahn 3) und Keratinozyten, deren Medium mit 0,5 % Ethanol versetzt wurde (Bahn 1). Dies entspricht der Menge an Ethanol im Medium bei der höchsten Inhibitorkonzentration von 50 μM . Als Positivkontrolle (Bahn 2) wurden die Lipide aus unbehandelten Keratinozyten alkalisch hydrolysiert, wobei alle mit Linolsäure veresterten Ceramide gespalten wurden. Eine weitere Positivkontrolle bestand aus Lipidextrakten aus Zellen, die mit ABT inkubiert wurden (Bahn 10), einem Inhibitor von Cytochrom P450-Enzymen und damit auch der postulierten ω -Hydroxylase (Behne *et al.*, 2000).

3. Ergebnisse

In Abb. 16 ist die quantitative Auswertung der Fütterungsstudien mit beiden Testsubstanzen, IS-24 und IS-30, dargestellt. Als Bezugsgröße wurde jeweils die Menge an markiertem Cer (EOS) der völlig unbehandelten Keratinozyten (Abb. 15, Bahn 3) gewählt. Da bei der Probe mit 5 μM IS-24 (Bahn 4) offensichtlich weniger Radioaktivität aufgetragen wurde und diese Probe ebenso wie die Probe mit 25 μM IS-24 nicht als Doppelbestimmung vorlag, wurden sie in die Quantifizierung nicht mit eingeschlossen. Die Positivkontrollen (Bahn 2 und 10) lagen ebenfalls nur als Einzelbestimmungen vor. Für die Auswertung wurden je beide Werte für 10 μM und 50 μM Inhibitorzusatz sowie beide Negativkontrollen (Bahn 1 und 3) herangezogen.

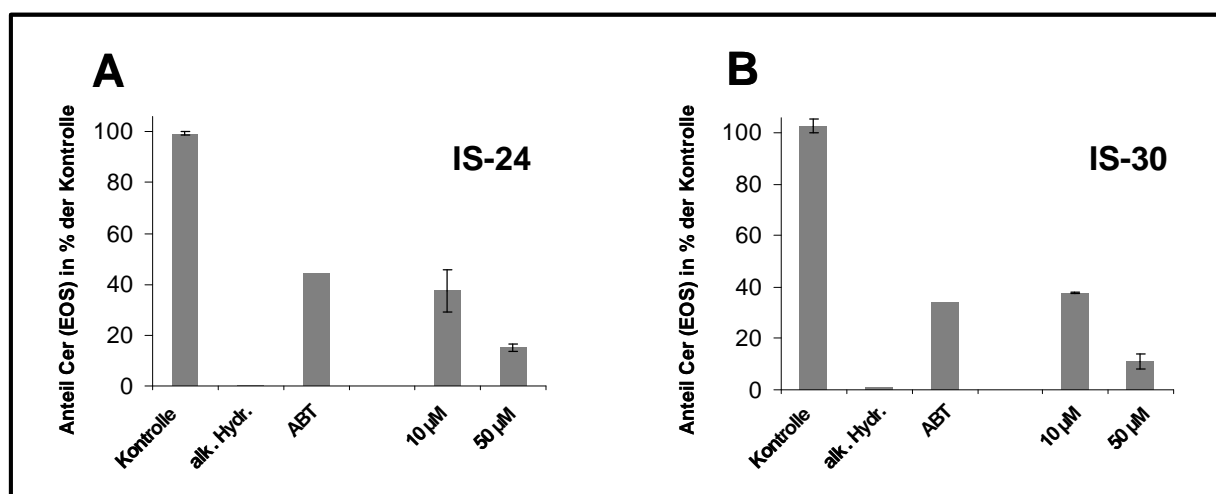


Abb. 16: Inhibierungswirkung beider Testsubstanzen, IS-24 (A) und IS-30 (B) auf die ω -Hydroxylase. Beide Substanzen wurden wie bei Abb. 15 beschrieben an humanen kultivierten Keratinozyten getestet. Als Maß für die Inhibierungswirkung der Substanzen dient die Abnahme der Menge von Cer (EOS). Die Werte für die Positivkontrollen (alk. Hydr. und ABT) sind Einzelbestimmungen, die anderen Werte sind Mittelwerte \pm max. Abweichung ($n = 2$).

Die Zugabe beider Testsubstanzen bewirkte eine deutliche Abnahme der Menge an neu synthetisiertem Cer (EOS). Steigende Konzentrationen der Testsubstanzen bewirkten dabei auch eine stärkere Hemmung der ω -Hydroxylase. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM im Medium wird die Aktivität des Enzyms um etwa 60 % gesenkt. Um einen ähnlich starken Effekt zu erzielen, muss ABT in einer 1000 mal höheren Konzentration, nämlich 10 mM, eingesetzt werden.

Eine noch stärkere Reduktion der Hydroxylaseaktivität um rund 80 % kann durch Einsatz der Inhibitoren IS-24 und IS-30 in einer Konzentration von 50 μM im Medium erreicht werden.

3.2 Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen

3.2.1 Vorarbeiten

Zur Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen war anfangs geplant, SC zu isolieren (Breiden, 2003), proteolytisch zu spalten und die entstandenen Lipopeptide vor und nach Abspaltung der gebundenen Lipide massenspektrometrisch zu analysieren.

In Vorversuchen an sehr kleinen Mengen SC konnten jedoch durch gängige proteolytische Verfahren keine sequenzierbaren Peptide nachgewiesen werden, da der CE aufgrund seines hohen Grades an Quervernetzungen durch Disulfidbrücken und Isodipeptidbindungen gegenüber Proteasen weitgehend stabil ist.

Auch eine chemische Spaltung mit Perfluorbuttersäuredampf, der unter geeigneten Bedingungen spezifisch Peptidbindungen spaltet (Kawakami *et al.*, 1997), blieb erfolglos.

Die reduktive Spaltung der Peptid- und Esterbindungen mit Lithiumborhydrid (Arbatsky *et al.*, 1988) lieferte ebenfalls keine analysierbaren Peptide, was wahrscheinlich wiederum auf die hohe Vernetzung des CE zurückzuführen ist. Zwar sind die äußeren Bereiche des CE dem Reagenz leicht zugänglich und werden daher sehr rasch gespalten. Auch werden die daraus entstandenen Fragmente leicht z.T. in Aminosäuren bzw. deren Derivate zerlegt. Die inneren Bereiche des CE hingegen sind noch so stark abgeschirmt, dass die Reagenzien nicht zu ihnen vordringen können.

Parallel durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass von einigen mg SC durch einen hochdosierten tryptischen Verdau (5 % (w/w)) über 48 h nachweisbare Mengen an Peptiden generiert werden konnten. Eine Quantifizierung der Peptide ergab, dass pro eingesetztem mg SC (Trockengewicht) etwa 0,60 – 0,65 mg Peptid freigesetzt wurden. Dies entspricht einer Ausbeute von 60 – 65 %. Zur Quantifizierung der erhaltenen Peptide wurden diese hydrolysiert und die entstandenen Aminosäuren mit Ninhydrin angefärbt.

Trypsin ist eine Serin-Protease, die Peptide hochspezifisch C-terminal von Lysin und Arginin schneidet. Um die Effektivität der proteolytischen Spaltung zu steigern, wurden die Ausbeuten beim Verdau mit Thermolysin und Proteinase K untersucht. Bei Proteinase K handelt es sich um eine Serin-Protease, die Peptidstränge unspezifisch schneidet. Thermolysin ist eine Metalloendopeptidase mit geringer Spezifität. Sie schneidet N-terminal von Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Methionin.

3. Ergebnisse

Wegen der geringeren Spezifität dieser Enzyme sollte die Anzahl der möglichen Angriffspunkte im CE und damit die Effektivität des Verdau gesteigert werden.

Beim Verdau mit Thermolysin betrug die Ausbeute weniger als 50 %, mit Proteinase K konnten Werte von über 95 % erreicht werden. Die Peptide waren allerdings zu kurz für eine Sequenz-Analyse.

Mit dem Ziel, die Ausbeute der tryptischen Spaltung weiter zu steigern, wurde vor dem Verdau eine Bromcyan-Spaltung über 24 h in 70 %iger Ameisensäure durchgeführt. Durch Ameisensäure werden Peptide jedoch unspezifisch formyliert, wodurch deren Massen um 28 amu zunehmen. Durch eine andere Modifikation, bei der z.B. die N-terminale Aminogruppe eines Peptids in ein Methanimin überführt wird, nimmt die Masse um 12 amu zu. Da diese Modifikationen die massenspektrometrische Analyse von unbekanntem Peptiden erheblich stören, wurde Ameisensäure durch Trifluoressigsäure (TFA) ersetzt. Die Ausbeute des Verdau ließ sich jedoch durch die Bromcyanspaltung unabhängig von der verwendeten Säure nicht steigern. Die Quantifizierung der Menge der abgespaltenen Peptide ergab Ausbeuten zwischen 50 und 70 %.

Ferner zeigte sich, dass die Bedingungen der Bromcyanspaltung eine Zerstörung der Ceramide bewirkten. Drei verschiedene Ceramidstandards, Cer (NS), Cer (NP) und Cer (AP) wurden jeweils den Bedingungen der Bromcyanspaltung mit Trifluoressigsäure unterworfen. Das Reaktionsgemisch wurde über RP-18-Säulchen entsalzt (Williams und McCluer, 1980) und dünnschichtchromatographisch analysiert (Abb. 17, Bahn 4, 6 und 8). Um sicherzugehen, dass die Nachweisgrenze nicht unterschritten wurde, wurde Cer (NS) zusätzlich in fünffacher Menge eingesetzt und das entsalzte Reaktionsgemisch aufgetragen (Bahn 9). Als Vergleichssubstanzen wurden die eingesetzten Ceramide und die in ihnen enthaltenen Fettsäuren und Sphingoidbasen verwendet (Bahn 3, 5 und 7). Die aufgetragene Menge der Standards entsprach der bei der Bromcyanspaltung eingesetzten Menge. Um Verunreinigungen durch die eingesetzten Chemikalien zu identifizieren, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde ein Reaktionsgefäß lediglich mit Lösungsmittel befüllt. Diese Lösung wurde analog zu den Proben entsalzt und aufgetragen (Bahn 1). Zum anderen wurden alle Reagenzien der Bromcyanspaltung in Abwesenheit eines Ceramids gemischt, entsalzt und aufgetragen (Bahn 2).

In beiden Kontrollen sind Banden in Höhe der Fettsäuren und darüber zu sehen. Diese Banden finden sich auch in den Proben und stammen demnach nicht aus ihnen selbst. Sie können aber u.U. an dieser Stelle Banden aus den Proben überlagern.

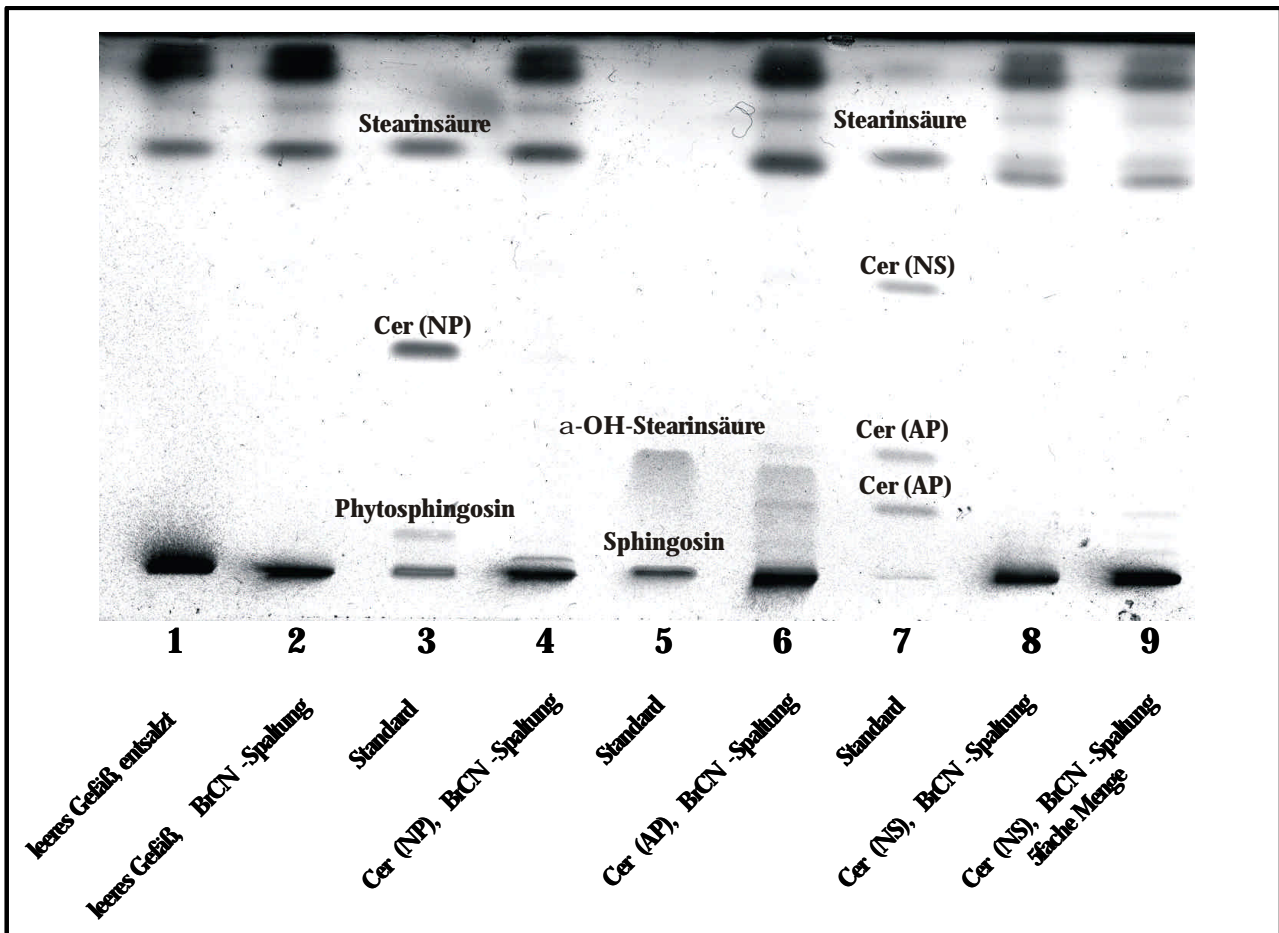


Abb. 17: Verhalten der Ceramide unter den Bedingungen der Bromcyanspaltung.

Die Ceramide Cer (NS) (Bahn 8 und 9), Cer (NP) (Bahn 4) und Cer (AP) (Bahn 6) wurden den Bedingungen der Bromcyanspaltung unterworfen und dünnschichtchromatographisch analysiert. Auf Bahn 9 wurde die fünffache Menge an Cer (NS) eingesetzt. Als Vergleichssubstanzen wurden die eingesetzten Ceramide, ihre Fettsäuren und Sphingoidbasen verwendet (Bahn 3, 5 und 7). Die aufgetragene Menge der Ceramid-Standards entspricht der bei der Bromcyanspaltung eingesetzten Menge. Zu den Kontrollen s. Text.

Die Platte wurde zweimal in Chloroform/Methanol/Eisessig 190/9/1 (v/v/v) entwickelt.

Cer (NP) ist nach der Bromcyanspaltung nicht mehr nachweisbar (Bahn 4). Bei der Spaltung der Amidbindung entstünden Stearinsäure und Phytosphingosin. Phytosphingosin kann nicht nachgewiesen werden, evtl. entstandene Stearinsäure wird durch die Verunreinigungen überlagert.

Cer (NS) wurde ebenfalls unter den Bedingungen der Bromcyanspaltung zerstört (Bahn 8 und 9). Auch im fünffach größeren Ansatz ist kein Cer (NS) zu detektieren (Bahn 9). Die durch die Spaltung der Amidbindung entstandene Stearinsäure ist als schwächere Bande oberhalb der Bande der Verunreinigung zu sehen. Die entsprechende Sphingoidbase, Sphingosin, bleibt im verwendeten Laufmittel am Startfleck liegen und kann daher so nicht identifiziert werden.

3. Ergebnisse

Das käufliche Cer (AP) bildet eine Doppelbande (Bahn 7). Im Massenspektrum findet man jedoch nur eine Masse, 600,56 Da ($[M+H]^+$). Demzufolge handelt es sich wahrscheinlich um ein Gemisch von Stereoisomeren. Nach der Bromcyanbehandlung sind beide Banden in der Dünnschichtchromatographie noch nachweisbar, aber deutlich schwächer (Bahn 6). Die amidgebundene Fettsäure, α -Hydroxy-Stearinsäure, ist als Reaktionsprodukt zu erkennen. Die Sphingoidbase, Phytosphingosin, ist nicht eindeutig nachweisbar.

Da die Peptidausbaute des tryptischen Verdaus durch eine vorhergehende Bromcyanpaltung nicht gesteigert werden kann, und außerdem Ceramide unter den Bedingungen der Bromcyanpaltung zerstört werden, wurde auf diese Methoden in Folgenden verzichtet.

3.2.2 Abspalten der proteingebundenen Lipide unter Markierung ihrer Bindungsstellen

Die proteingebundenen Lipide sind sehr heterogen, denn sie variieren bzgl. Kettenlänge, Hydroxylierungs- und Sättigungsgrad sehr stark (s. Kap. 2.4). Die Analyse eines unbekanntes Peptids, an das ein solches Lipid gebunden ist, ist sehr komplex. Um die Analyse dieser heterogenen Lipopeptide zu erleichtern, ist es notwendig, die Lipide abzuspalten und die Aminosäuren, mit denen sie kovalent verknüpft sind, während des Abspaltens zu markieren.

3.2.2.1 Reduktive Spaltung der Esterbindung

Natriumborhydrid reduziert Esterbindungen in Gegenwart von Lithiumbromid selektiv unter Erhalt anwesender Amidbindungen (He *et al.*, 2000). Aus dem Ester entstehen dabei die entsprechenden Alkohole.

Führt man diese Spaltung mit $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$ an Lipopeptiden durch, so wird die veresterte Glutamat-Seitenkette in einen $[^3\text{H}]$ -markierten Alkohol überführt (Abb. 18).

Eine humane SC-Probe wurde mit $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$ in Gegenwart von Lithiumbromid reduziert und über 48 h mit Trypsin verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden über RP-

HPLC getrennt. Jedoch konnte in keiner der HPLC-Fractionen eine signifikant erhöhte Radioaktivität detektiert werden. Durch die anschließende massenspektrometrische Analyse ließen sich keine sequenzierbaren Peptide detektieren.

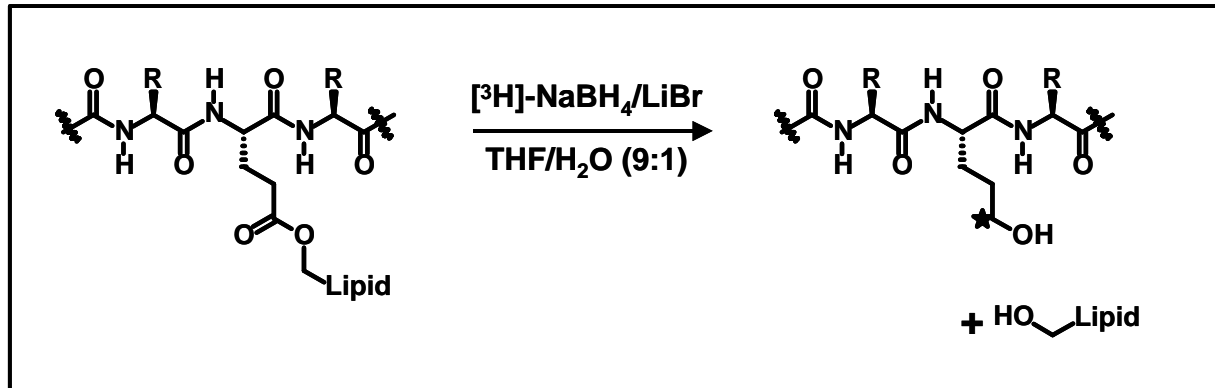


Abb. 18: Reduktion der Protein-Lipid-Esterbindung durch $[^3\text{H}]\text{-NaBH}_4$.

Man erhält das freie $\omega\text{-OH}$ -Lipid und aus dem veresterten Glutamat den entsprechenden $[^3\text{H}]$ -markierten Alkohol. Die radioaktive Markierung ist durch den Stern gekennzeichnet.

Eine nachfolgende Untersuchung der Reduktion an veresterten Modellpeptiden ergab, dass zwar hauptsächlich die Esterbindung reduziert wird, in Nebenreaktionen jedoch auch Peptidbindungen reaktiv gespalten werden. Zum einen ändern sich durch diese Reduktion die Massen der betroffenen Aminosäuren, was eine massenspektrometrische Analyse erschwert, zum anderen ist auch bei diesem Ansatz davon auszugehen, dass analog zu der Reduktion mit Lithiumborhydrid (Kap. 3.2.1) die äußeren Bereiche des CE bereits vollständig gespalten und z.T. in Aminosäuren bzw. deren Reduktionsprodukte zerlegt wurden, während die inneren Bereiche noch intakt sind.

3.2.2.2 Umesterung vom Lipidester zum Methylester

Durch eine Umesterung mit Natriummethanolat sollten die Glutaminsäurelipidester in Glutaminsäuremethylester überführt werden (Abb. 19). Die Masse eines Glutaminsäuremethylesters unterscheidet sich von den Massen aller anderen Aminosäuren und kann somit massenspektrometrisch leicht detektiert werden.

3. Ergebnisse

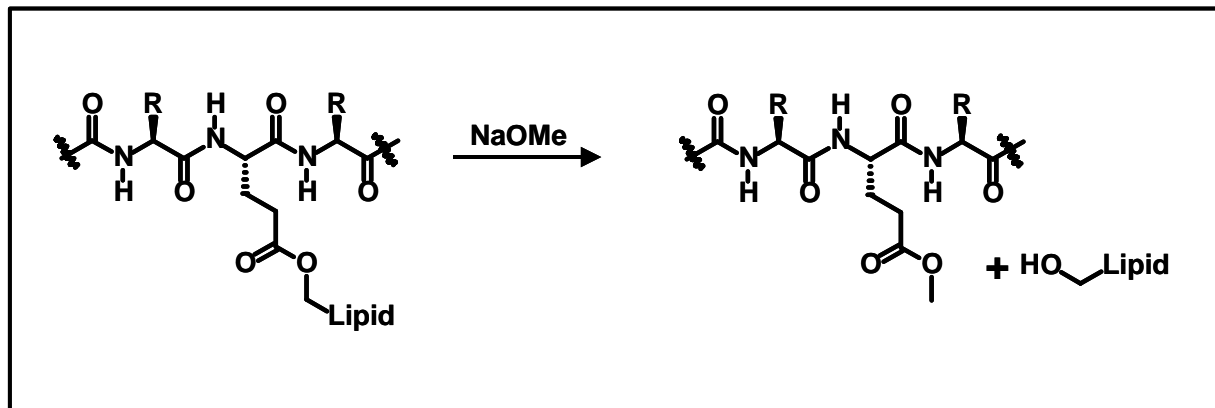


Abb. 19: Umesterung vom Glutaminsäurelipidester zum Glutaminsäuremethylester mit Natrium-methanolat.

Es muss sichergestellt sein, dass bei der Umesterung keine freien Glutaminsäuren oder Glutamine verestert werden. Dies sollte anhand der Umesterung eines käuflichen Modellpeptids (Modellpeptid A, Abb. 20), das neben einem Glutaminsäurebenzylester mehrere freie Glutaminsäurereste und ein Glutamin enthält, gezeigt werden.

Da Wasser im basischen Milieu der Umesterung zur Esterverseifung führt, wurde die Umesterung unter Inertbedingungen durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h erhält man als Hauptprodukt der Reaktion den erwarteten Methylester, dessen MS/MS-Spektrum in Abb. 20 B dargestellt ist. Im Spektrum ist der Glutaminsäuremethylester mit einer Fragmentmasse von 143,06 amu eindeutig zu detektieren.

Nebenprodukte entstehen durch Reaktionen am benzylierten Cystein-Rest. Dieser kann während der Aufarbeitung am Schwefel oxidiert werden, ebenso wie es von Methionin bekannt ist (Voet und Voet, 1994). Ferner kann unter den basischen Bedingungen der Umesterung eine Eliminierung stattfinden, bei der Benzylmercaptan eliminiert wird und ein Dehydroalanin entsteht (Jones *et al.*, 1983; Nakanishi *et al.*, 2004). Sowohl die Oxidation am Schwefel als auch die Eliminierung konnten während der Umesterung beobachtet werden. Andere Nebenreaktionen, vor allem an freien Glutamaten oder Glutaminen, fanden nicht statt. Da die Oxidation am Benzylcystein für die Überführung der Lipid- in die Methylester nicht von Bedeutung ist, erschien diese Methode zur Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen geeignet.

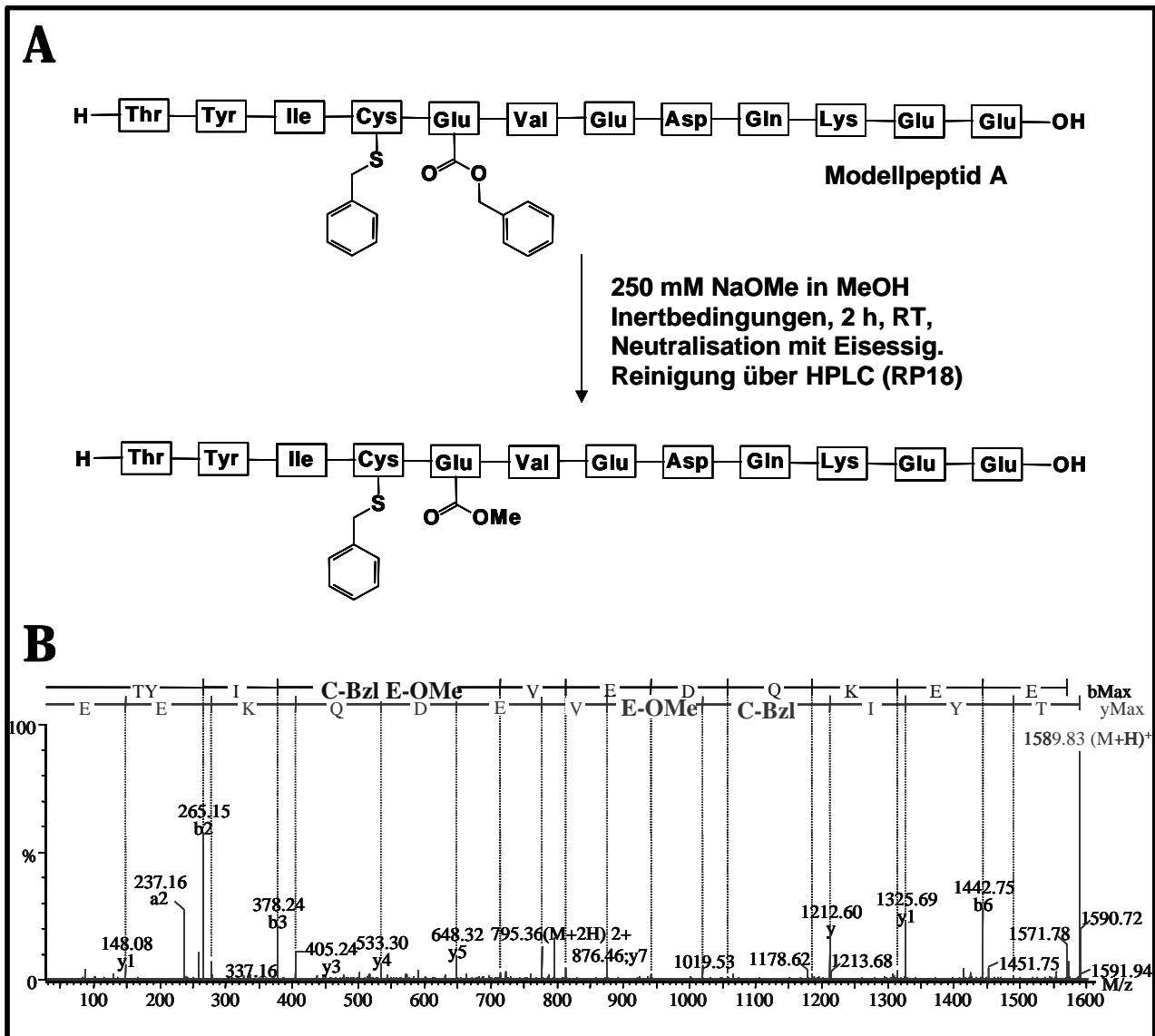


Abb. 20: Umesterung an Modellpeptid A (A).

Unter den angegebenen Bedingungen reagiert nur der Glutaminsäurebenzylester, ebenfalls im Peptid vorhandene freie Glutamat- oder Glutaminreste bleiben unverändert. Im ESI-QToF-MS/MS-Spektrum (B) erkennt man die y- und die b-Serie des entstandenen Peptids mit dem gut zu identifizierenden Glutaminsäuremethylester.

Wird die Reaktionszeit der Umesterung von 2 h auf 24 Stunden erhöht (Abb. 20), erhält man nur ein einziges Produkt mit der Masse 987,39 Da ($[M+H]^+$), dessen MS/MS-Spektrum in Abb. 21 B gezeigt ist. Man findet die b-Serie, die vom C-Terminus des Peptids bis zum Valin reicht. Es verbleibt ein b1-Ion mit der Masse 112,04 amu, dessen Struktur in Abb. 21 C dargestellt ist. Offensichtlich wurde der Peptidstrang N-terminal neben dem veresterten Glutamat gespalten. Da diese Spaltung an keiner anderen Stelle im Peptid auftritt, ist davon auszugehen, dass sie spezifisch für Glutaminsäureester ist. Damit kann diese Spaltung als Affinitätsspaltung angesehen werden. Nähere

3. Ergebnisse

Untersuchungen der Spaltung ergaben, dass sich nach Zugabe von Natriummethanolat erst sehr rasch der Methylester bildet, aus dem später die Produkte der Affinitätsspaltung entstehen (Sawatzki *et al.*, 2005).

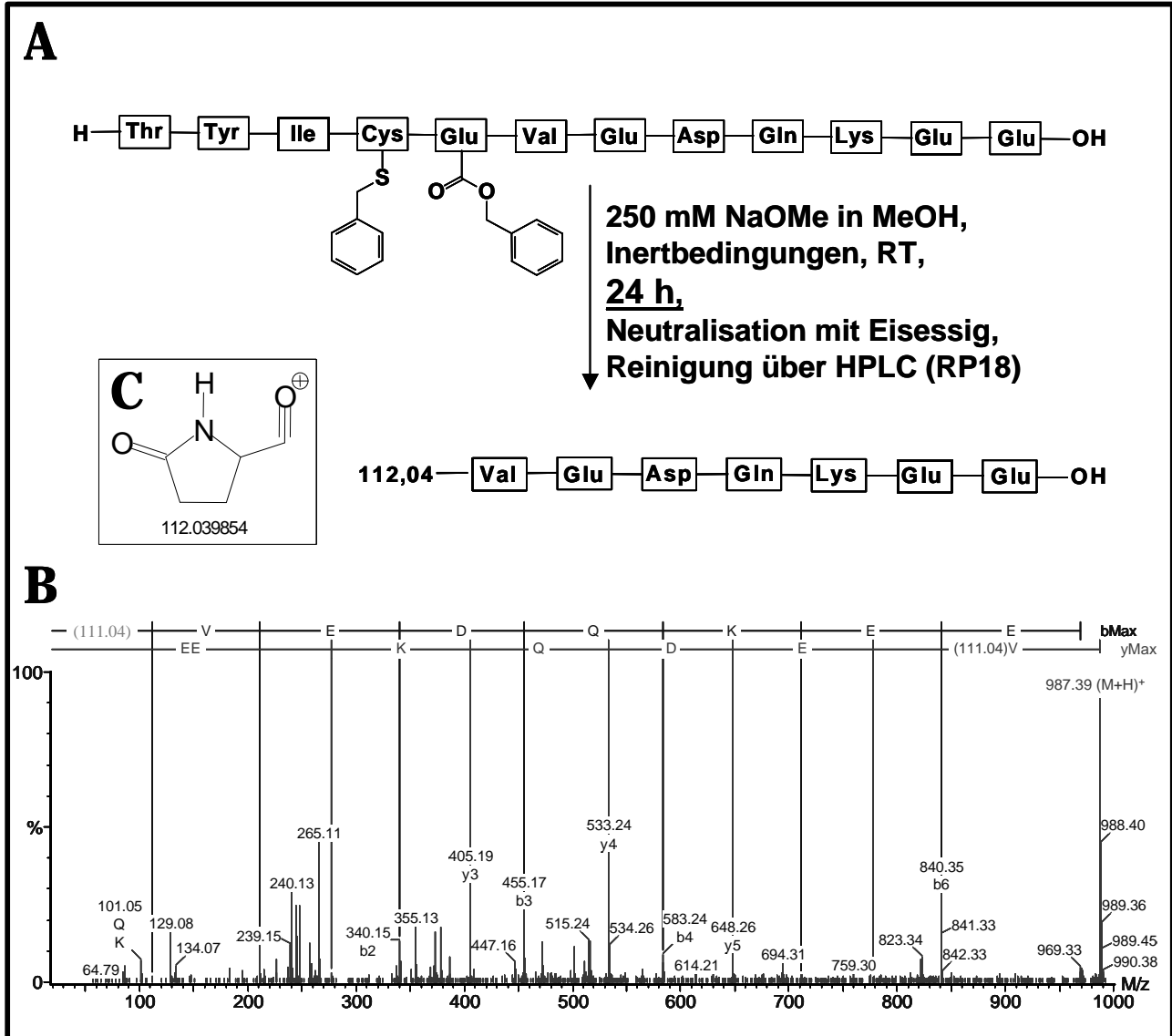


Abb. 21: Affinitätsspaltung.

Wird die Reaktionszeit der Umesterung auf 24 h erhöht, so erhält man nur ein Produkt (A), dessen ESI-QToF-MS/MS-Spektrum in Teil B abgebildet ist. Man findet die b-Serie des Modellpeptids A vom C-Terminus bis zum Valin. Das dann folgende Ion mit einer Masse von 112,04 amu entspricht dem b1-Ion einer N-terminalen Aminosäure mit einer Inkrementmasse von 111,04 amu. Die Struktur dieses b1-Ions, das aus dem Glutaminsäuremethylester entstanden sein muss, ist in Teil C abgebildet. Unter diesen Bedingungen wird demnach der Peptidstrang N-terminal von Glutaminsäureestern unter Bildung eines Pyroglutamats gespalten.

Bevor die Umesterung zur Markierung der Lipidbindungsstellen eingesetzt werden sollte, sollten zunächst die Lipide, die durch die Umesterung abgespalten werden, analysiert und mit denjenigen Lipiden verglichen werden, die durch eine klassische alkalische Hydrolyse (Wertz und Downing, 1987) freigesetzt werden (Abb. 22).

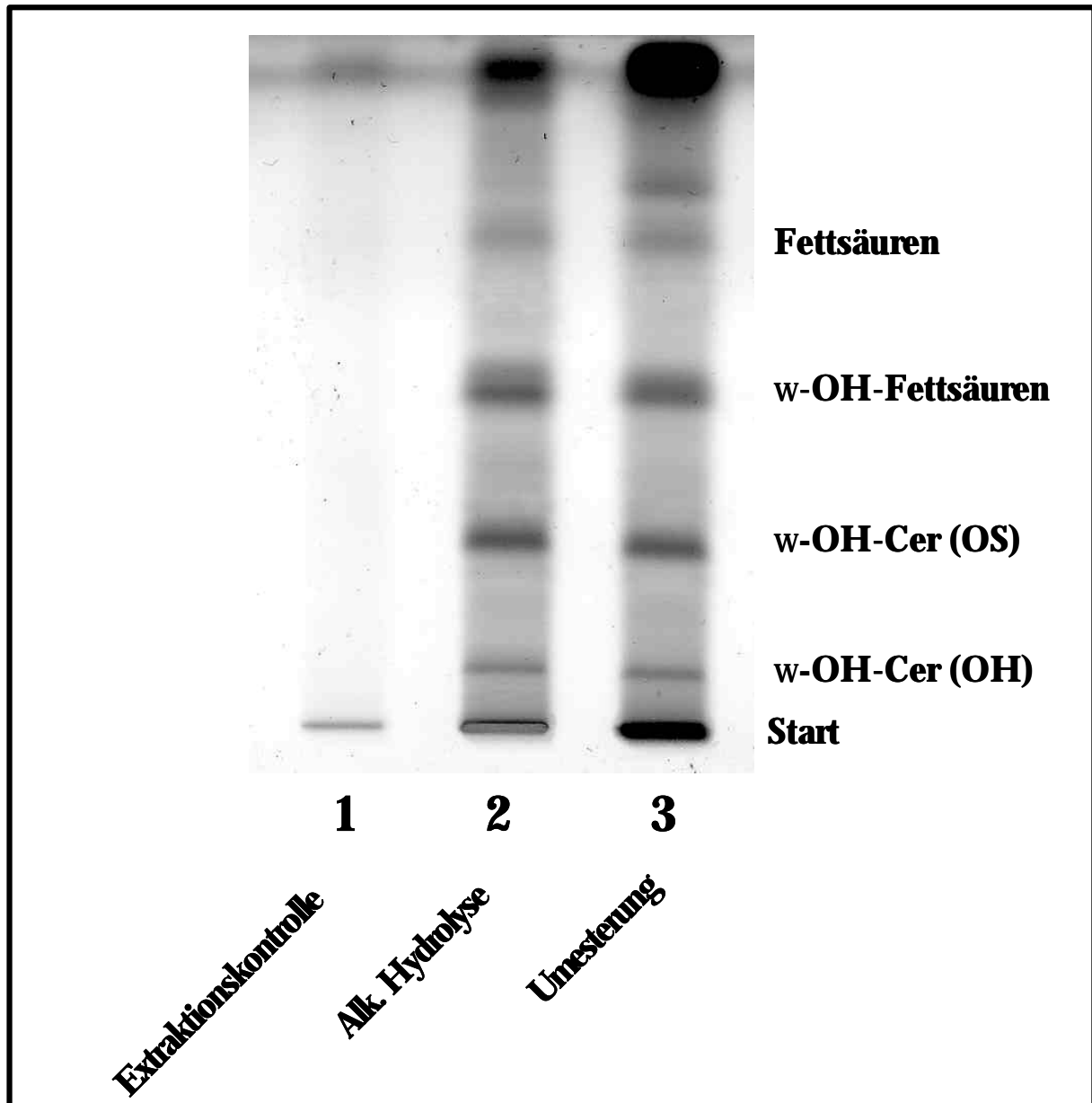


Abb. 22: Lipidmuster der proteingebundenen Lipide aus humanem SC nach Abspaltung durch Hydrolyse (Bahn 2) oder Umesterung (Bahn 3).

Vor Abspaltung der proteingebundenen Lipide waren keine frei extrahierbaren Lipide mehr nachzuweisen (Bahn 1). Die aufgetragenen Lipidmengen sind auf gleiche Ausgangsmengen SC bezogen, die Platte wurde zweimal in Chloroform/Methanol/Eisessig 190/9/1 (v/v/v) entwickelt.

3. Ergebnisse

Dazu wurde humanes SC, dessen frei extrahierbare Lipide vollständig entfernt worden waren (Bahn 1), einer alkalischen Hydrolyse unterzogen (Bahn 2) bzw. den Bedingungen der Umesterung ausgesetzt (Bahn 3). Die abgespaltenen Lipide wurden nach Entsalzen dünn-schichtchromatographisch analysiert. Beide Proben enthielten gleiche Mengen der gleichen Lipide. Eine densitometrische Analyse ergab, dass pro mg SC etwa 6 µg w-OH-Lipid abgespalten werden.

Die Identifikation der Lipide erfolgte durch Vergleich mit Standardsubstanzen und Literaturdaten (Robson *et al.*, 1994; Doering *et al.*, 1999a; Doering *et al.*, 1999b; Macheleidt *et al.*, 2002; Breiden, 2003). Darüber hinaus wurden Lipide, die durch eine alkalische Hydrolyse von humanem SC abgespalten worden waren, über RP-18-HPLC getrennt (Raith *et al.*, 2000). Nach dünn-schichtchromatographischer Analyse wurden diejenigen Fraktionen, die wenige, aber intensive Banden zeigten, über ESI-MS und ESI-MS/MS analysiert (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten die anhand der Literatur vorgenommenen Zuordnungen der w-OH-Lipide verifiziert werden.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass unter den Bedingungen der Umesterung nur Glutaminsäureester reagieren und die proteingebundenen Lipide analog einer klassischen Hydrolyse abgespalten werden. Die Reaktion findet folglich an den Protein-Lipid-Estern des CE statt und kann als Methode zur Markierung der Bindungsstellen angewandt werden.

In einem weitergehenden Experiment wurden die frei extrahierbaren Lipide einer SC-Probe durch erschöpfende Extraktion mit Chloroform/Methanol entfernt und die Protein-Lipid-Ester in Methylester überführt. Nachdem das umgeesterte SC über 48 h mit Trypsin verdaut worden war, wurden die erhaltenen Peptide über RP-HPLC getrennt. Die nachfolgende Analyse und Peptidsequenzierung mit ESI-MS und ESI-MS/MS lieferte eine große Anzahl an Peptiden aus den SC-Proteinen Keratin 1 und Keratin 10. Einige dieser Peptide enthielten Glutaminsäure-methylester anstelle von Glutamin oder Glutamat (Abb. 23). Dabei wurden 17 verschiedene Peptide aus beiden Keratinen mit bis zu drei Methylestern pro Peptid reproduzierbar identifiziert.

In späteren Kontrollen an Modellpeptid A stellte sich jedoch heraus, dass während der erschöpfenden Extraktion mit Chloroform und Methanol aus Glutamaten unspezifisch Glutaminsäuremethylester gebildet werden. Die in den Keratin-Peptiden gefundenen Methylester müssen also nicht zwingend aus Estern der Lipide des LBE entstanden sein, sondern können auch artifiziell während der erschöpfenden Extraktion entstanden sein.

3. Ergebnisse

Obwohl die Umesterung von SC mit nachfolgendem tryptischen Verdau, Trennung der Peptide und ESI-MS/MS-Analyse keine Protein-Lipid-Bindungsstellen lieferte, zeigte sich in diesem Experiment, dass Glutaminsäuremethylester in Peptiden nicht nur am Modellpeptid, sondern auch in realen Proben massenspektrometrisch detektiert werden können.

3.2.3 Präparation von Cornified envelope

In den bisherigen Analysen wurden hauptsächlich Peptide aus Keratin 1 und Keratin 10 gefunden. Als Teil des CE sind Keratine jedoch nur mit einem Anteil von unter 1 % beschrieben (Nemes und Steinert, 1999). Bekannte CE-Proteine wie z.B. Loricrin konnten indes nicht detektiert werden. Eine evidente Erklärung ist, dass die Keratine die Hauptkomponente im SC bilden, und dass sie sehr viel weniger quervernetzt sind als der CE und damit für Proteasen leichter zugänglich.

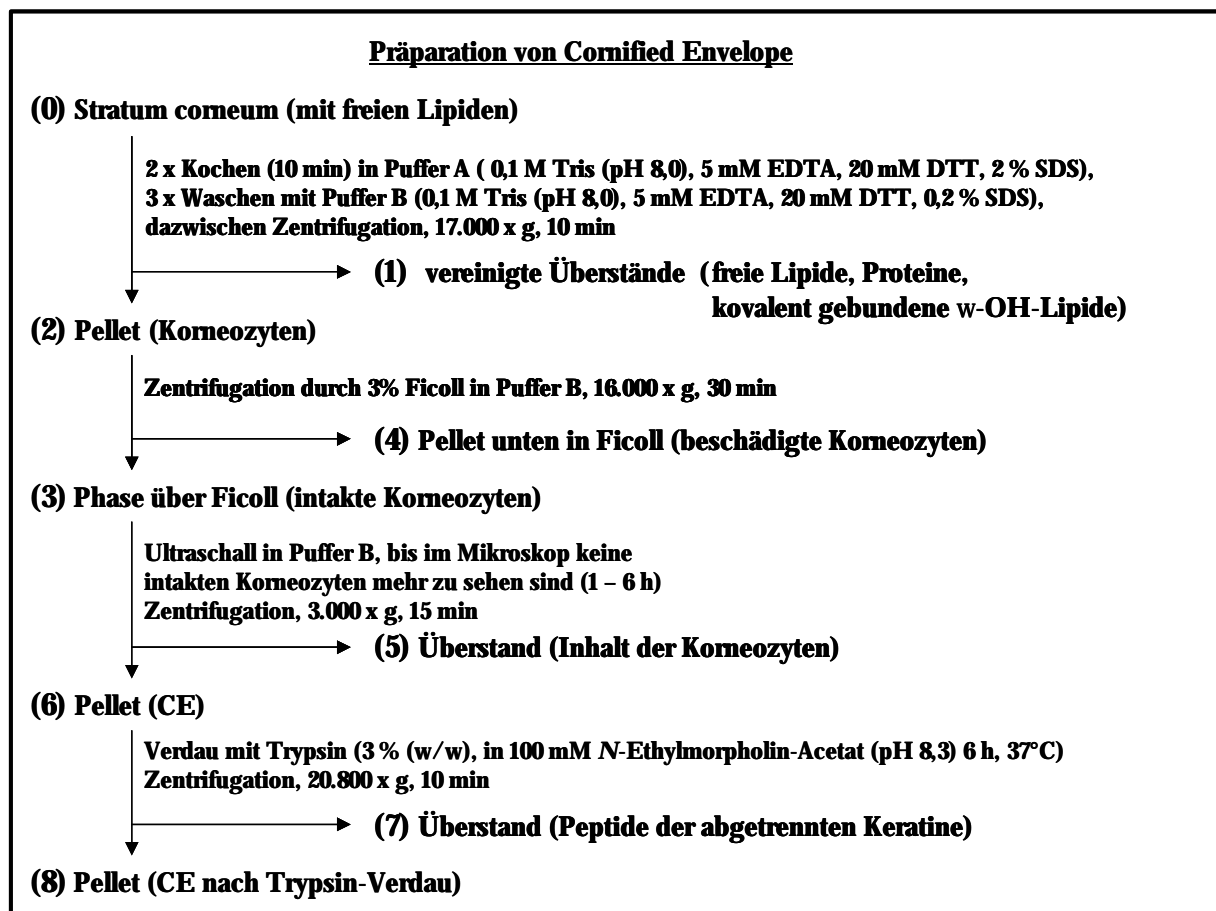


Abb. 24: Schema der CE-Präparation.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, den CE von diesen Keratinen zu trennen. Aus diesem Grund wurde eine bereits beschriebene CE-Präparation durchgeführt (Jarnik *et al.*, 1996; Jarnik *et al.*, 1998; Jarnik *et al.*, 2002). Eine Übersicht über die einzelnen Schritte gibt Abb. 24.

Ausgangsmaterial der Präparation ist SC. Üblicherweise sind darin die freien Lipide noch enthalten. Das SC wird in einem schwach basischen Puffer aus 100 mM Tris, 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 20 mM Dithiothreitol (DTT) und 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (im Folgenden als Puffer A bezeichnet) gekocht. Dabei löst sich der Korneozytenverband auf, wobei die Korneozyten im Puffer suspendiert werden. Durch Zentrifugation können diese Zellen pelletiert werden (Pellet (2) aus Abb. 23). Der erhaltene Überstand (1) enthält hauptsächlich Proteine und die Lipide der extrazellulären Matrix.

Im nächsten Schritt der CE-Präparation (Abb. 24) werden die Korneozyten durch eine Dichtezentrifugation in intakte und beschädigte Korneozyten getrennt. Die Phase über der Ficoll-Lösung (3) enthält intakte Korneozyten (Abb. 25 A), das Pellet unten in der Ficoll-Lösung (4) besteht aus beschädigten Korneozyten und Zelltrümmern (Daten nicht gezeigt).

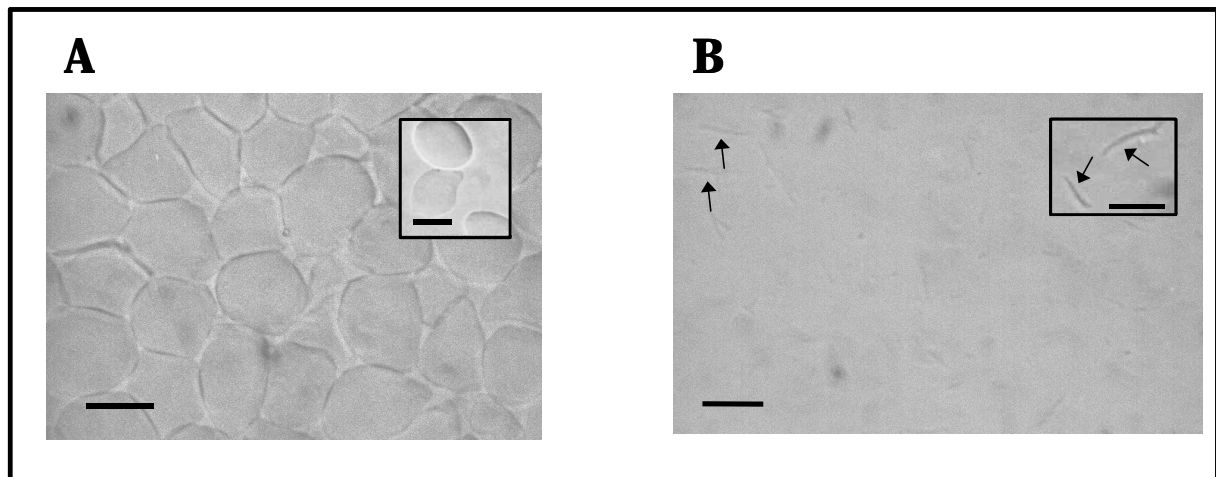


Abb. 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen vor (A) und nach (B) dem Aufbrechen der Korneozyten durch Ultraschall.

Aufnahme A zeigt isolierte intakten Korneozyten, wie sie in Pellet (3) vorliegen. Im Insert ist zu erkennen, dass die Korneozyten nicht mehr miteinander verbunden sind.

Aufnahme B zeigt dieselbe Probe nach der Ultraschallbehandlung. Es sind keine intakten Korneozyten mehr zu sehen. Die Pfeile markieren den freigesetzten CE, der im Insert besser zu erkennen ist.

Der Balken entspricht 100 μm .

3. Ergebnisse

Die isolierten intakten Korneozyten werden solange mit Ultraschall behandelt, bis im Lichtmikroskop keine intakten Korneozyten mehr zu sehen sind (Abb. 25). Statt der Zellen erkennt man kleine strichförmige Strukturen (Abb. 25 B), den zerkleinerten CE, den man durch Zentrifugation als Pellet (6) abtrennt. Im Überstand (5) befindet sich der Inhalt der Korneozyten, der vorwiegend aus Keratinen besteht (Kirfel *et al.*, 2003).

Der durch diese Präparation erhaltene CE wird mit Trypsin verdaut, um anhaftende Keratine zu entfernen (Steinert und Marekov, 1997; Marekov und Steinert, 1998). Danach befinden sich die abgetrennten Peptide ungebunden in Lösung und lassen sich durch Zentrifugation als Überstand (7) abtrennen. Der aufgereinigte CE befindet sich in Pellet (8).

Um die Qualität der Präparation zu überprüfen, wurde eine Bilanz erstellt. Dazu wurde in einer exemplarischen CE-Präparation aus humanem SC auf jeder Stufe, soweit physikalisch möglich, das Trockengewicht, die Proteinmenge, die Menge an Aminosäuren und an kovalent gebundenen ω -OH-Lipiden bestimmt. Die frei extrahierbaren Lipide wurden zur Vereinfachung der Bilanzierung vor dieser Präparation entfernt.

- Zur Bestimmung des Trockengewichts wurde das jeweilige Pellet mit Wasser gewaschen, um Pufferbestandteile zu entfernen und anschließend lyophilisiert und gewogen.
- Zur Proteinbestimmung wurden die Pellets in Puffer B (s. Abb. 24) so lange mit Ultraschall behandelt, bis eine feine Suspension entstanden war. In dieser wurde der Proteingehalt mit der BCA-Methode bestimmt.
- Die Aminosäure-Quantifizierung erfolgte analog Kap. 3.2.1 durch Totalhydrolyse und Anfärbung mit Ninhydrin.
- Die kovalent gebundenen ω -OH-Lipide wurden nach erschöpfender Extraktion der freien Lipide durch eine alkalische Hydrolyse abgespalten, dünnschichtchromatographisch getrennt und densitometrisch quantifiziert.

Da die Ergebnisse der Proteinbestimmung und der Aminosäurequantifizierung mit den ermittelten Trockengewichten übereinstimmten, wurden sie zunächst nicht weiter berücksichtigt.

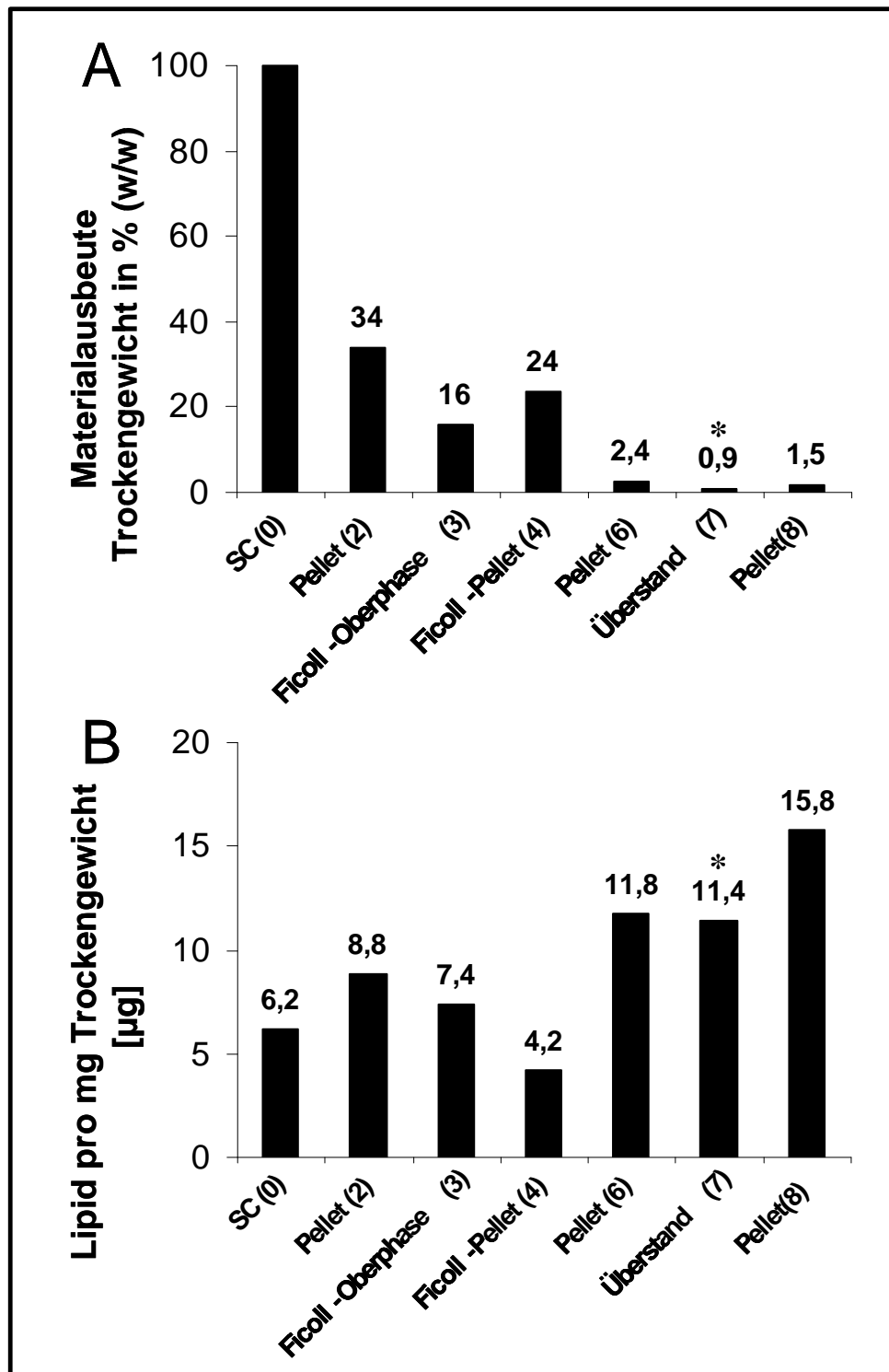


Abb. 26: Bilanz der einzelnen Stufen der CE-Präparation.

Ausgangsmaterial war humanes SC (0), dessen frei extrahierbare Lipide vollständig entfernt worden waren. Auf jeder Stufe der Präparation wurde, soweit möglich, das Trockengewicht und die Menge an kovalent gebundenen Lipiden pro mg Trockengewicht bestimmt ($n = 1$).

Teil A zeigt die Materialausbeute (Trockengewicht) aller Stufen, normiert auf die eingesetzte Menge SC (0). Da die Überstände (1) und (5) auch nach Lyophilisierung noch große Mengen von Pufferbestandteilen enthielten, konnten ihre Trockengewichte nicht bestimmt werden. Bei Überstand (7) wurde die Ausbeute durch Berechnung der Differenz von eingesetztem Pellet (6) und erhaltenem Pellet (8) ermittelt (*).

Teil B zeigt analog die Mengen an proteingebundenen Lipiden pro mg Trockengewicht. Bei Überstand (7) diente das berechnete Trockengewicht als Grundlage zur Bestimmung des Wertes (*).

3. Ergebnisse

Betrachtet man die Materialausbeute auf dem Weg von SC (0) zu Pellet (2), fällt auf, dass nur etwa $\frac{1}{3}$ des Materials zurückgewonnen wurde (Abb. 26 A). Das Trockengewicht von Überstand (1) konnte nicht bestimmt werden, da die Pufferbestandteile auch nach Lyophilisierung des Überstandes die Wägung erheblich gestört hätten.

Bei der Trennung in intakte und beschädigte Korneozyten wurde mehr als die Hälfte des Materials als beschädigte Korneozyten verworfen. Bei späteren Präparationen wurden die frei extrahierbaren Lipide aus dem SC nicht mehr extrahiert. In diesen Proben war der Anteil der beschädigten Korneozyten sehr viel geringer. Daraus kann man schließen, dass die Korneozyten durch die über Wochen verlaufende erschöpfende Extraktion geschädigt werden.

Bei einer genaueren Betrachtung der Werte in Abb. 26 A fällt auf, dass die Summe der Trockengewichte von Ficoll-Oberphase (3) und Ficoll-Pellet (4) größer ist als das Trockengewicht von Pellet (2), aus dem beide entstehen. Hier zeigt sich die Fehlerbreite der Messung. Vermutlich waren in einer der Proben noch Pufferbestandteile enthalten, die die Masse artifiziell erhöht haben. Es kann aber nicht festgestellt werden, bei welcher Stufe der Fehler liegt.

Auch beim Aufbrechen der Korneozyten, also beim Übergang von Stufe (3) zu Pellet (6) ist der Materialverlust sehr groß. Die Ausbeute an CE beträgt etwa $\frac{1}{6}$ der Masse der eingesetzten Korneozyten (Abb. 26 A). Wie schon bei Überstand (1) kann das Trockengewicht von Überstand (5) wegen der enthaltenen Pufferbestandteile nicht bestimmt werden.

Pellet (6) teilt sich zu etwa gleichen Teilen in Überstand (7) und Pellet (8) auf. Das Trockengewicht von Überstand (7) in diesem Fall nur durch Berechnung der Differenz von Pellet (6) und Pellet (8) ermittelt.

Bei Betrachtung der Menge an kovalent gebundenen w -OH-Lipiden pro mg Trockengewicht (Abb. 26 B) ergeben sich für SC (0) etwa $6 \mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht. Der Messfehler aus Teil A bei Pellet (2), Ficoll-Oberphase (3) und Ficoll-Pellet (4) ist auch bei der Quantifizierung der Lipide festzustellen. Theoretisch müsste der Lipidgehalt pro mg Trockengewicht von Pellet (2) zwischen dem von Ficoll-Oberphase (3) und Pellet (4) liegen. Unter Berücksichtigung dieses Fehlers ändert sich der Lipidgehalt pro mg Trockengewicht in diesen Stufen nicht.

Beim Aufbrechen der Korneozyten steigt der Lipidgehalt jedoch auf etwa das Doppelte (Abb. 26 B, Pellet (6)). Der abgetrennte Überstand (5) enthält den Inhalt der Korneozyten und damit vorwiegend Keratine, also Proteine und kaum Lipide.

Durch den tryptischen Verdau, also beim Übergang von Pellet (6) zu Pellet (8) steigt der Lipidgehalt in Anbetracht der Fehlergröße nur unwesentlich. Der Lipidgehalt in Überstand (7) ist ebenfalls vergleichbar groß. Dieser Wert ist allerdings eine sehr unsichere Größe, da hier das entsprechende Trockengewicht nicht durch Wägung bestimmt, sondern nur berechnet wurde.

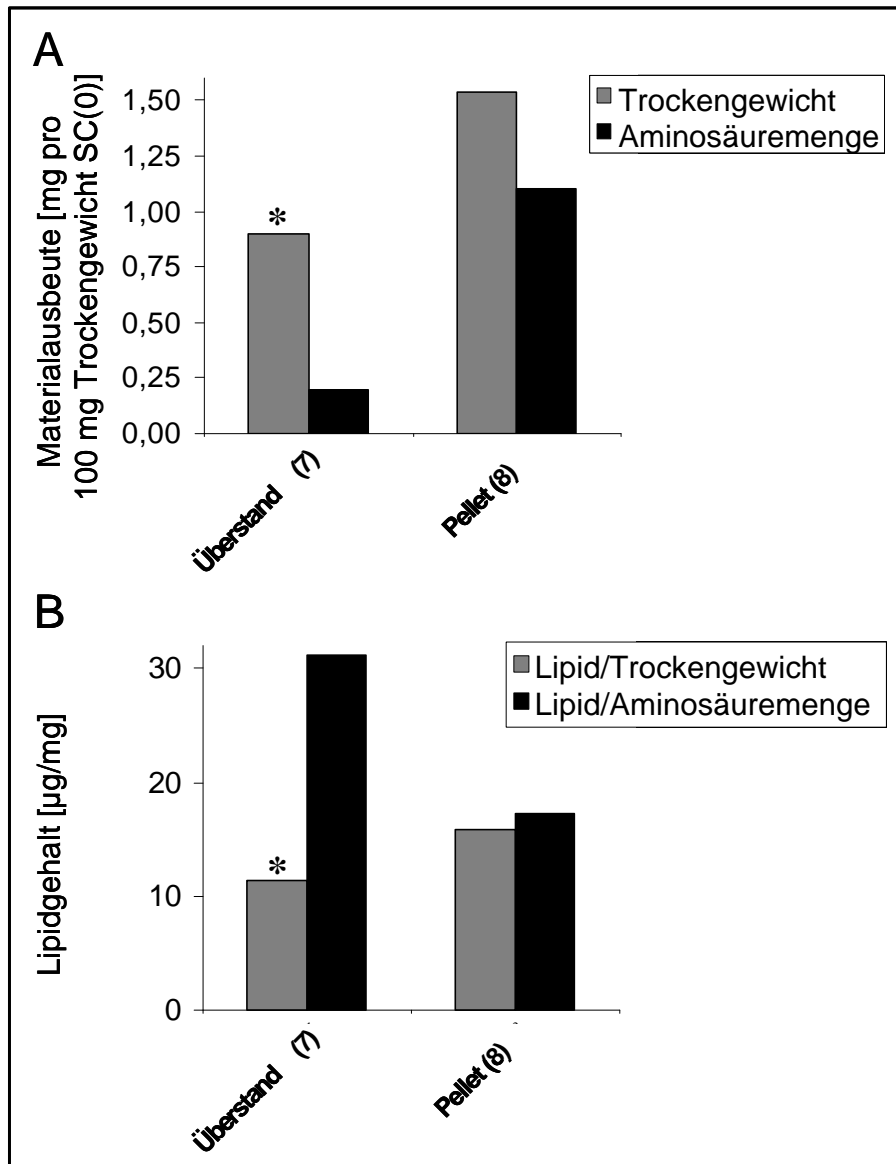


Abb. 27: Materialausbeute und Lipidgehalt in Überstand (7) und Pellet (8), bezogen auf Trockengewicht und Aminosäuremenge.

Ausgangsmaterial war wie in Abb. 26 humanes SC (0), dessen frei extrahierbare Lipide vollständig entfernt worden waren.

Teil A zeigt die Ausbeuten an Trockengewicht und an Aminosäuremenge, jeweils bezogen auf 100 mg SC (0) (Trockengewicht) als Ausgangspunkt (n = 1).

Teil B zeigt die Mengen an proteingebundenen Lipiden pro Trockengewicht und pro Aminosäuremenge (n = 1).

*Bei Überstand (7) wurde das Trockengewicht als Differenz zwischen eingesetztem Pellet (6) und erhaltenem Pellet (8) berechnet.

3. Ergebnisse

Einen besseren Einblick in die Bilanzierung von Überstand (7) und Pellet (8) gibt Abb. 27. Hier sind die gemessenen Aminosäuremengen mit einbezogen. Die Aminosäurequantifizierung ergab für Überstand (7) eine wesentlich geringere Ausbeute im Vergleich zum berechneten Trockengewicht, während die Werte für Pellet (8) vergleichbar sind. Die Lipidmenge pro Aminosäuremenge ist daher in Überstand (7) sehr hoch, etwa doppelt so hoch wie in Pellet (8).

Weitere Untersuchungen an Überstand (7) und Pellet (8) sind in Kap. 3.2.4 und 3.2.5 beschrieben. An dieser Stelle sei gesagt, dass durch Proteolyse von Pellet (8) einige wenige Peptide freigesetzt werden konnten, die für eine Sequenzierung jedoch häufig zu kurz waren. Es handelte sich aber definitiv nicht um Peptide aus Keratinen.

Da für Überstand (1) und (5) bisher keine Aussagen über den Gehalt an *w*-OH-Lipiden gemacht werden konnten, wurde folgendes Experiment mit einem Überstand (1) aus einer anderen CE-Präparation durchgeführt. Ausgangsmaterial war humanes SC, dessen frei extrahierbare Lipide nicht entfernt worden waren. Der zur Trockne eingedampfte Überstand (1) wurde auf eine Kieselgelsäule gegeben und mit Chloroform/Methanol/Eisessig 190/9/1 (v/v/v) eluiert. Die ersten Fraktionen des Eluats wurden vereinigt, über RP-18-Säulchen entsalzt und auf ein DC aufgetragen (Abb. 28, Bahn 2). Die Elution wurde fortgesetzt, bis keine Lipide im Eluat mehr nachweisbar waren (Bahn 3). Der gesamte Inhalt der Säule wurde einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, erneut auf eine Kieselgelsäule gegeben. Wiederum wurden die ersten Fraktionen des Eluats vereinigt, entsalzt und aufgetragen (Bahn 4). In dieser Probe konnten folglich nur Lipide enthalten sein, die durch die Hydrolyse freigesetzt worden sind und in Überstand (1) z.B. an Peptide oder Proteine kovalent gebunden waren. Zum Vergleich wurden Lipidextrakte aufgetragen, die frei extrahierbare Lipide (Bahn 1) und proteingebundene Lipide (Bahn 5) aus humanem SC enthielten.

Da immer nur die ersten Fraktionen des Eluats analysiert werden konnten, ist hier keine quantitative Aussage möglich. Aus demselben Grund sind auch die unteren Banden in Bahn 2 und 4 sehr schwach. Bei weiterer Elution wären jedoch Pufferbestandteile wie SDS ausgewaschen werden, die die Dünnschichtchromatographie gestört hätten.

In Überstand (1) findet man wie erwartet große Mengen von frei extrahierbaren Lipiden, deren dünnschichtchromatographische Verteilung einem Lipidextrakt von SC entspricht (Bahn 1 und 2). Nach der Hydrolyse findet man leicht nachweisbare Mengen von *w*-OH-Lipiden, die kovalent gebunden gewesen sein müssen. Das zeigt, dass in Überstand (1)

Lipopeptide oder -Proteine in großer Menge vorkommen. Wegen der enthaltenen Detergentien können sie jedoch nicht oder nur sehr schwer isoliert werden.

Für Überstand (5) ergab das gleiche Experiment analoge Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

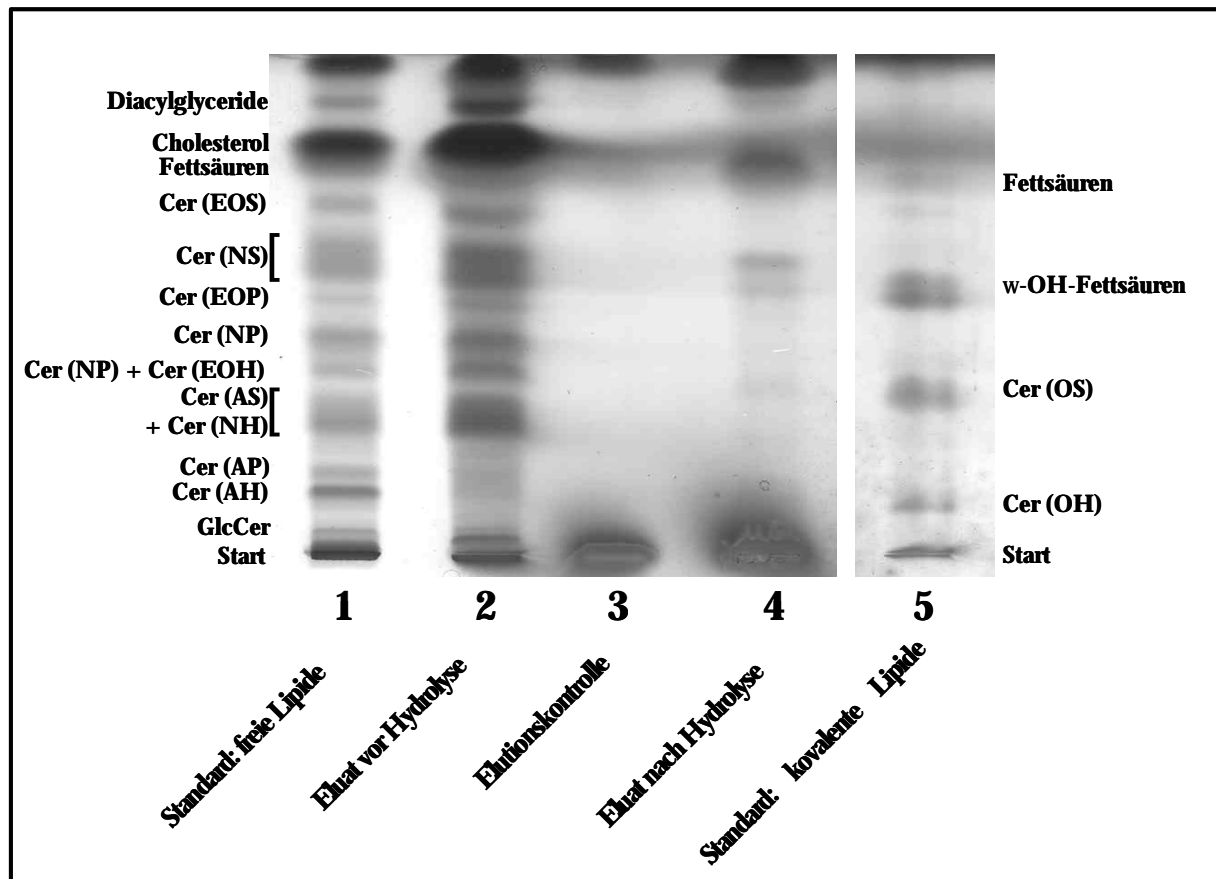


Abb. 28: Freie und kovalent gebundene Lipide in Überstand (1) aus humanem SC.

Die im getrockneten Überstand (s. Abb. 24) enthaltenen Lipide wurden über eine Kieselgelsäule getrennt. Die ersten Fraktionen des Eluats wurden vereinigt, entsalzt und dünnschichtchromatographisch analysiert (Bahn 2). Nach vollständiger Elution aller Lipide (Bahn 3), wurde der gesamte Inhalt der Säule alkalisch hydrolysiert. Die dabei freigesetzten Lipide wurden erneut über eine Kieselgelsäule getrennt und die ersten Fraktionen nach Entsalzen analysiert (Bahn 4). Als Vergleich dienen Gemische von frei extrahierbaren (Bahn 1) und kovalent gebundenen Lipiden (Bahn 5) aus humanem SC. Laufmittel auf der Kieselgelsäule und im DC war Chloroform/Methanol/Eisessig 190/9/1 (v/v/v). Das DC wurde zweimal entwickelt.

Da beim Kochen in Puffer A etwa 60 % des Materials in Überstand (1) übergehen, die Menge an kovalent gebundenen Lipiden aber kaum ansteigt (Abb. 26), stellt sich die Frage, ob und inwieweit während dieses ersten Schrittes der CE-Präparation Esterbindungen gespalten werden. Die dabei freigesetzten w-OH-Lipide sollten auch in Bahn 2 (Abb. 28) zu sehen sein. Für Ceramide aus Maushaut ist beschrieben, dass die Menge an frei extrahierbaren Lipiden abhängig von Alter und Mausstamm etwa 3 –

3. Ergebnisse

6 mal so hoch ist wie die an proteingebundenen (Takagi *et al.*, 2004; Leyvraz *et al.*, 2005). Außerdem gleichen sich z.T. die R_f -Werte bestimmter frei extrahierbarer und proteingebundener Lipid. Deswegen ist es denkbar, dass die möglicherweise abgespaltenen ω -OH-Lipide im DC durch die frei extrahierbaren Lipide überdeckt werden.

Um eine mögliche Spaltung von Esterbindungen nachzuweisen, wurde Arachidonsäureumbelliferylester als Modellsubstanz den Bedingungen des Kochens in Puffer A ausgesetzt. Bei Spaltung der Esterbindung entstünde freies Umbelliferon, das eine wesentlich höhere Fluoreszenzausbeute als der Ester besitzt. Eine quantitative Analyse ergab, dass ca. 40 % der Esterbindungen gespalten werden. Wird dem Ansatz zur Untersuchung des Einflusses von Hautproteinen ein wenig SC zugefügt, steigt der Anteil der gespaltenen Esterbindungen geringfügig auf 42 – 45 % (Daten nicht gezeigt).

In ihrer Gesamtheit betrachtet, verlief die CE-Präparation unter großen Materialverlusten. Aus diesem Grund wurden für Vorexperimente die Rumpfhäute von ca. 6 Tage alten NMRI-Mäusen verwendet.

Bezogen auf das eingesetzte SC erhält man bei der Präparation (Abb. 26) CE (6) vor dem tryptischen Verdau in einer Ausbeute von 2,44 % und CE (8) nach dem tryptischen Verdau in 1,54 % Ausbeute. In späteren Präparationen mit größeren Ansätzen konnten die Ausbeuten von CE (6) auf 5,8 % ($\pm 3,1$; $n=5$) und von CE (8) auf 3,3 % ($\pm 0,7$; $n=9$) gesteigert werden.

Bei Betrachtung der Menge an kovalent gebundenen Lipide, wurde im Ausgangsmaterial SC etwa 6 μg ω -OH-Lipid pro mg, in CE (6) und (8) 12 – 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht gefunden. Dies entspricht einer Anreicherung um das 2 – 2,5fache. Dabei fand die größte Anreicherung beim Aufbrechen der Korneozyten (Abb. 26, von (3) nach (6)) statt. Bei diesem Schritt wird die Hülle mit den kovalent gebundenen Lipiden vom Inhalt der Korneozyten getrennt.

Trotz der hohen Verluste war diese CE-Präparation erfolgreich, da die störenden Keratine auf diesem Wege vollständig entfernt werden konnten. Eine alternative Präparation, die höhere Ausbeuten oder eine stärkere Anreicherung der proteingebundenen Lipide liefert, ist nicht beschrieben und müsste demnach erst entwickelt werden.

Aus diesen Gründen wurde als Ausgangsmaterial für weitere Experimente zur Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen CE verwendet, das nach dem beschriebenen Schema präpariert worden war.

Das auf diesem Wege präparierte CE enthält immer noch kleine Mengen frei extrahierbarer Lipide. Für peptid- bzw. proteinchemische Untersuchungen wurde dieses CE ohne weitere Reinigung verwendet. Für Analysen der proteingebundenen Lipide wurden die frei extrahierbaren Lipide durch erschöpfende Extraktion mit Chloroform und Methanol entfernt. Die dabei auftretende unspezifische Veresterung von freien Glutamaten (Kap. 3.2.2) beeinflusst die Analyse der proteingebundenen Lipide nicht.

3.2.4 Untersuchungen an Überstand (7)

In Überstand (7) wurden nach alkalischer Hydrolyse etwa gleich viele w-OH-Lipide wie in Pellet (8) gefunden (Abb. 26). Darüber hinaus enthielt Überstand (7) gelöste Peptide, die einer weiteren Analyse direkt zugänglich waren. Deshalb erschien es vielversprechend, die im Überstand enthaltenen Lipopeptide durch eine Umesterung in methylveresterte Peptide zu überführen, diese über RP-HPLC zu trennen und mittels ESI-MS/MS zu sequenzieren. Da eine Lösung in Gegensatz zu einer festen Probe nicht durch eine einfache Extraktionskontrolle auf noch extrahierbare Lipide überprüft werden kann, war für Überstand (7) in Abb. 26 B nicht sichergestellt, dass alle w-OH-Lipide kovalent gebunden waren. Auf eine Extraktionskontrolle durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln wurde verzichtet, da hierbei die Bedingungen nicht mit denen der alkalischen Hydrolyse vergleichbar sind. Daher wurde auf anderem Wege überprüft, ob die in Abb. 26 B detektierten w-OH-Lipide tatsächlich kovalent gebunden waren (Abb. 29).

Eine Probe Pellet (6) aus Maushaut wurde nach erschöpfender Extraktion mit Chloroform/Methanol (Bahn 1) in einem geeigneten Puffer suspendiert, mit Trypsin verdaut und der erhaltene Überstand (7) in zwei Hälften geteilt. Für die dünnschichtchromatographische Analyse wurde die eine Hälfte alkalisch hydrolysiert (Bahn 4) und die andere als Kontrollprobe ohne Hydrolyse verwendet (Bahn 3). Die in der Kontrolle detektierten Lipide können folglich nicht kovalent an Peptide gebunden gewesen sein. Als weitere Kontrolle wurden die Überstände, die sich ergaben, als CE (6) aus der Chloroform/Methanol-Umgebung der erschöpfenden Extraktion in eine Suspension im Puffer überführt wurde, vereinigt und analysiert (Bahn 2).

3. Ergebnisse

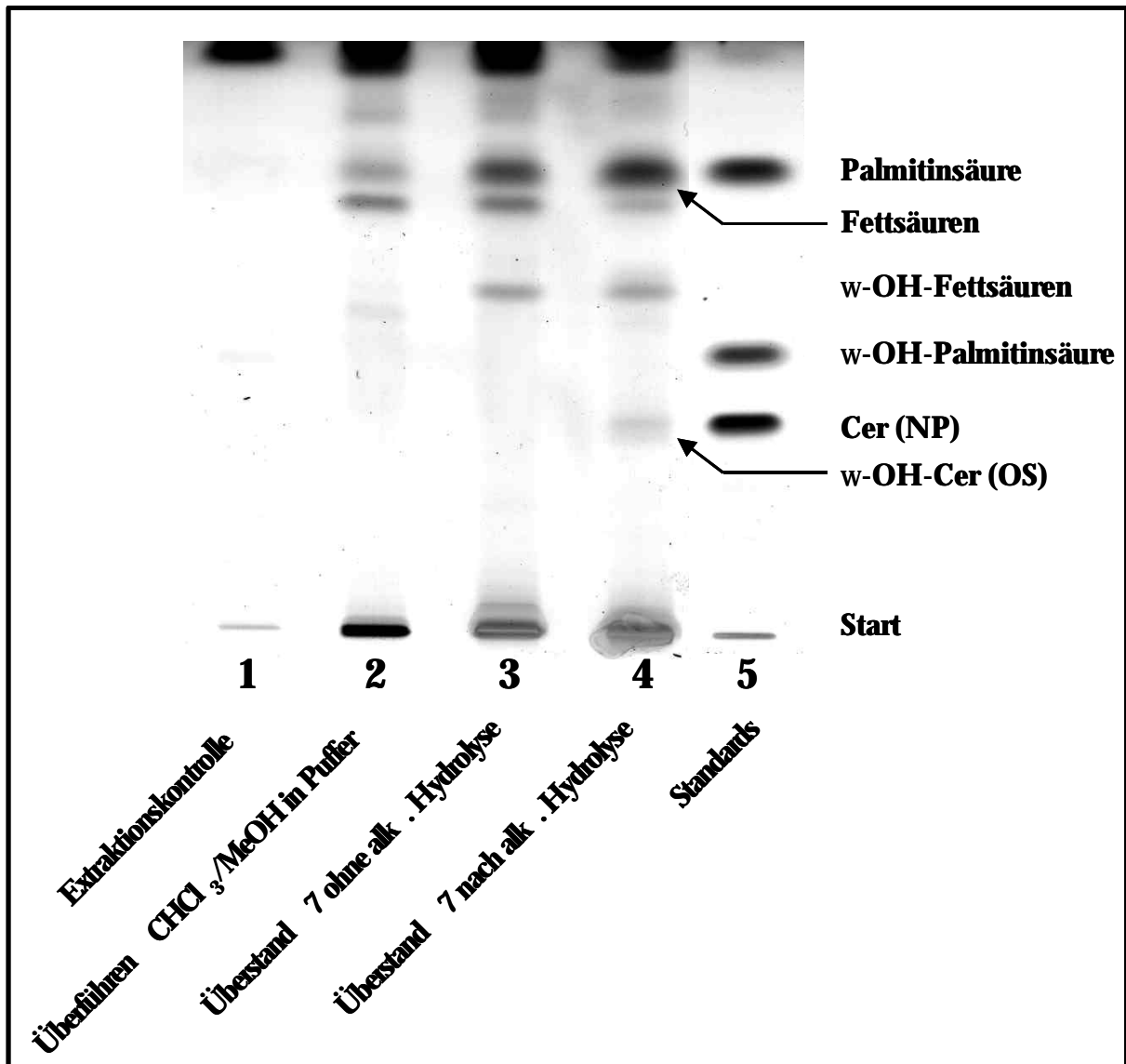


Abb. 29: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der ω -OH-Lipide in Überstand (7) nach alkalischer Hydrolyse und ohne alkalische Hydrolyse.

Eine Pellet (6)-Probe aus Maushaut wurde nach erschöpfender Extraktion mit Chloroform/Methanol (Bahn 1) in einem geeigneten Puffer suspendiert, mit Trypsin verdaut und der erhaltene Überstand (7) nach alkalischer Hydrolyse (Bahn 4) und ohne Hydrolyse (Bahn 3) entsalzt und dünnschichtchromatographisch analysiert. Als weitere Kontrolle wurden die vereinigten Überstände entsalzt und aufgetragen, die sich ergaben, als CE (6) aus der Chloroform/Methanol-Umgebung der erschöpfenden Extraktion in eine Suspension im Puffer überführt wurde (Bahn 2).

Die Platte wurde zweimal in Chloroform/Methanol/Eisessig 190/9/1 (v/v/v) entwickelt. Bei der Bande unterhalb der Fettsäuren handelt es sich möglicherweise wie in Abb. 17 um eine Verunreinigung aus dem RP-18-Material.

Die Lipidmuster mit und ohne Hydrolyse sind sehr ähnlich. Lediglich die Cer (OS)-Bande ist nach Hydrolyse wesentlich stärker. Der größte Teil der w-OH-Lipide in Überstand (7) ist demnach nicht kovalent gebunden. Da Pellet (6) keine ungebundenen Lipide mehr enthält (Abb. 29, Bahn 1), müssen die Lipide aus Überstand (7) ohne

alkalische Hydrolyse (Bahn 3) unter den Bedingungen des tryptischen Verdaus abgespalten worden sein. Obwohl der pH-Wert von 8,3 als Ursache einer Esterhydrolyse unwahrscheinlich erscheint, lassen die Banden in Bahn 2 darauf schließen, dass schon durch kräftiges Mischen und Ultraschall im verwendeten Puffer (100 mM N-Ethylmorpholin-Acetat pH 8,3) Lipide abgespalten werden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde analog Kap. 3.2.2 Arachidonsäureumbelliferylester über 6 h bei 37 °C in Puffer, in Puffer mit Trypsin und in Puffer mit Trypsin und ein wenig humanem, hydrolysiertem SC inkubiert. Das SC sollte die Anwesenheit von Hautproteinen simulieren und war in größeren Mengen verfügbar als CE, der u.U. ein noch besseres Modell gewesen wäre.

Der Anteil des entstandenen Umbelliferons wurde anhand seiner höheren Fluoreszenzausbeute ermittelt (Abb. 30). Die Inkubation in Puffer führte demnach nicht zur Spaltung der Esterbindung. Die Anwesenheit von Trypsin hingegen bewirkte, dass ca. 15 % der Ester gespalten wurden. Waren außerdem noch Hautproteine in Form von SC zugegen, wurden sogar etwa 35 % der Ester gespalten.

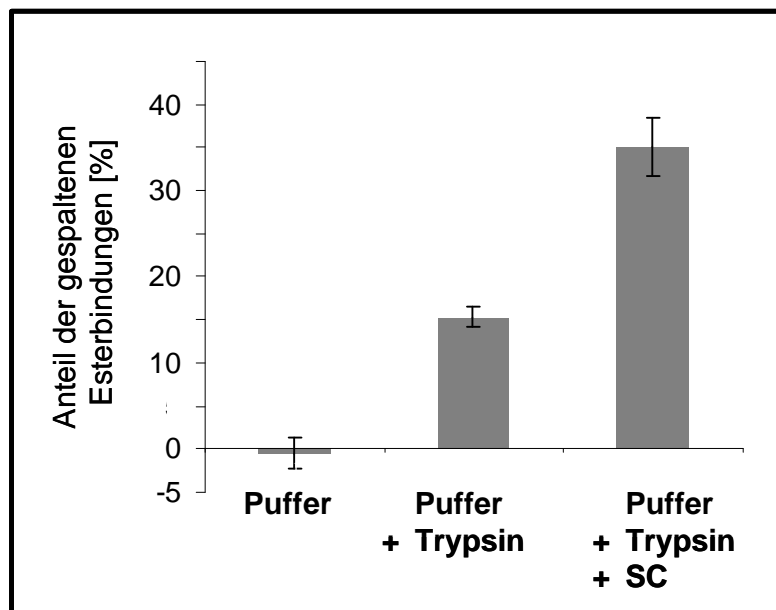


Abb. 30: Esterhydrolyse unter den Bedingungen des tryptischen Verdaus von CE.

Arachidonsäureumbelliferylester wurde über 6 h bei 37 °C in Puffer, in Puffer mit Trypsin und in Puffer mit Trypsin und etwas SC inkubiert. Das SC simuliert die Anwesenheit von Hautproteinen. Der Anteil des durch Esterhydrolyse entstandenen Umbelliferons wurde anhand seiner höheren Fluoreszenzausbeute ermittelt. Die Werte sind Mittelwerte \pm max. Abweichung (n = 2).

3. Ergebnisse

Quantifiziert man im DC aus Abb. 29 die Menge an Cer (OS), die tatsächlich kovalent gebunden war (Bahn 4), erhält man eine Menge von etwa 21 ng/mg Trockengewicht oder 48 ng/mg Aminosäuremenge (n = 1). Dies entspricht etwa 0,028 nmol/mg Trockengewicht oder 0,064 nmol/mg Aminosäuremenge. Bei einem mittleren Peptid-Molekulargewicht von 2000 Da enthält 1 mg Überstand (7) etwa 500 nmol Peptide, d.h. von 500 nmol Peptiden sind ca. 0,05 nmol Lipopeptide, also 1/10.000.

Da demnach nur jedes 10.000ste Peptid in Überstand (7) ein Lipopeptid ist, ist der Anteil der Lipopeptide viel zu gering, um Protein-Lipid-Bindungsstellen identifizieren zu können. Aus diesem Grunde wurde die Suche danach in Pellet (8) fortgesetzt.

A	Lys - Gln - Pro - Thr - Pro - Gln - Pro - Pro - Val - Asp - Cys - Val - Lys	Lys ⁶ - Lys ¹⁸
B	Gln - Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys	Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶
C	Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys	Ala ³¹⁰ - Lys ³¹⁶
D	Gln - Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys (Gln + 420)	Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Gln + 420 amu
E	Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys (Gln + 420)	Pro ³¹¹ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Gln + 420 amu
F	Pro - Ser - Lys (Gln + 420)	Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Gln + 420 amu
G	Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Tyr - Ser Gly Gly - Gly - Gly - Ser - Ser - Gly - Gly - Gly - Cys - Gly Gly Gly - Gly - Gly - Ile - Gly - Gly - Cys - Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - Gly - Ser - Val - Lys S - S	Ser ⁵⁴ - Lys ⁸⁹ Disulfidbrücke Cys ⁶⁴ - Cys ⁸⁰

Tab. 2: Loricrin-Peptide in Überstand (7).

Die massenspektrometrische Analyse von Überstand (7) aus humaner Haut ergab neben Peptiden aus Keratin 1 und Keratin 10 die aufgeführten Peptide aus humanem Loricrin. Lange senkrechte Striche in den Peptiden D, E und F symbolisieren Isodipeptidbindungen.

Die massenspektrometrische Analyse der Peptide in Überstand (7) ergab neben Peptiden aus Keratin 1 und Keratin 10 auch einige Peptide aus Loricrin, die in Tab. 2 aufgeführt sind. Die Massenspektren der Peptide D, E und F zeigen eine Sequenz, die dem C-Terminus von Loricrin entspricht. Bei den Peptiden D und E ist die Anzahl der vorhandenen Aminosäuren ausreichend groß, so dass die Sequenz spezifisch für humanes Loricrin ist, Peptid F ergibt sich dann aus dem Vergleich mit D und E.

Die in diesen Peptiden gefundenen Sequenzen führen bis zum C-terminalen Lys³¹⁶. Allerdings enden sie dort nicht, d.h. die Sequenz des Peptids setzt sich fort. Da jedoch Lys³¹⁶ die C-terminale Aminosäure von Loricrin ist, liegt es nahe, dass dieses Lys Teil einer Isodipeptidbindung ist, über die ein weiteres Peptid an das Loricrin-Peptid gebunden ist. Nach Abzug aller Massen für N- und C-Termini beider Peptide und der Isodipeptidbindung verbleibt für das zweite Peptid neben dem Glutamin eine Gesamtmasse aller Aminosäuren von 420 amu. Da das zweite Peptid jedoch keine erkennbaren Fragmente zeigt, konnte es nicht identifiziert werden.

3.2.5 Untersuchungen an Pellet (8)

In einer früheren Arbeit (Marekov und Steinert, 1998) wurde die Identifizierung einiger Lipidbindungsstellen in CE (8) beschrieben. Abb. 31 zeigt eine Übersicht über die einzelnen Schritte, in denen diese Arbeit reproduziert werden sollte.

An Pellet (8) aus humaner Haut (Abb. 24) wurde zunächst eine partielle alkalische Hydrolyse bei 45 °C durchgeführt. Zur Erhöhung der Anzahl an Lipopeptiden wurde die beschriebene Reaktionszeit (Marekov und Steinert, 1998) von 15 auf 10 min verkürzt. Spätere Untersuchungen zeigten, dass in diesen 10 min etwa 50% der proteingebundenen Lipide abgespalten werden (Abb. 34). Das durch die partielle Hydrolyse entstandene Pellet (10) wurde für 1 h mit Proteinase K verdaut, die im Überstand (12) gelösten Peptide wurden über eine C4-Säule getrennt. Dabei sollten die polaren Peptide ohne Bindung an die Säule sofort eluiert werden. Die hydrophoberen Lipopeptide sollten sich an das Säulenmaterial anlagern und erst durch einen Gradienten zu organischen Lösungsmitteln eluiert werden (Marekov und Steinert, 1998). Das Chromatogramm des HPLC-Laufs ist in Abb. 32 (durchgezogene Linie) gezeigt.

3. Ergebnisse

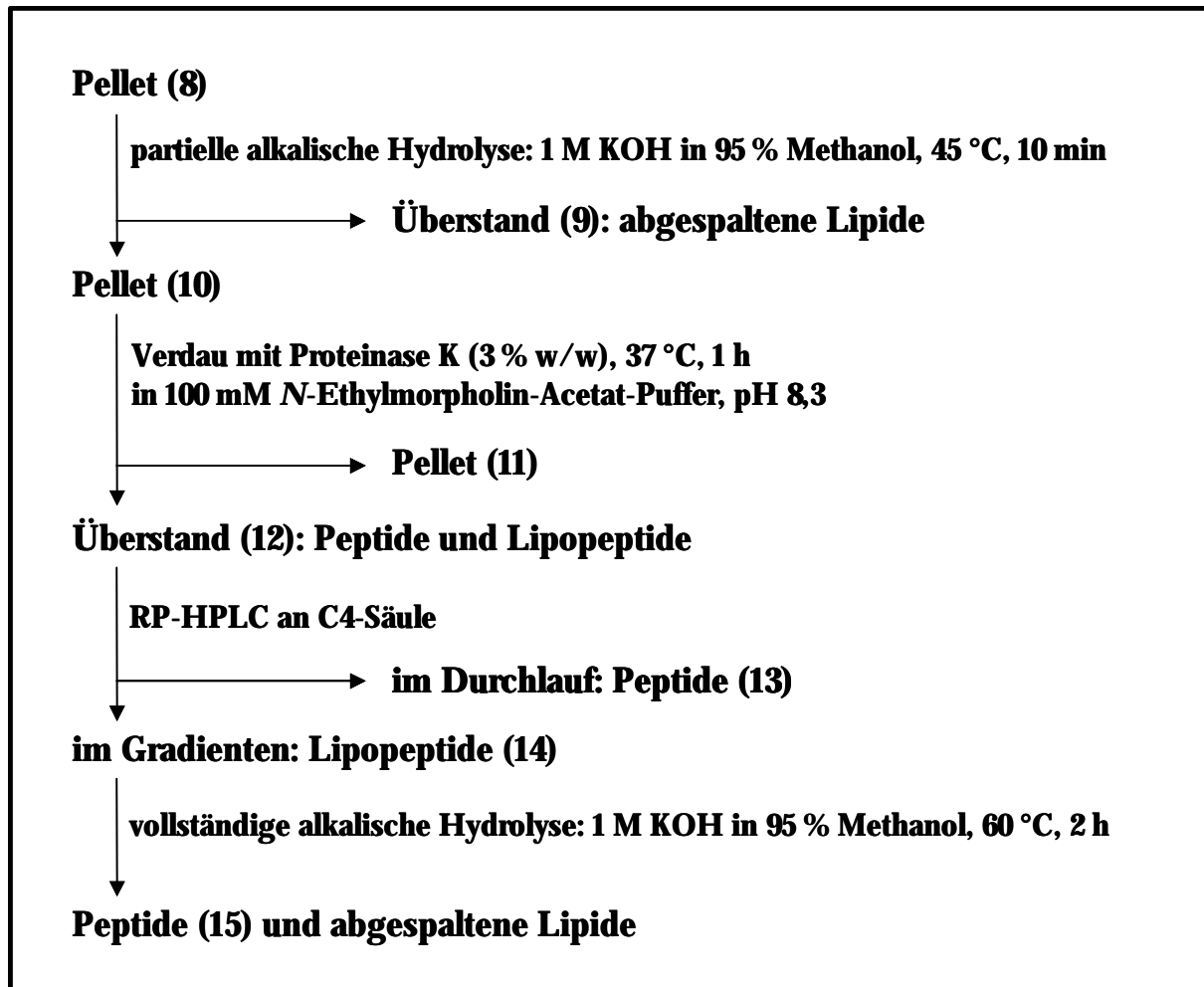


Abb. 31: Übersicht über die weiteren Arbeitsschritte an Pellet (8), mit denen die Ergebnisse von Marekov und Steinert (1998) reproduziert werden sollten.

Lipopeptide werden durch eine alkalische Hydrolyse in Peptide und Lipide gespalten. In einem erneuten HPLC-Lauf binden die entstandenen Peptide nicht mehr an die C4-Säule, sondern werden sofort eluiert. Die Lipide werden durch den UV-Detektor nicht erfasst.

Das gesamte Gradienten-Eluat (Abb. 32) wurde alkalisch hydrolysiert und erneut auf die C4-Säule gegeben. Das entsprechende Chromatogramm ist als gestrichelte Linie in Abb. 32 gezeigt. Man erkennt deutlich, dass die Substanzen, die vor der Hydrolyse durch den Gradienten eluiert wurden, nach der Hydrolyse verschwunden sind.

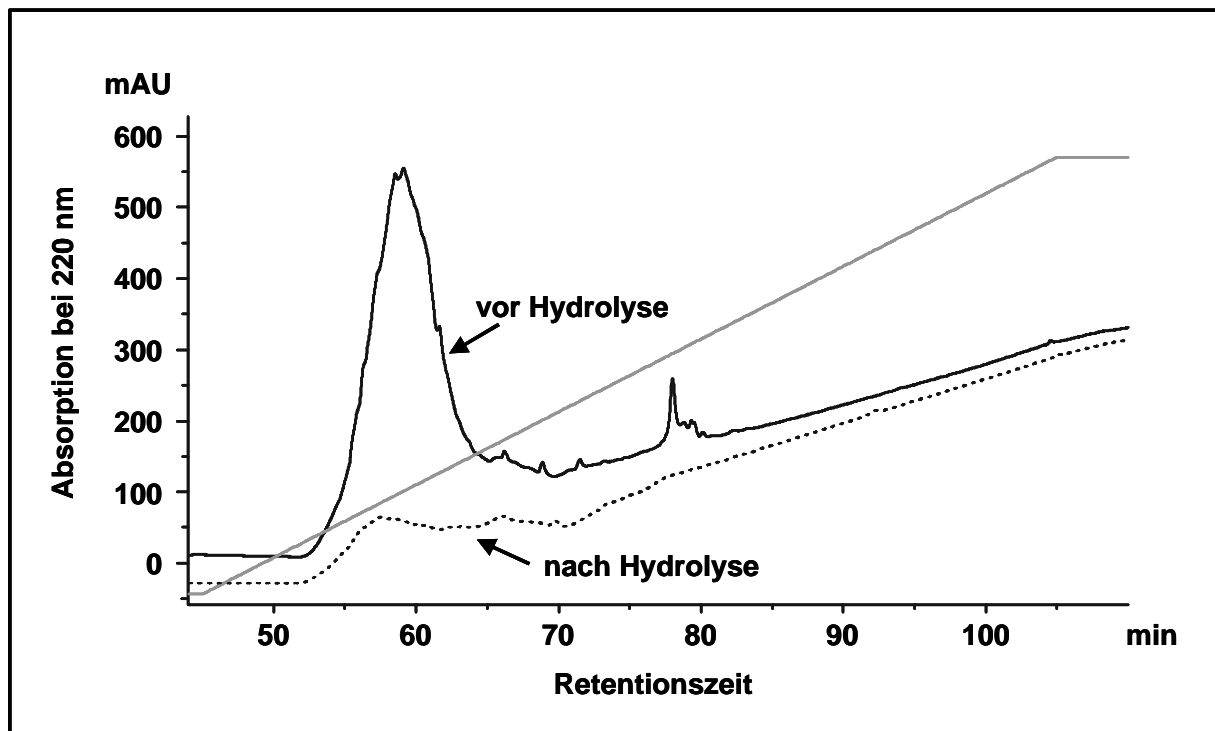


Abb. 32: HPLC-Chromatogramme der „Lipopeptide“ (14) vor und nach alkalischer Hydrolyse. Durch partielle Hydrolyse entstandenes Pellet (10) wurde 1 h mit Proteinase K verdaut, die im Überstand (12) gelösten Peptide wurden über eine C4-Säule getrennt (durchgezogene schwarze Linie). Der Gradient (graue Linie) geht von 10% Acetonitril in Wasser zu 15% Isopropanol in Acetonitril. Das gesamte Gradienten-Eluat wurde alkalisch hydrolysiert und erneut über die C4-Säule gegeben (gestrichelte Linie).

Die aus den Lipopeptiden durch Hydrolyse entstandenen Peptide (Peptide (15) in Abb. 31), die nicht an die C4-Säule banden, sondern innerhalb der ersten 10 min eluiert wurden, wurden über RP18-HPLC getrennt und mit ESI-QToF-MS und –MS/MS untersucht. Dabei konnten die zwei folgenden Peptide detektiert werden:

- a) Gly – Gly – Gly – Gly – 69 amu – Gly – Phe – Phe – Gly – Gly
- b) Gly – Gly – Gly – Gly – 69 amu – Gly – Phe – Phe – Gly – Gly – Gly

Die Masse von 69 amu entspricht einem Dehydroalanin, durch Eliminierung von Schwefelwasserstoff das aus einem Cystein entstehen kann (Jones *et al.*, 1983; Nakanishi *et al.*, 2004). Setzt man in den Peptiden an die Stelle der 69 amu Cystein ein, so ist die Sequenz spezifisch für humanes Loricrin, Gly³⁰ – Gly³⁹ bzw. Gly³⁰ – Gly⁴⁰.

3. Ergebnisse

Weitere Peptide konnten nicht detektiert werden, da zum einen die Menge an Peptiden sehr gering war und sie zum anderen häufig zu kurz waren, um sie sequenzieren und einem Protein eindeutig zuzuordnen zu können.

A	Gly - Gly - Gly - Gly - 69 amu - Gly - Phe - Phe - Gly - Gly	Gly ³⁰ - Gly ³⁹
B	Gly - Gly - Gly - Gly - 101 amu - Gly - Phe - Phe - Gly - Gly	Gly ³⁰ - Gly ³⁹
C	Gly - Gly - Gly - Gly - 69 amu - Gly - Phe - Phe - Gly - Gly - Gly	Gly ³⁰ - Gly ⁴⁰
D	Gly - Gly - Gly - Gly - 101 amu - Gly - Phe - Phe - Gly - Gly - Gly	Gly ³⁰ - Gly ⁴⁰
E	Gly - Ser - Gly - 101 amu - Gly - Tyr - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Tyr	Gly ⁴⁸ - Tyr ⁵⁹
F	Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - 101 amu - Phe - Ser - Ser - Gly	Gly ⁹⁸ - Gly ¹⁰⁷ Gly ¹⁰⁸ - Gly ¹¹⁷ Gly ¹²³ - Gly ¹³² Gly ¹³⁸ - Gly ¹⁴⁷ Gly ¹⁷¹ - Gly ¹⁸⁰
G	Gly - 101 amu - Phe - Ser - Ser - Gly	Gly ¹⁰² - Gly ¹⁰⁷ Gly ¹¹² - Gly ¹¹⁷ Gly ¹²⁷ - Gly ¹³² Gly ¹⁴² - Gly ¹⁴⁷ Gly ¹⁷⁵ - Gly ¹⁸⁰ Gly ²⁴³ - Gly ²⁴⁸
H	Gly - 101 amu - Phe - Ser - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser	Gly ¹⁰² - Ser ¹¹¹ Gly ¹¹² - Ser ¹²¹ Gly ¹²⁷ - Ser ¹³⁶
I	Gly - 101 amu - Phe - Ser - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser - Ser	Gly ¹¹² - Ser ¹²² Gly ¹²⁷ - Ser ¹³⁷
J	Ser - 69 amu - Ala - Pro - Gln - Pro - Ser - Tyr - Gly - Gly - Gly - Ser	Ser ²²² - Ser ²³³

Tab. 3: Loricrin-Peptide aus der Fraktion „Peptide (13)“ in Abb. 30.

Die Peptide, die nach partieller Hydrolyse durch einen Verdau mit Proteinase K von einer humanen CE-Probe abgespalten wurden und ohne Bindung an die C4-Säule eluiert wurden, wurden massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden die hier aufgeführten Peptide identifiziert.

Auch die Peptide (13) wurden über RP18-HPLC getrennt und massenspektrometrisch untersucht. Die dabei erhaltenen Peptide konnten alle als Peptide aus Loricrin identifiziert werden und sind in Tab. 3 aufgeführt. Lediglich Peptid G ist zu kurz, um eindeutig zugeordnet werden zu können.

Durch den Vergleich der Peptide A und C mit den Peptiden B und D fällt auf, dass Cystein auch mit der Masse 101 amu, also als ein um 2 amu leichteres Cystein, auftreten kann. Auch die Aminosäure Threonin hat eine Masse von 101 amu. Da aber ein Peptid wie B und D mit Threonin anstelle der 101 amu nicht existiert, konnten diese Peptide eindeutig Loricrin zugeordnet werden.

Eine massenspektrometrische Analyse der Lipopeptide (14) vor der Hydrolyse ergab keine sequenzierbaren Spektren.

Auf dem in Abb. 31 beschriebenen Weg konnten in Fraktion (15) nur zwei Peptide aus Loricrin identifiziert werden. Zusätzlich war die Analyse der Peptide (13) nicht zuverlässig reproduzierbar war. Um dennoch reproduzierbar sequenzierbare Peptide aus CE (8) generieren zu können, wurden die folgenden Parameter auf vielfältige Weise variiert:

- vollständige, partielle oder keine Hydrolyse
- Dauer der partiellen Hydrolyse
- Reduktion von Disulfidbrücken mit β -Mercaptoethanol und Alkylierung der entstandenen Cysteine mit Iodacetamid oder Iodessigsäure
- Verdau mit Trypsin, Proteinase K oder Plasmin
- Dauer des proteolytischen Verdaus
- verwendete Puffer Puffer beim Verdau
- CE- bzw. Protease-Konzentrationen während des Verdaus
- Zusatz von 5 mM Calciumchlorid und 10 % Acetonitril zum tryptischen Verdau
- Kombination verschiedener Proteasen in unterschiedlichen Reihenfolgen
- Verwendung unterschiedlicher Gefäße (Glas, silikonisierte Polypropylengefäße)
- Einengen des Proteolyse-Überstandes vor Auftragen auf die HPLC vs Auftragung des gesamten Überstandes über einen sehr langen Zeitraum.
- Einengen des Überstandes durch Vakuumkonzentration (Speedvac) oder Lyophilisierung

3. Ergebnisse

Nach vollständiger Hydrolyse von CE (8) ist der Zugang für Proteasen erleichtert, die Bindungsstellen sind jedoch nach einer Hydrolyse nicht mehr zu identifizieren. Auch die Trennung in Peptide und Lipopeptide ist nach einer Hydrolyse nicht mehr möglich. Durch eine partielle Hydrolyse werden u.U. gerade so viele Lipide abgespalten, dass eine Protease viele Peptide und vor allem genügend Lipopeptide freisetzt, die analysiert werden können. Dabei spielt die Dauer der partiellen Hydrolyse eine wichtige Rolle.

Während der CE-Präparation wurden durch das Kochen in Puffer A und die Weiterbehandlung mit Puffer B Disulfidbrücken reduktiv gespalten worden. Es ist jedoch möglich, dass zwei freie Cysteine später durch Luftsauerstoff wieder oxidiert werden und eine neue Disulfidbrücke knüpfen. Diese erneute Verbrückung kann unterbunden werden, indem die Disulfidbrücken erneut reduziert und die freien Cysteine mit Iodacetamid oder Iodessigsäure alkyliert werden. Beide Reagenzien sind gängige Alkylierungsmittel für Cysteine. Nach Alkylierung mit Iodessigsäure enthält das Produkt eine Säuregruppe, die das Lösungs- bzw. Suspendierungsverhalten u.U. anders beeinflusst als die ungeladene Amidgruppe.

Natürlich spielt auch die verwendete Protease eine große Rolle. Trypsin schneidet Peptide mit hoher Spezifität C-terminal von Lysin und Arginin. Sind gerade diese Aminosäuren selten bzw. schlecht erreichbar, gibt es zu wenige tryptische Spaltungen. Proteinase K schneidet unspezifisch, was zu einer höheren Ausbeute an Peptiden führt. Es ist jedoch anzunehmen, dass mit fortschreitender Dauer des Verdau bevorzugt die schon freigesetzten Peptide gespalten und zu kurz zur Sequenzanalyse werden. Ein kurzzeitiger Verdau mit Proteinase K, dem ein tryptischer Verdau folgt, könnte bewirken, dass der CE zunächst an wenigen Stellen durch Proteinase K geschnitten und damit aufgelockert wird und Trypsin später an definierten Stellen schneiden und Peptide von sequenzierbaren Größen freisetzen kann.

Plasmin (Fibrinolysin) ist Bestandteil des Serums und löst dort durch Spaltung von Fibrin Blutgerinnsel auf. Fibrin ist ein hochmolekulares wasserunlösliches Protein. Da Plasmin in der Lage ist, hochmolekulare wasserunlösliche Substanzen zu spalten, ist zu vermuten, dass es auch die komplexe Struktur des CE aufbrechen kann. Es könnte u.U. ebenfalls in Kombination mit Trypsin eingesetzt werden. Werden mehrere Proteasen verwendet, dürfen sie wegen der Möglichkeit des gegenseitigen Abbaus nur nacheinander eingesetzt werden. Das modifizierte Trypsin ist beispielsweise an Lysin und Arginin methyliert, so dass diese Reste keine positive Ladung mehr tragen. Damit ist das modifizierte Trypsin vor Autoproteolyse geschützt. Eine Proteolyse durch andere Proteasen verhindert diese Methylierung aber nicht.

Verschiedene Puffer oder Zusätze wie Acetonitril verändern das Lösungs- bzw. Suspensionsverhalten des CE und der abgespaltenen Peptide bzw. Lipopeptide sowie die Aktivität der jeweiligen Protease. Einen ähnlichen Einfluss hat das Gefäß, in dem die Proteolyse stattfindet. Lagern sich die abgespaltenen Lipopeptide z.B. an die Gefäßwand von gewöhnlichen Eppendorfgefäßen aus Polypropylen an, lassen sie sich u.U. nicht mehr ablösen und sind einer weiteren Analyse nicht zugänglich.

Wird der Überstand einer Proteolyse (z.B. (12) oder (15) in Abb. 31) vor der Trennung über HPLC aufkonzentriert, kann es dabei ebenfalls zur irreversiblen Fällung hydrophober Peptide kommen, die dann im Gefäß zurückbleiben. Wird nicht aufkonzentriert, wird ein recht großes Volumen auf die HPLC aufgetragen (zwei- bis dreifaches Säulenvolumen). Dabei ist nicht auszuschließen, dass die Peptide zwar an die Säule binden, aufgrund des langen Probenauftrags jedoch bereits vor Abschluß des Probenauftrags und damit vor Beginn des Gradienten eluiert werden.

Ein weiterer Gesichtspunkt ist die zum Aufkonzentrieren des Überstands angewendete Methode. Einengen durch Vakuumkonzentration (Speedvac) fördert durch die gleichzeitige Zentrifugation evtl. das Anlagern der Peptide an die Gefäßwand. Die Peptide bleiben jedoch bis zum Schluss in wässriger Umgebung. Bei einer Lyophilisierung lagern sich die Substanzen nicht so stark an die Gefäßwand an. Die Peptide, die zuerst trocknen, verlieren währenddessen die umgebende Flüssigkeit. Häufig sind diese Substanzen danach nicht mehr löslich.

Keine der genannten Variationen führte zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Lediglich in zwei Ansätzen konnten Peptide identifiziert werden, die nicht zu der eingesetzten Protease gehörten.

Beim ersten dieser beiden Ansätze wurde humanes CE (8) 15 min partiell alkalisch hydrolysiert. Nach Entfernung der Lipide wurde das zurückbleibende Pellet 15 min mit Proteinase K verdaut und nach Zentrifugation der Überstand entfernt. Das Pellet wurde erneut für 6 h mit Proteinase K verdaut und der Überstand nach Aufkonzentrieren über RP18-HPLC getrennt. Die massenspektrometrische Analyse ergab neben einigen Peptiden aus Proteinase K folgende Peptide:

Gly – 101 amu – Phe – Ser – Ser – Gly

Gly – 101 amu – Phe – Ser – Ser – Gly – Gly – Gly – Gly

Gly – 101 amu – Phe – Ser – Ser – Gly – Gly – Gly – Gly – Ser

3. Ergebnisse

Das erste und das dritte Peptid entsprechen den Peptiden G und H aus Loricrin in Tab. 3. Das 2. Peptid ist demnach auch ein Peptid aus Loricrin:



Im zweiten Ansatz, der sequenzierbare Peptide lieferte, wurde humanes CE (8) ohne vorherige Hydrolyse über 6 h mit Proteinase K verdaut und der Überstand ohne weiteres Aufkonzentrieren direkt auf die HPLC-Säule gegeben. Die massenspektrometrische Analyse ergab u.a. die in Abb. 33 gezeigten ESI-MS/MS-Spektren.

Im ersten Spektrum erkennt man die γ -Serie von Gln – Ala – Pro – Thr – Trp – Pro – Ser – Lys, die spezifisch für humanes Loricrin: Gln³⁰⁹ – Lys³¹⁶ ist. Im zweiten Spektrum ist dieselbe γ -Serie bis zum Serin³¹⁵ bei einem γ -Ion von 377,23 amu zu sehen. Da Loricrin mit Lys³¹⁶ endet und das Lys- γ 1-Ion nur eine Masse von 147,11 amu hat, muss an dieses Peptid noch etwas gebunden sein. Wie schon bei den Peptiden in Überstand (7) liegt eine Isodipeptidbindung zu einem anderen Peptid vor. Zieht man von 377,23 amu alle Massen ab, die für Ladung, N- und C-Terminus des Loricrin-Peptids und des zweiten Peptids benötigt werden, sowie die Massen für die beteiligten miteinander verbundenen Aminosäuren Lysin und Glutamin, so bleibt für weitere Aminosäuren des zweiten Peptids eine Masse von etwa 101 amu. Dies entspricht einem Threonin (Abb. 33 C). An welcher Seite des Isodipeptid-verbrückten Glutamins des zweiten Peptids das Threonin sitzt, geht aus dem Spektrum nicht hervor. Für Lys³¹⁶ in Loricrin ist u. a. eine Isodipeptidbindung zu Gln²²⁰ in Loricrin beschrieben, das sich zwischen zwei Threoninen befindet (Steinert und Marekov, 1995). Die Reihenfolge im zweiten Peptid kann also nicht geklärt werden. Dass es sich bei dem zweiten Peptid um Thr²¹⁹ – Gln²²⁰ oder Gln²²⁰ – Thr²²¹ aus Loricrin handelt, ist zwar auch nicht bewiesen, aber sehr wahrscheinlich. Nachgewiesen dagegen wurde, dass es sich bei dem Gesamtpeptid um Gln³⁰⁹ – Lys³¹⁶ aus Loricrin handelt, an dessen C-terminales Lysin über eine Isodipeptidbindung ein Glutamin gebunden ist, an dem noch ein Threonin oder Cystein hängt.

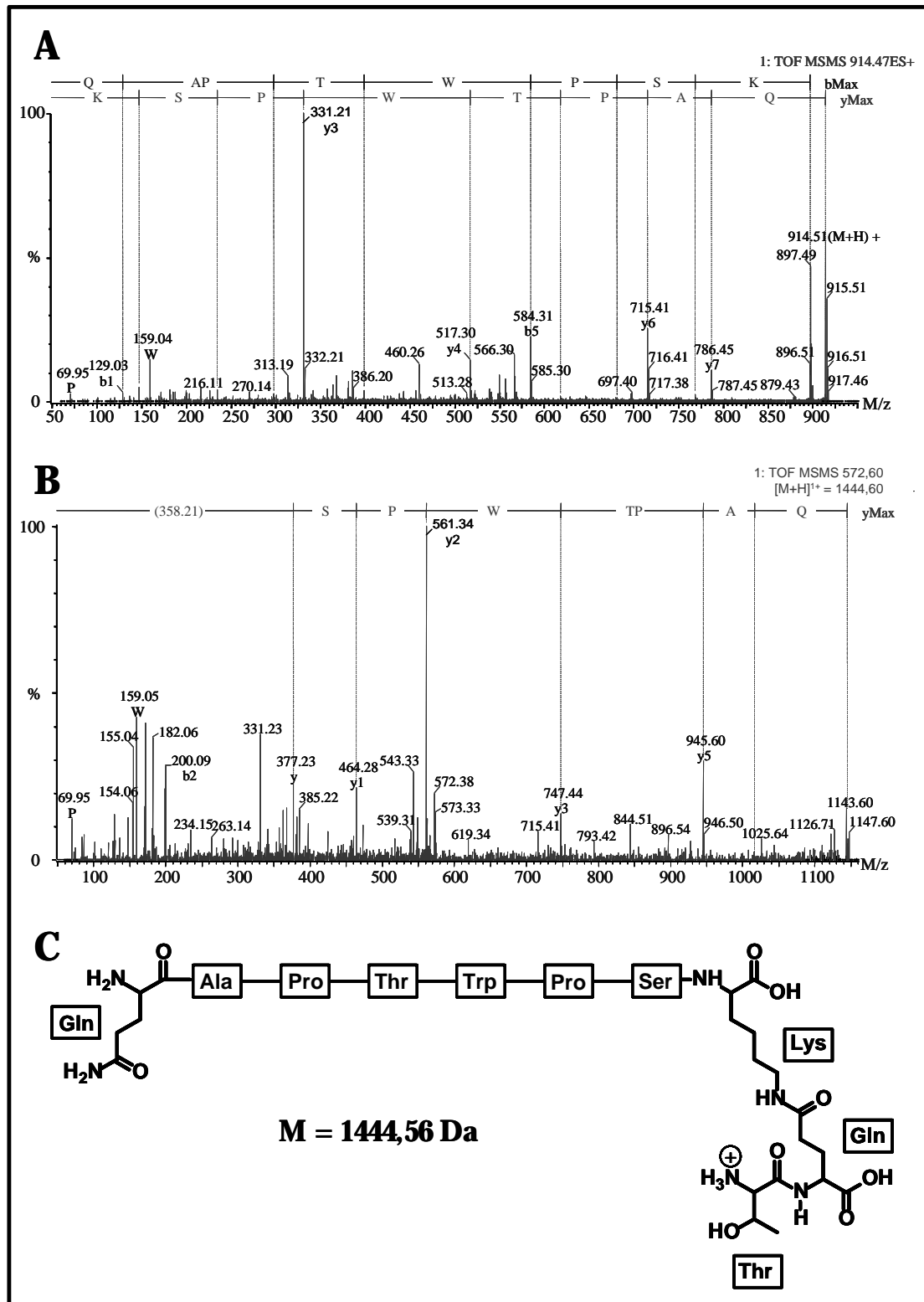


Abb. 33: ESI-MS/MS-Spektren eines Peptids aus humanem Loricrin (A) und desselben Peptids mit einer Isodipeptidbindung (B), dessen Struktur in Teil C abgebildet ist.

Humanes CE (8) wurde ohne vorherige Hydrolyse über 6 h mit Proteinase K verdaut und der Überstand ohne weiteres Aufkonzentrieren direkt auf die HPLC-Säule gegeben, getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In Spektrum A sind die y- und die b-Serie markiert, in Spektrum B nur die y-Serie. Die angegebene Differenz von 358,21 amu am N-Terminus entspricht der Fragmentmasse einer oder mehrerer Aminosäuren, deren y₁-Ion eine Masse von 377,23 hat.

Weitere Peptide, die in diesem Experiment gefunden wurden, sind in Tab. 4 aufgeführt.

3. Ergebnisse

Eine Übersicht über alle in diesem Experiment identifizierten Peptide gibt Tab. 4. Da zur Identifizierung eines Proteins ein Peptid von mindestens 5 – 6 Aminosäuren vorliegen muss, ist die Zuordnung der Peptide E und F zu Loricrin nicht gesichert. Die Zuordnung erfolgt aus dem Vergleich mit den anderen Peptiden. Auch das zweite Peptid in Peptid E ist zu kurz, um einem Protein zugeordnet werden zu können. Diese Sequenz kommt in den drei genannten CE-Proteinen, Involucrin, Keratin 10 und Periplakin, ebenso wie in über 100 anderen humanen Proteinen vor. In Peptid F ist das zweite Peptid wesentlich länger, zeigt jedoch keine weiteren erkennbaren Fragmente, so dass zur Zuordnung nur die Summe der einzelnen beteiligten Aminosäuren zur Verfügung steht. Doch keins der drei für Peptid E genannten Proteine besitzt ein Peptid, das die Sequenz Glu – Tyr – Gln enthält und die erforderliche Gesamtmasse hat. Auch die Sequenz (Gln/Lys) – Glu – Tyr – Gln kommt in keinem der Proteine vor. Daher kann angenommen werden, dass in diesem zweiten Peptid eine weitere Isodipeptidbindung zu einem dritten Peptid vorliegt.

Peptid G ist schon aus Überstand (7) bekannt (Tab. 2, Peptid D). Auch hier kann über die Sequenz des zweiten Peptidfragments außer der Masse von 420 amu keine weitere Information gewonnen werden.

Abb. 34 zeigt den Verbleib der w-OH-Lipide während der in Abb. 31 dargestellten Arbeitsschritte. Wie bei der CE-Präparation wurden die Werte exemplarisch bei einer Durchführung an CE aus Maus ermittelt. Teil A zeigt eine Gesamtübersicht, Teil B eine Vergrößerung der letzten Säulen. Für jede Stufe ist das Trockengewicht angegeben, wobei dieses für die Überstände (9) und (12) wiederum als Differenz der Massen der jeweiligen Pellets berechnet wurde. Für die Stufen (13) und (14) war dies nicht mehr möglich (n). Ferner wurde für alle Stufen die Aminosäuremenge und die Menge an w-OH-Lipiden bestimmt. Die kovalente Bindung der w-OH-Lipide in den Pellets wurde durch vorausgehende Extraktionskontrollen nachgewiesen, bei den Überständen war dies jedoch nicht möglich. Wie in Abb. 26 weisen auch hier die Werte einen großen Fehler auf und zeigen nur Größenordnungen und Tendenzen auf. Die Größe des Fehlers zeigt sich z.B. in der Aminosäuremenge von Pellet (10).

A	Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys	Loricrin: Ala ³¹⁰ - Lys ³¹⁶
B	Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys (Gln + Thr)	Loricrin: Ala ³¹⁰ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Loricrin: Gln ²¹⁵ + Thr
C	Gln - Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys	Loricrin: Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶
D	Gln - Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys (Gln + Thr)	Loricrin: Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Loricrin: Gln ²¹⁵ + Thr
E	Pro - Ser - Lys Glu - Tyr - Gln	Loricrin: Pro ³¹⁴ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Involucrin: Glu ⁹⁷ - Gln ⁹⁹ oder Keratin 10: Glu ⁴³¹ - Gln ⁴³³ oder Periplakin: Glu ¹⁰⁶⁹ - Gln ¹⁰⁷¹
F	Pro - Ser - Lys (583) - (Lys/Gln) - Glu - Tyr - Gln	Loricrin: Pro ³¹⁴ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung wie oben, vermutlich im zweiten Peptid weitere Isodipeptidbindung
G	Gln - Ala - Pro - Thr - Trp - Pro - Ser - Lys (Gln + 420)	Loricrin: Gln ³⁰⁹ - Lys ³¹⁶ Isodipeptidbindung zu Gln + 420 amu

Tab. 4: Identifizierte Peptide aus humanem Loricrin.

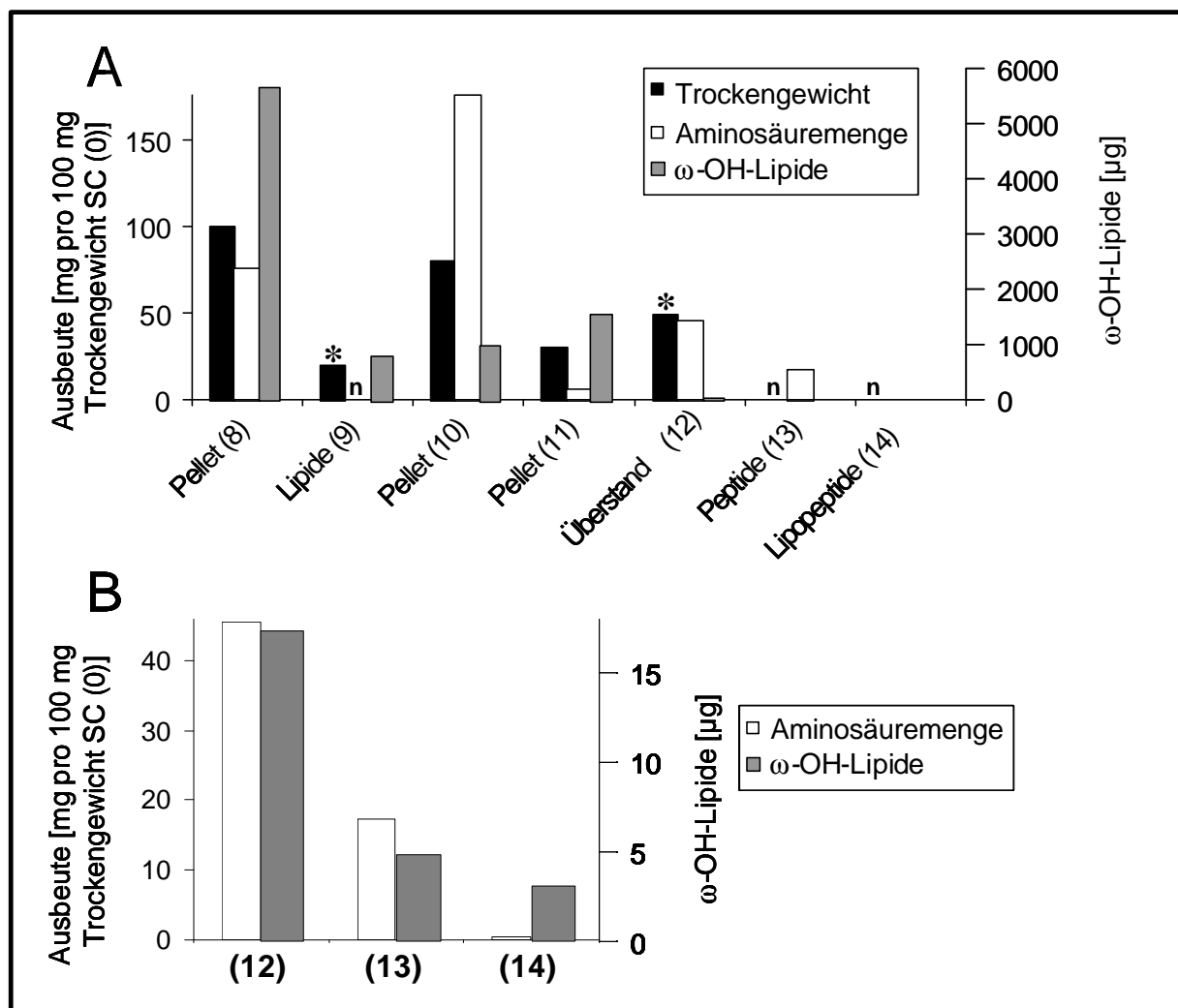
Im bei Abb. 33 beschriebenen Experiment wurden neben einigen Peptiden aus Proteinase K die hier aufgeführten Peptide gefunden. Die Spektren von Peptid C und D sind in Abb. 33 gezeigt.

Senkrechte Striche symbolisieren Isodipeptidbindungen. Die Zahlen in Klammern geben die Massen an, die für die Aminosäuren des zweiten verbrückten Peptids noch zur Verfügung stehen, nachdem die für N- und C-Terminus und die an den Isodipeptidbrücken beteiligten Aminosäuren benötigten Massen abgezogen wurden.

Man erkennt, dass durch die partielle alkalische Hydrolyse etwa die Hälfte der kovalent gebundenen Lipide in Überstand (9) freigesetzt wurden, die andere Hälfte blieb an Pellet (10) gebunden. Durch den Verdau mit Proteinase K wurden etwa $\frac{2}{3}$ der Masse von Pellet (10) abgespalten, der Großteil der Lipide verbleibt während des Verdaus jedoch an Pellet (11), das als festes Pellet einer Analyse jedoch nicht zugänglich ist. In Überstand (12) finden sich dementsprechend kaum w-OH-Lipide. Abb. 34 B zeigt, dass die

3. Ergebnisse

Aufteilung von Überstand (12) in Peptide (13) und Lipopeptide (14) über C4-HPLC dazu führt, dass die meisten Peptide in Fraktion (13) gelangen, die ω -OH-Lipide sich jedoch nahezu gleich verteilen. Da in Fraktion (14) also kaum Peptide vorhanden sind, ist das Verhältnis von ω -OH-Lipiden zu Peptiden demzufolge sehr hoch. Das macht Fraktion (14) sehr aussichtsreich für die Identifizierung von Protein-Lipid-Bindungsstellen. Ein Nachteil ist jedoch die sehr geringe Ausbeute. Man erhält aus 100 mg CE (8) weniger als 500 μ g Lipopeptid (14), wobei man zur Präparation von 100 mg CE (8) etwa 3,03 g SC benötigt. Aufgrund dieser Mengenverhältnisse ist es essentiell, dass die einzelnen



Schritte routinemäßig reproduzierbar ablaufen.

Abb. 34: Verbleib der ω -OH-Lipide während der in Abb. 31 dargestellten Arbeitsschritte.

Teil A zeigt eine Gesamtübersicht, Teil B eine Vergrößerung der letzten Säulen.

Für jede Stufe sind Trockengewicht, Aminosäuremenge und die absolute Menge an ω -OH-Lipiden dargestellt.

Bei den mit * gekennzeichneten Überständen wurde die Ausbeute als Differenz zwischen den entsprechenden Pellets berechnet. n: nicht gemessen, n = 1

Da jedoch alle Versuche, sequenzierbare Peptide aus CE reproduzierbar und in detektierbaren Mengen zu generieren, scheiterten, wurde dieses Vorhaben aufgegeben und nach anderen Möglichkeiten gesucht, die Protein-Lipid-Bindungsstellen im CE aufzuklären.

Hinzu kommt, dass die dünnschichtchromatographische Analyse der Lipide aus den Überständen (12), (13) und (14) nach alkalischer Hydrolyse ein sehr ähnliches Muster wie ohne alkalische Hydrolyse ergab, analog zu den Ergebnissen aus Überstand (7).

3.2.6 Affinitätsspaltung

Während der Experimente zur Umesterung eines Glutaminsäurelipidesters in einen Glutaminsäuremethylester stellte sich heraus, dass der Peptidstrang N-terminal neben dem Glutaminsäureester bei längerer Reaktionszeit gespalten wird. Dabei entstand aus dem Glutaminsäureester am neuen N-Terminus ein Pyroglutamat (s. Abb. 21 C), der C-Terminus des anderen neu entstandenen Peptids trägt einen Methylester. Kinetikstudien an Modellpeptiden zeigten, dass die Umesterung eines Benzylesters in einen Methylester etwa 30 min dauert, nach 18 h findet man nahezu quantitativ die Produkte der Spaltung (Sawatzki *et al.*, 2005). Da diese Spaltung selektiv an veresterten Glutamaten stattfindet, kann sie als Affinitätsspaltung bezeichnet werden.

Durch diese Spaltung sollte es nun möglich sein, Peptide, die sich zwischen zwei veresterten Glutamaten, also zwischen zwei Lipidbindungsstellen, befinden, freizusetzen. Voraussetzung ist, dass sie nicht über eine Isodipeptidbindung an den CE gebunden sind. Die freigesetzten Peptide sollten am N-Terminus ein Pyroglutamat und am C-Terminus einen Methylester tragen.

Ein erstes Spaltungsexperiment an CE aus Maus zeigte, dass die bei der Affinitätsspaltung freigesetzten Lipide die Analyse erheblich stören und u.U. Signale von Peptiden sowohl im HPLC-Chromatogramm als auch im Massenspektrum überdecken.

In einem zweiten Experiment wurden unter Ausschluss von Wasser 23 mg CE (8) aus Maus 8 h mit Natriummethanolat inkubiert. Zur Ermöglichung einer MALDI-Messung der Gesamtprobe wurde nach Ablauf der Reaktionszeit mit TFA bei 0 °C angesäuert, eine MALDI-Probe entnommen und der Reaktionsansatz danach mit festem Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Nach Neutralisation mit Essigsäure ist eine MALDI-Messung nicht möglich. Durch Entstehung des Essigsäure-Acetat-Puffers erhält

3. Ergebnisse

man jedoch reproduzierbar einen schwach sauren pH-Wert. Die Neutralisation mit TFA ermöglichte in Vorversuchen an einer Peptidmischung die MALDI-Messung, es bildet sich aber kein Puffer. Dieser entsteht erst durch die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat.

Nach Zentrifugation des Reaktionsgemisches wurde der Überstand, der die abgespaltenen Peptide enthalten sollte, abgenommen, mit Wasser versetzt und das organische Lösungsmittel entfernt. Die Lipide wurden mit Chloroform extrahiert. Vorversuche an einer Mischung aus verschiedenen Lipiden und Peptiden wie Modellpeptid A zeigten, dass sich nach der Extraktion in der Chloroformphase mittels MALDI-MS keine Peptide nachweisen lassen.

Bei Durchführung der Affinitätsspaltung an CE aus Maus konnten weder direkt nach dem Ansäuern noch nach Neutralisation und Entfernen der Lipide im MALDI-Spektrum Signale detektiert werden.

Die von Lipiden befreiten Peptide wurden über RP18-HPLC getrennt und massenspektrometrisch analysiert. In den Proben befanden sich Peptide, deren ESI-MS/MS größtenteils einen Peak bei 112 amu aufwies. Das b₁-Ion von Peptiden, die ein N-terminales Pyroglutamat tragen, hat eine Masse von 112,04 amu. Dieses Ion kann jedoch auch aus anderen Strukturen entstehen.

Die erhaltenen Spektren ließen sich keinen Peptiden zuordnen. Zum einen waren die meisten Peptide zu kurz (< 800 Da), zum anderen deutete das häufige Auftreten von Abständen von 112 amu darauf hin, dass z.B. an den Isodipeptidbindungen weitere Modifizierungen stattgefunden haben, die zu unbekanntem Massen und Fragmenten führten. Auch die wenigen Spektren größerer Peptide waren nicht interpretierbar.

Durch eine Messung am ESI-FT-ICR-Massenspektrometer (Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonance) sollte überprüft werden, ob es sich bei dem Fragment von 112 amu tatsächlich um das b₁-Ion eines Pyroglutamats handelt. Diese Messungen wurden von Dr. Michael Mormann in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinic am Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Universität Münster durchgeführt. Vermessen wurde eine HPLC-Fraktion, die im ESI-QToF-MS-Spektrum u.a. einfach geladene Ionen der Massen 557,30 amu, 626,31 amu und 658,34 amu enthielt. Die ESI-MS/MS-Spektren dieser Vorläuferionen enthielten alle einen Peak bei 112 amu. Die übrigen Massenpeaks im MS-Spektrum zeigten diesen Peak nicht oder wurden nicht fragmentiert, da sie eine zu geringe Intensität oder eine zu kleine Masse (< 500 amu)

hatten. Beim Vergleich der Massen der Vorläuferionen ergaben sich Differenzen von 69 amu (626 – 557) und 101 amu (658 – 557), die dadurch erklärt werden können, dass sich alle drei Spezies aus einem Peptid gebildet haben und sich um einen Cysteinrest unterscheiden. In diesem Fall besäße das Peptid der Masse 557,30 kein Cystein, das Peptid der Masse 626,31 ein Cystein in Form eines Dehydroyalanins (69 amu) und das Peptid der Masse 658,34 ein Cystein mit einer Inkrementmasse von 101 amu. Diese Modifikationen sind in Tab. 3 beschrieben.

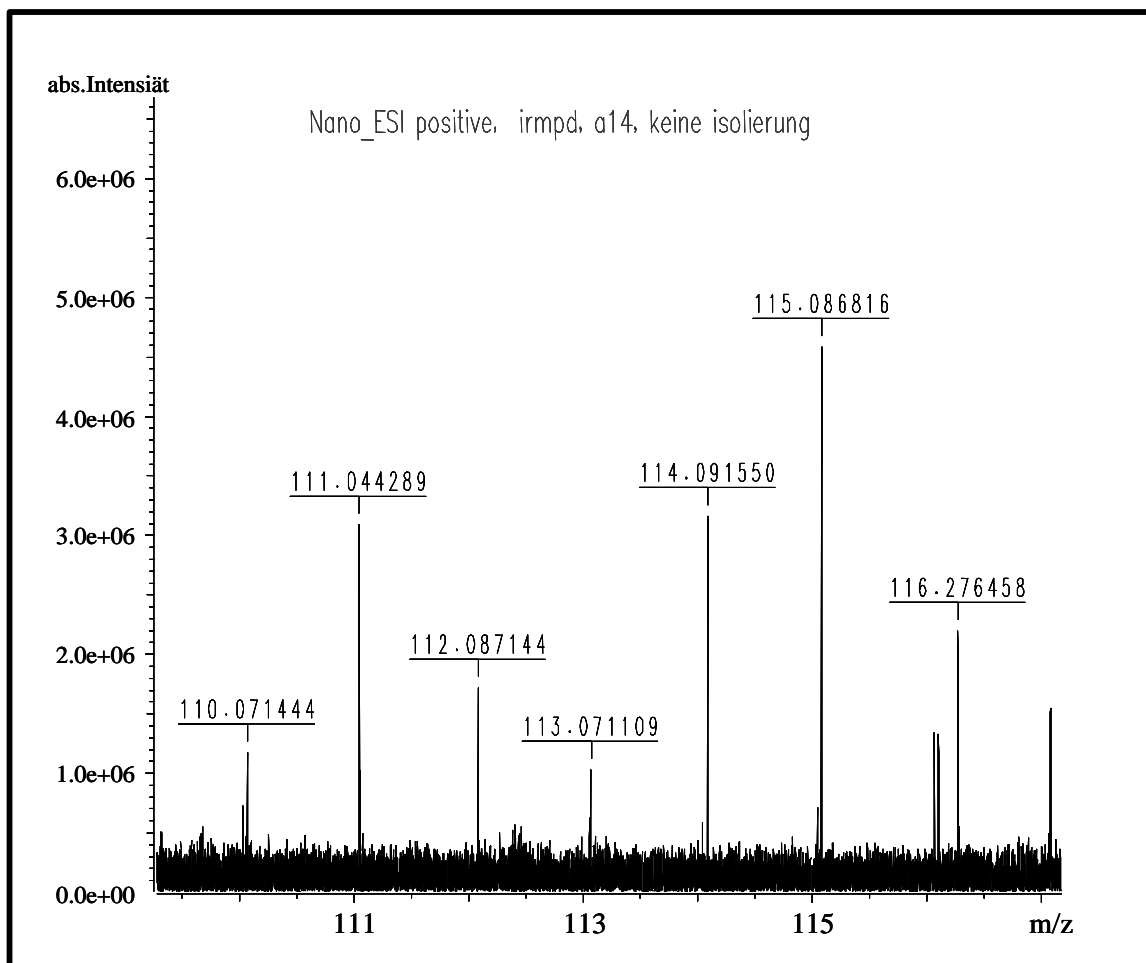


Abb. 35: Ausschnitt aus dem ESI-FT-ICR-MS/MS-Spektrum einer HPLC-Fraktion nach der Affinitätsspaltung.

Im MS-Spektrum war kein Peak bei m/z 112 detektierbar. Aufgrund der geringen Intensität der Probe konnte keines der Vorläuferionen isoliert werden, die im ESI-QToF-Spektrum das Fragment bei m/z 112 zeigten. Daher wurden alle Ionen als Gemisch über IRMPD fragmentiert. Das hier gezeigte Spektrum zeigt einen Ausschnitt des Fragmentspektrums, in dem das Fragment bei 112,0871 amu zu sehen ist.

Auch im ESI-FT-ICR-MS-Spektrum konnten u.a. die einfach geladenen Ionen mit den Massen 557,2874 amu, 626,3100 amu und 658,3369 amu detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Bei m/z 112 konnte im MS-Spektrum kein Peak detektiert werden. Für FT-ICR-

3. Ergebnisse

Messungen werden größere Probenmengen benötigt. Für die Aufnahme von MS/MS-Spektren konnten daher von keinem der Vorläuferionen genügend Ionen isoliert werden. Aus diesem Grunde wurden alle Ionen gemeinsam durch IRMPD (Infrared Multiphoton Dissociation) fragmentiert. Dabei entstand neben vielen anderen Fragmenten ein Fragment der Masse $112,0871 \pm 0,0001$ amu (Abb. 35), das damit definitiv kein b1-Ion eines Pyroglutamats ist. Dessen Masse läge bei $112,039854$ amu. Die gefundene Masse passt am ehesten auf die Summenformel $C_5H_{10}N_3$ ($M = 112,087472$), die sich jedoch auch keinem bekannten Fragment zuordnen lässt. Selbst hier ist die Abweichung noch sehr hoch.

Analog zur Umesterung (Abb. 22) sollte auch hier sichergestellt werden, dass durch die Affinitätsspaltung die gleichen Lipide abgespalten werden wie durch eine klassische alkalische Hydrolyse (Wertz und Downing, 1987). Daher wurden die Lipidmuster folgender Proben dünn-schichtchromatographisch verglichen:

- w-OH-Lipide, die von humanem SC durch eine alkalische Hydrolyse abgespalten wurden.
- w-OH-Lipide, die von humanem CE durch eine alkalische Hydrolyse abgespalten wurden.
- w-OH-Lipide, die aus humanem CE durch eine Affinitätsspaltung freigesetzt wurden.

Grundsätzlich sollten diese Lipidproben im DC identische Muster zeigen. Als einziger Unterschied war zu erwarten, dass die Menge an w-OH-Lipiden pro Trockengewicht CE etwa 2,5 mal höher als die im SC sein würde.

Alle diese Proben enthielten Salze, die zunächst entfernt werden mussten. Bei der Entsalzung über RP-18-Material treten häufig Verunreinigungen auf (s. Abb. 17). Daher wurden die Lipide nach der Bligh-Dyer-Methode entsalzt, bei der die Lipide in einem Zweiphasensystem aus Chloroform Methanol/Wasser in die unpolare Chloroformphase übergehen, während sich die Salze in der polaren Methanol/Wasser-Phase lösen (Signorelli und Hannun, 2002).

Abb. 36 zeigt die Lipidverteilung in den drei genannten Proben nach dünn-schichtchromatographischer Trennung. Dabei wurden die aus SC freigesetzten Lipide einmal über RP-18-Säulchen und einmal nach der Bligh-Dyer-Methode entsalzt. Die aus CE

freigesetzten Lipide wurden nur nach der Bligh-Dyer-Methode entsalzt. Bei den nach Bligh-Dyer entsalzten Proben wurden die wässrigen Phasen, die nur noch Salze und keine Lipide mehr enthalten sollten, über RP-18-Säulchen entsalzt und ebenfalls dünn-schichtchromatographisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass weniger als 4 % der Lipide noch in der wässrigen Phase verblieben waren (Daten nicht gezeigt). Eine analoge Kontrolle zur RP-18-Entsalzung wurde nicht durchgeführt. Da aber die durch die RP-18-Entsalzung erhaltenen Lipidmengen nur wenig geringer waren als die durch die Bligh-Dyer-Methode gewonnenen, können beide Methoden bezüglich der Ausbeute als vergleichbar angesehen werden.

Extrahierte man die wässrige Phase bei der Bligh-Dyer-Methode noch zweimal mit Chloroform, so ließ sich der Lipidanteil in der wässrigen Phase auf unter 2,5 % senken.

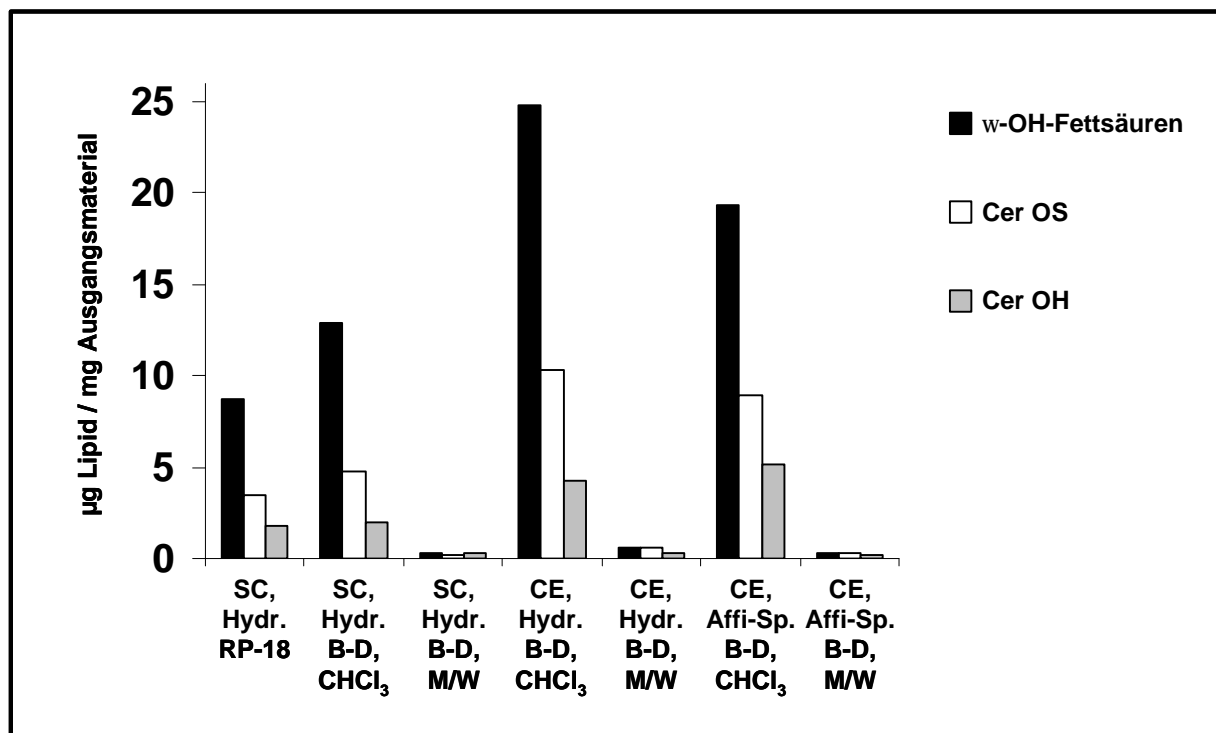


Abb. 36: Profile der proteingebundenen Lipide nach dünn-schichtchromatographischer Trennung.

Als Ausgangsmaterialien wurden SC und CE aus humaner Haut verwendet. Bei beiden wurden die proteingebundenen Lipide durch eine alkalische Hydrolyse (Hydr.) abgespalten. Außerdem wurden die Lipide einer CE-Probe durch die Affinitätsspaltung (Affi-Sp.) freigesetzt. Die meisten Lipidproben wurden nach der Bligh-Dyer-Methode (B-D) entsalzt. Dabei wurden sowohl die Chloroform-Phase (CHCl₃) analysiert als auch die Methanol/Wasser-Phase (M/W), die über eine RP-18-Säule erneut entsalzt wurde. Eine der SC-Proben wurde zum Vergleich direkt über RP-18 entsalzt (RP-18).

(n = 1)

3. Ergebnisse

Vergleicht man die Mengen der freigesetzten Lipide aus SC und CE miteinander, so waren die prozentualen Verteilungen der Lipide gleich. Die aus CE gewonnenen Mengen waren jedoch, wie schon in Kap. 3.2.3 beschrieben, um das 2 – 3fache größer als die aus SC freigesetzten. Jedoch war die Gesamtmenge an *w*-OH-Lipiden in allen Proben dieses Experimentes etwa 2,5 mal so hoch wie in den Analysen der CE-Präparation.

Beim Vergleich der Abspaltung durch Hydrolyse mit der Affinitätsspaltung erkennt man zwar leichte Unterschiede, sie folgen jedoch keinem Trend und können damit eher als Schwankungen innerhalb der Fehlergrenzen angesehen werden.

Dass bei der Affinitätsspaltung die gleichen Lipide in gleichen Mengen abgespalten werden wie durch eine alkalische Hydrolyse, zeigt, dass diese Spaltung grundsätzlich eine Methode zur Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen darstellt. Da diese Methode aber bislang noch keine Spektren von Peptiden mit N-terminalem Pyroglutamat lieferte, muss sie noch wesentlich verbessert werden. Auch bezüglich der noch unbekanntem Modifikationen, die u.a. die Massenabspaltung von 112 amu verursachen, besteht noch Klärungsbedarf.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung von Suizidinhibitoren der epidermalen ω -Hydroxylase

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Zielstruktur entworfen, durch die die humane epidermale ω -Hydroxylase inhibiert werden sollte. Der potentielle Inhibitor wurde als eine langkettige Fettsäure (C[≅] 24) mit terminaler Dreifachbindung konzipiert. Dieses Molekül sollte in zwei verschiedenen Kettenlängen synthetisiert werden.

Die Dreifachbindung wurde in einer Substitutionsreaktion durch einen nucleophilen Angriff von Lithiumacetylid an einen ω -Bromalkohol eingeführt. Zum Aufbau der langen Fettsäureketten wurde der Alkohol, der terminal die Dreifachbindung trug, zum Aldehyd oxidiert und über eine Wittig-Reaktion mit geeigneten ω -Bromcarbonsäuremethylestern verknüpft. Die Methylester wurden im letzten Schritt der Synthese zu den entsprechenden Säuren verseift.

Auf diesem Wege wurden mit geringem Aufwand zwei potentielle Inhibitoren der humanen epidermalen ω -Hydroxylase, Tetracos-11-en-23-insäure (IS-24) und Triacos-17-en-29-insäure (IS-30), synthetisiert (Abb. 11).

Beide Moleküle bewirkten im Lipidmuster von humanen differenzierten Keratinozyten eine Abnahme der Menge von neu synthetisiertem Cer (EOS), dem häufigsten der frei extrahierbaren Ceramide, deren Fettsäure ω -hydroxyliert und mit Linolsäure verestert sind. Durch Zusatz von 50 μ M IS-24 bzw. IS-30 konnte die Menge an Cer (EOS) auf etwa 20 % des Kontrollwertes gesenkt werden, was als 80 %ige Inhibierung der ω -Hydroxylase gedeutet werden kann. Schon in Konzentrationen von 10 μ M wird das Enzym zu 60 % inhibiert. Der in der Literatur beschriebene Inhibitor ABT bewirkt eine ähnlich große Abnahme der Menge an Cer (EOS) auf etwa 40 % der Kontrolle, jedoch bei 1000fach höherer Konzentration. Basierend auf ähnlichen Experimenten wurde für ABT eine Reduktion der Acylceramide, also Cer (EOS), Cer (EOH) und Cer (EOP), auf ca. 60 % der Kontrolle beschrieben (Behne *et al.*, 2000). In der genannten Arbeit wurde gleichzeitig mit der Zugabe von 10 mM Inhibitor eine metabolische Markierung mit [¹⁴C]-Acetat über 6 h durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Zellen zunächst über 24 h mit ABT (10 mM) vorinkubiert und dann über 2 h zusätzlich mit

4. Diskussion

[3-³H]-Sphingosin metabolisch markiert. Diese experimentellen Unterschiede können die unterschiedlich starke Inhibierung durch ABT plausibel erklären, so dass sich die Ergebnisse entsprechen.

Auch die Mengen der anderen mit Linolsäure veresterten Ceramide, Cer (EOH) und Cer (EOP), sollten unter Einfluss von IS-24 und IS-30 sinken. Diese Ceramide waren jedoch nicht nachweisbar, da die metabolische Markierung mit [3-³H]-Sphingosin durchgeführt wurde, das nicht Bestandteil dieser Lipide ist. Auch das eigentlich zu erwartende Cer (AS) wurde nicht detektiert. Vermutlich reichte die Inkubationszeit mit [3-³H]-Sphingosin von 2 h nicht aus, um Cer (AS) zu markieren. Diese recht kurze Zeitspanne hat sich allerdings in Vorversuchen als sehr gut zur Markierung von Cer (EOS) erwiesen¹.

ABT inhibiert Cytochrom P450-Enzyme, indem es die Hämgruppe aryliert. Da es sich bei der ω -Hydroxylase auch um ein Cytochrom P450-Enzym handelt, wird auch dieses Enzym durch ABT inhibiert. Die Hemmung durch ABT ist jedoch völlig unspezifisch, weshalb es auch in extrem hohen Konzentrationen eingesetzt werden muss. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Inhibitoren sind den Substraten der ω -Hydroxylase sehr ähnlich und damit vermutlich wesentlich spezifischer. Damit sind sie zu Untersuchungen an der ω -Hydroxylase sehr viel besser geeignet.

Beide Inhibitoren enthalten eine Doppelbindung, die sich aus der Synthese ergibt. Die NMR-Spektren zeigten, dass es sich um E/Z-Isomerengemische handelt, die nicht getrennt wurden. Eine Doppelbindung sollte die Wirkung der Substanzen nicht einschränken, da auch die ω -OH-Fettsäuren des humanen SC Doppelbindungen enthalten (Marekov und Steinert, 1998). Die natürlich vorkommenden ungesättigten Fettsäuren haben üblicherweise Z-Doppelbindungen. Tetracosensäure, als deren Analogon der Inhibitor IS-24 (Tetracos-11-en-23-insäure) angesehen werden kann, kommt in der Natur als Nervonsäure, Z-Tetracos-15-ensäure, vor. Das native Analogon des anderen Inhibitors IS-30 (Triacont-17-en-29-insäure) ist Z-Triacont-21-ensäure. Bei beiden Inhibitoren ist die Doppelbindung aufgrund des Syntheseweges um vier Kohlenstoffatome verschoben. Inwieweit die Position der Doppelbindung die inhibierende Wirkung der Substanzen beeinflusst, kann aufgrund der vorhandenen Daten nicht geklärt werden. Sollte nur eins der Stereoisomere die ω -Hydroxylase

¹ S. Brodessa, persönliche Mitteilung

hemmen, das andere jedoch gar nicht, so kann dies aus den vorliegenden Daten nicht entnommen werden. Es ist wahrscheinlich, dass ein Z-Isomer besser als Substrat erkannt wird als ein E-Isomer. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass beim E-Isomer die versetzte Position der Doppelbindung weniger stört, da die räumliche Struktur beim E-Isomer eher einer gesättigten Fettsäure entspricht, die ja ebenfalls ein Substrat des Enzyms ist.

Mit den Inhibitoren IS-24 und IS-30 wurden zwei Verbindungen synthetisiert, die die ω -Hydroxylase effektiv inhibieren. Solche Inhibitoren wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben. Über die Spezifität der hier beschriebenen Inhibitoren kann jedoch aufgrund der vorliegenden Daten keine Aussage gemacht werden. Auch Kinetikstudien stehen noch aus. Daher konnte auch nicht geklärt werden, ob die Inhibitoren tatsächlich als Suizidinhibitoren kovalent an die ω -Hydroxylase binden. Hierzu sind weitere Experimente erforderlich. Sollten diese ergeben, dass die Inhibitoren das Enzym durch Ausbildung einer kovalenten Bindung inhibieren, sollte es möglich sein, das Enzym durch einen radiomarkierten Inhibitor zu kennzeichnen, zu isolieren und zu identifizieren.

4.2 Umesterung vom Lipidester zum Methylester

In der vorliegenden Arbeit konnte an einem Modellpeptid eindeutig gezeigt werden, dass durch Behandlung mit Natrium-Methanolat selektiv Glutaminsäure-benzylester in Methylester überführt werden, während Glutaminsäure selbst, Glutamin und andere Peptidbindungen unverändert bleiben. Damit wurde eine Methode entwickelt, mit der die proteingebundenen ω -OH-Lipide so abgespalten werden können, dass sie an ihrer Bindungsstelle als Markierung einen Methylester zurücklassen, der massenspektrometrisch eindeutig zu identifizieren ist. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass durch eine Umesterung die gleichen Lipide abgespalten werden wie durch eine klassische alkalische Hydrolyse. Auch in humanem SC konnten nach Umesterung und tryptischem Verdau Peptide detektiert werden, die anstelle von Glutamin oder Glutamat Glutaminsäuremethylester enthielten. Später stellte sich jedoch heraus, dass diese Ester bereits während der erschöpfenden Extraktion des SC zur Entfernung der freien Lipide gebildet worden waren. Diese Veresterungsreaktion war keineswegs vorherzusehen. Bis

4. Diskussion

heute ist nicht geklärt, wodurch die Veresterung katalysiert wird. Möglicherweise bildet sich in Chloroform trotz des zugesetzten Stabilisators Salzsäure, die die Veresterung katalysiert. Bei dem Stabilisator handelt es sich um Ethanol, das als Katalysator jedoch kaum in Betracht kommt. Eventuell werden auch während der Extraktion, die in Glasgefäßen durchgeführt wird, Substanzen aus der Teflon-beschichteten Dichtung des Deckels extrahiert, die eine Veresterung katalysieren können. Diese Veresterung verläuft jedoch mit großen Ausbeuten und muss deshalb für die Identifizierung der Lipidbindungsstellen über Methylester unbedingt vermieden werden. Aus diesem Grund müssen die frei extrahierbaren Lipide vorher auf andere Weise entfernt werden.

Mit diesem Experiment konnte daher zwar keine Bindungsstellen identifiziert werden. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass die entstandenen Glutaminsäuremethylester nicht nur am Modellpeptid, sondern auch in SC identifiziert werden können.

Bei Versuchen, die Ausbeute des tryptischen Verdaus durch eine vorhergehende Spaltung mit Bromcyan zu steigern, fiel auf, dass durch die Bedingungen der Bromcyanspaltung Ceramide gespalten werden. Dabei konnten die entsprechenden Fettsäuren und Sphingoidbasen teilweise in der Dünnschichtchromatographie als Spaltprodukte identifiziert werden. Es ist jedoch möglich, dass die Produkte der Ceramidspaltung an der Amidbindung, Fettsäure und Sphingoidbase, weiter derivatisiert wurden. Diese Derivate würden dann jedoch in der Dünnschichtchromatographie ein anderes Laufverhalten zeigen und könnten nicht mehr als die erwarteten Ceramidbausteine identifiziert werden. Aufgrund der in diesem Experiment durchgeführten Kontrollen ist auch nicht auszuschließen, dass die untersuchten Ceramide nicht durch die Bromcyanspaltung, sondern bei der Entsalzung über RP-18 verloren gegangen sind. Dem widerspricht der in Abb. 36 gezeigte Befund, dass bei einer Entsalzung über RP-18-Säulchen nur unwesentlich weniger Lipide wiedergewonnen werden wie beim Ausschütteln nach der Bligh-Dyer-Methode.

4.3 Präparation von Cornified envelope

Beim tryptischen Verdau von SC wurden ausschließlich Keratine detektiert, diese dafür aber in großen Mengen. Keratine kommen im CE jedoch mit einer Häufigkeit von unter

1 % vor (Nemes und Steinert, 1999). Die erhaltenen Peptide waren also nicht Bestandteil des CE, sondern stammen aus Keratinen, die im SC leicht zugänglich sind. Alle SC-Proben, die mit Trypsin verdaut wurden, waren vorher zur Entfernung von Lipiden der extrazellulären Matrix mit organischen Lösungsmitteln behandelt worden. Während der CE-Präparation zeigte sich, dass extrahiertes SC sehr viel mehr beschädigte Korneozyten enthält als nicht extrahiertes. Die Keratine im Inneren dieser Korneozyten sind durch den beschädigten CE nicht mehr ausreichend abgeschirmt und damit sehr viel leichter zugänglich für Proteasen wie Trypsin. Außerdem sind die Keratine offensichtlich in großer Menge vorhanden und überlagern so möglicherweise gleichzeitig abgespaltene CE-Peptide. Aus diesem Grund sollte eine CE-Präparation nach A. Steven und P. Steinert zur Abtrennung der Keratine durchgeführt werden. Über diese Präparation wurde eine Bilanz erstellt, indem auf jeder Stufe die Materialausbeute (gemessen in Trockengewicht) und die Menge der kovalent gebundenen Lipide bestimmt wurde. Über die gesamte Präparation wurde eine Ausbeute von 3,3 % ($\pm 0,7$, n=9) erzielt, die Menge an kovalent gebundenen Lipiden stieg dabei von etwa 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Trockengewicht SC auf etwa 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ CE (8), also um den Faktor 2,5.

Damit stellt sich die Frage, ob die Durchführung dieser Präparation sinnvoll ist. Sie verläuft in sehr geringen Ausbeuten und somit unter hohem Materialverbrauch, führt aber nur zu einer geringen Anreicherung der kovalent gebundenen Lipide und damit der Protein-Lipid-Bindungsstellen. Andererseits konnten im Endprodukt dieser Präparation keine Peptide aus Keratinen mehr detektiert werden, d.h. die Abtrennung der Keratine war erfolgreich. Dass die Freisetzung von Peptiden aus präparierten CE generell sehr problematisch ist, weist darauf hin, dass es sich tatsächlich um CE handelt. Denn CE ist so stark quervernetzt, dass es nach erschöpfendem Kochen in denaturierenden und reduzierenden Lösungen unlöslich bleibt (Rice und Green, 1977; Kalinin *et al.*, 2002), also sozusagen von keiner proteinchemischen Behandlung angegriffen wird.

Könnte man statt des nach der beschriebenen Methode präparierten CE ein anderes Präparat verwenden, dessen Herstellung mit weniger Materialaufwand verbunden ist, in dem sich aber noch (wenige) andere Proteine befinden, die nicht Bestandteil des CE sind? In diesem Falle würden die wenigen freigesetzten CE-Peptide immer von den Peptiden der kontaminierenden Proteine überdeckt und könnten nicht detektiert werden. Deshalb ist die durchgeführte Präparation mit allen ihren Nachteilen unumgänglich für eine weitere fundierte Suche nach Protein-Lipid-Bindungsstellen.

Berechnet man die Ausbeute an kovalent gebundenen Lipiden ausgehend von einer Materialausbeute von 3,3 % und einer Lipidanreicherung um das 2,5 fache, so erhält man

4. Diskussion

einen Wert von 8,25 %, d.h. dass etwa 8 % aller Lipidbindungsstellen sind im Endpräparat noch vorhanden sind. Bei Aufreinigungen nativer Enzyme aus Gewebe werden Ausbeuten zwischen 0,8 % und 15 % erreicht (Bernardo *et al.*, 1995; Lansmann *et al.*, 1996; Schuette, 1999; Bernardo *et al.*, 2000). Wenn diese Arbeiten auch nicht direkt vergleichbar sind, so erscheint es dennoch sinnvoll, CE zur Identifizierung von Bindungsstellen auf dem beschriebenen Weg zu präparieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in verschiedenen Experimenten die Menge an kovalent gebundenen Lipiden bestimmt. Vergleicht man diese Daten untereinander, fallen große Unterschiede auf:

Bei der Bilanzierung der CE-Präparation (Abb. 26) fand man im SC etwa 6 µg Lipid/mg Trockengewicht, in CE (8) etwa 15 µg/mg. Hier wurde SC aus humaner Vorhaut verwendet, das zuvor über mehrere Monate mit Chloroform/Methanol bei 60°C erschöpfend extrahiert worden war. Hierbei wurde das Lösungsmittel einmal täglich gewechselt.

In der Bilanzierung der weiteren Schritte (Abb. 34) fand man sowohl in CE (8) und als auch in einem während der Präparation später auftretenden Pellet (11) etwa 60 µg Lipid/mg Trockengewicht. Hier wurde CE aus Maushaut verwendet, das innerhalb weniger Tage mit Chloroform/Methanol bei Raumtemperatur erschöpfend extrahiert worden war. Hierbei wurde das Lösungsmittel zwischen 30 und 40 mal am Tag gewechselt.

Im Vergleich der Lipidprofile von SC und CE (Abb. 36) fand man im SC 15 – 20 µg *w*-OH-Lipid/mg Trockengewicht, in CE (8) 35 – 40 µg/mg. In diesem Experiment wurde wiederum SC aus humaner Vorhaut verwendet, das wie der CE aus Maus in Abb. 34 nur wenige Tage extrahiert worden war. Die Werte aller drei Experimenten waren reproduzierbar. Messfehler können also ausgeschlossen werden.

Die Abweichung der Werte in Abb. 34 lassen sich dadurch erklären, dass der CE nicht aus humanem Gewebe stammt, sondern aus murinem. Eine andere Arbeit ermittelte in SC aus Rückenhaut von neugeborenen Mäusen 25 µg frei extrahierbare Fettsäuren, 60 µg frei extrahierbare Ceramide und 9 µg kovalent gebundene *w*-OH-Lipide pro mg SC (Leyvraz *et al.*, 2005). In Rückenhaut von erwachsenen Mäusen wurden 33 µg frei extrahierbare Ceramide und 12 µg proteingebundene *w*-OH-Lipide pro mg SC gefunden (Takagi *et al.*, 2004).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Menge von 60 µg kovalent gebundenen *w*-OH-Lipiden pro mg CE betragen damit das Vierfache der Menge im SC von neugeborenen Mäusen. Eine Anreicherung von SC zu CE auf das 2,5 fache erklärt dies nur zum Teil.

Weitere Gründe könnten im Alter der Mäuse und in den unterschiedlichen Mausstämmen liegen.

Die Werte aus den beiden Experimenten an humanen Proben (Abb. 26 und Abb. 36) zeigten in beiden Fällen eine Anreicherung um den Faktor 2,5 von SC zu CE, bei der kürzeren Extraktion (Abb. 36) waren jedoch generell etwa 2,5 mal mehr w -OH-Lipide vorhanden. Da der einzige Unterschied zwischen beiden Experimenten in der Dauer der erschöpfenden Extraktion lag, muss hierin der Grund für die unterschiedlichen Lipidmengen liegen. Offensichtlich werden die kovalent gebundenen Lipide während der länger andauernden Extraktion über einen Zeitraum von mehreren Monaten bei 60°C zum Teil bereits abgespalten und extrahiert.

Die erschöpfende Extraktion der freien Lipide führt, wenn sie über einen Zeitraum von Wochen oder Monaten erfolgt, offenbar häufig zu verfälschten Ergebnissen. Die anschließend ermittelte Menge an kovalent gebundenen Lipiden sinkt auf etwa 40%. Ferner führt eine lang andauernde Extraktion dazu, dass bei der Trennung von intakten und beschädigten Korneozyten mittels Dichtezentrifugation der Anteil an Korneozyten mit zu hoher Dichte sehr viel größer ist als bei nicht extrahierten Korneozyten (Kap. 3.2.3). Während einer lang andauernden Extraktion wird die Hülle der Korneozyten also vermutlich z.B. durch partielles Abspalten des LBE so stark beschädigt, dass bei der Dichtezentrifugation sehr viele Korneozyten als beschädigte Korneozyten durch die Ficoll-Lösung nach unten sinken.

Die unspezifische Veresterung von Glutamaten zu Glutaminsäuremethylestern tritt allerdings auch bei kurzen Extraktionszeiten auf.

4.4 Proteolytische Spaltung des Cornified envelope

Zur Identifizierung von Protein-Lipid-Bindungsstellen ist es essentiell, aus CE Peptide zu generieren, die diese Bindungsstellen enthalten. In zahlreichen Arbeiten aus der Gruppe um P. Steinert (Steinert, 1995; Steinert und Marekov, 1995; Robinson *et al.*, 1997; Steinert und Marekov, 1997; Marekov und Steinert, 1998; Steinert *et al.*, 1998) wurden durch Verdau mit Proteinase K genügend Peptide aus CE (8) freigesetzt, um mit ihnen die Zusammensetzung des CE aufzuklären, die räumliche Verteilung der Proteine innerhalb des CE zu analysieren oder Isodipeptidbindungen zu identifizieren. In der

4. Diskussion

Arbeit von Marekov und Steinert, 1998) konnten sogar einige Protein-Lipid-Bindungsstellen identifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in vielen Variationen der beschriebenen Methoden versucht, durch proteolytischen Verdau Peptide aus CE (8) zu generieren. Dabei konnten vereinzelt Peptide aus Loricrin identifiziert werden. Es gelang jedoch mit keiner Methode, reproduzierbar sequenzierbare Peptide zu erhalten. Das beste Ergebnis lieferte einer der Ansätze, in dem das Vorgehen aus der Arbeit von Marekov und Steinert von 1998 genau befolgt wurde. Diese Vorgehensweise wurde jedoch auch am häufigsten durchgeführt, so dass es sich u.U. auch um ein statistisches Phänomen handeln könnte.

Bei der genannten Vorgehensweise (Abb. 31) konnten in Fraktion (15), in der sich die Peptide mit Bindungsstellen befinden sollten, nur zwei Peptide detektiert werden, beide aus Loricrin. Beide Peptide bestanden ausschließlich aus Glycin, Phenylalanin und Cystein und können aus diesem Grund keine Lipidbindungsstelle enthalten. Möglicherweise banden diese Peptide aufgrund ihrer Hydrophobizität an die C4-Säule in Wechselwirkung und gelangten daher fälschlicherweise in die Fraktion der Lipopeptide.

Eine zentrale Frage ist, warum sich der CE mit keiner der vielen verwendeten Methoden in Peptide spalten ließ. Als Hauptgrund ist sicherlich die starke Quervernetzung des CE zu nennen, die dazu führt, dass entweder sehr kurze Peptide oder Peptide, die Isodipeptidbindungen enthalten, abgespalten werden. Bis jetzt konnten diese Peptide nur identifiziert werden, wenn eines der beteiligten Peptide der C-Terminus von Loricrin war. Darin konnte eindeutig die Anwesenheit einer Isodipeptidbindung nachgewiesen werden (Kap. 3.2.5). Weitere Peptide mit Isodipeptidbindung wurden u.U. zwar vermessen, konnten aber nicht identifiziert werden. Daraus lässt sich die große Anzahl von Isodipeptidbindungen, die für die starke Quervernetzung des CE und damit für seine hohe Stabilität gegenüber Proteasen verantwortlich ist, ablesen. Auch die sorgfältig durchgeführte Reproduktion der Arbeit von Marekov und Steinert, 1998) lieferte nicht annähernd das gewünschte und beschriebene Ergebnis. Eventuell sind die Angaben in dieser und anderen Arbeiten nicht vollständig.

Ein weiteres mögliches Kriterium für den Erfolg einer Proteolyse von CE ist die Anwesenheit von Detergentien wie SDS. Eine Proteolyse von CE mit Proteinase K in Anwesenheit von 0,1 % SDS wurde beschrieben (Tarcza *et al.*, 1992). Da SDS jedoch die RP-HPLC stört, wurde es bis jetzt nicht eingesetzt. Es ist jedoch möglich, dass Spuren von SDS aus der CE-Präparation während der Proteolyse anwesend waren. Dieser Sachverhalt würde erklären, warum die Proteolysen, bei denen viel Material eingesetzt

und das CE-Präparat besonders gut gewaschen wurde, immer in besonders geringen Ausbeuten verliefen. Ob dieser Einfluss von SDS tatsächlich besteht, kann jedoch aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden und erfordert weitere Untersuchungen.

Betrachtet man die während der CE-Präparation und der späteren Verarbeitung ermittelten Werte genauer, findet man für humanes SC (0) zwischen 6 und 20 μg w-OH-Lipid pro mg Trockengewicht (Abb. 26 und 36). Unter der Annahme, dass ein Korneozyt einen Durchmesser von etwa 100 μm hat (Abb. 25) und als Zylinder mit einer Höhe von 300 nm angesehen werden kann (Swartzendruber *et al.*, 1987), besitzt er eine Oberfläche von ca. 15.700 μm^2 und ein Volumen von 2.355 μm^3 . Bei einer Dichte von 1,3 g/cm^3 (Swartzendruber *et al.*, 1987) entspricht dieses Volumen einer Masse von 3 ng/Korneozyt. Geht man weiterhin von einem Raumbedarf von 0,45 nm^2 pro w-OH-Ceramid (Swartzendruber *et al.*, 1987) und 0,2 nm^2 pro w-OH-Fettsäure aus, wobei etwa doppelt so viele Fettsäuremoleküle wie Ceramidmoleküle vorkommen (Abb. 36), erhält man einen mittleren Raumbedarf von 0,3 nm^2 . Die mittlere molare Masse eines Lipids läge bei etwa 550 g/mol .

Mit diesem Raumbedarf passen auf die Oberfläche von 15.700 μm^2 etwa $5,2 \times 10^{10}$ w-OH-Lipidmoleküle, was 87 fmol bzw. 48 pg entspricht. Damit enthält SC (0) theoretisch etwa 48 pg w-OH-Lipid pro 3 ng Korneozyt, bzw. 16 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Dies entspricht größenordnungsmäßig den gefundenen 6 – 20 μg w-OH-Lipid pro mg Trockengewicht.

Die CE-Präparation ergab eine Anreicherung der w-OH-Lipide um den Faktor 2,5. Die Oberfläche des CE ist identisch mit der eines Korneozyten, das Volumen verändert sich. Mit einer CE-Dicke von 10 nm (Kalinin *et al.*, 2002) ergibt sich für den CE nur noch ein Volumen von 160 μm^3 , was bei gleicher Dichte einer Masse von 0,21 ng und damit einem Lipidgehalt von 230 μg w-OH-Lipid pro mg Trockengewicht CE entspricht. Das entspräche einer 14 fachen Anreicherung ausgehend von 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in SC (0). Die in Abb. 26 und 36 beschriebene Anreicherung um den Faktor 2,5 beträgt damit 18 % der theoretisch möglichen Anreicherung. Auch hier zeigt sich, dass die meisten der Esterbindungen, nach diesen Werten über 82 %, während der Präparation gespalten werden. Etwa die Hälfte dieser Spaltungen, 40 %, treten während des Kochens in Puffer A auf (Kap. 3.2.3, S. 50). Wann die restlichen Esterbindungen gespalten werden, kann nicht genau geklärt werden, jedoch erscheint die Ultraschallbehandlung in Puffer B (s. Abb 24) als Ursache für weitere Esterspaltungen wahrscheinlich.

4. Diskussion

Der letzte Schritt der Präparation (Abb. 24) ist ein tryptischer Verdaus, bei dem man das endgültige CE (8) erhält und den Überstand des Verdaus, Überstand (7). In Abb. 27 ist gezeigt, dass dieser Überstand etwa 30 µg *w*-OH-Lipid pro mg Aminosäuremenge enthält. Bei einer mittleren Aminosäuremasse von 100 g/mol und einer mittleren Lipidmasse von 550 g/mol ergeben sich 0,05 µmol *w*-OH-Lipid pro 10 µmol Aminosäure, d.h. jede 200ste Aminosäure trägt ein Lipid. Bei Peptiden von 20 Aminosäuren wäre damit jedes 10te Peptid ein Lipopeptid. Damit sollte eine Analyse völlig problemlos durchzuführen sein. In Abb. 27 ist jedoch nicht berücksichtigt, dass nicht alle Lipide in Überstand (7) kovalent gebunden sind. Diesen Umstand zeigt Abb. 29, aus der ermittelt wurde, dass die meisten der *w*-OH-Lipide in Überstand (7) frei vorliegen und nur noch jedes 10.000ste Peptid ein Lipopeptid ist, womit eine Identifizierung der Protein-Lipid-Bindungsstellen nicht möglich ist.

Die Beobachtung, dass in Überständen proteolytischer Spaltungen wie z.B. Überstand (7) *w*-OH-Lipide ungebunden vorliegen, trifft auch auf die Überstände 12, 13 und 14 (Abb. 31) zu (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, warum die Esterbindungen unter den Bedingungen des proteolytischen Verdaus nahezu quantitativ gespalten wurden. Die Spaltung einer Esterbindung unter den Bedingungen des tryptischen Verdaus wurde mit Arachidonsäureumbelliferylester genauer untersucht (Abb. 30). Dabei stellte sich heraus, dass der verwendete Puffer keine Esterbindungen spaltete, die Anwesenheit von Trypsin eine Spaltung von 15 – 20 % der Esterbindungen bewirkte und die zusätzliche Anwesenheit von SC dazu führte, dass 35 – 40 % der Esterbindungen gespalten werden.

Offensichtlich besitzt Trypsin also auch eine nicht zu vernachlässigende Esterase-Aktivität. Von Chymotrypsin, einer anderen Serin-Protease, ist diese Aktivität bekannt (Voet und Voet, 1994). Auch die Aktivität des Trypsins wird über die Spaltung einer Esterbindung gemessen und angegeben (Walsh und Wilcox, 1970). Dennoch konnte nicht vorausgesehen werden, dass die proteingebundenen Lipide durch Trypsin in so hohem Maße freigesetzt werden würden.

Sehr viel interessanter ist die Zunahme der Esterspaltungen durch die Anwesenheit von SC. Dieses SC enthielt weder frei extrahierbare noch proteingebundene Lipide. Keines der in SC vorkommenden Proteine ist als Enzym oder gar als Esterase bekannt. Es ergibt sich die Vermutung, dass die CE-Proteine die Esterspaltungen durch unspezifische Protein-Oberflächen-Aktivität katalysieren. Z.B. könnte eine Anhäufung von Glutamat-Resten, die bei pH 8,3 deprotoniert vorliegen, lokal und kurzzeitig den pH-Wert so weit

erhöhen, dass Ester gespalten werden. Eine solche unspezifische Protein-Oberflächen-Aktivität ist allerdings bisher nicht beschrieben worden.

In einem Überstand eines tryptischen Verdaus konnte ein Peptid aus Loricrin identifiziert werden, das zusätzlich über eine Disulfidbrücke innerhalb des Peptids verknüpft ist. Da die Disulfidbrücken in Loricrin noch nicht bekannt sind, ist es denkbar, dass hier erstmalig eine der Disulfidbrücken identifiziert wurde. Da die Proben jedoch während der CE-Präparation unter reduzierenden Bedingungen aufgekocht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass aus zwei Cysteinen eine künstliche Disulfidbrücke durch Luftoxidation entstanden ist.

Die Bilanz über das Vorgehen nach Marekov und Steinert (Abb. 34) zeigt, dass in Fraktion (15) die meisten w-OH-Lipide pro Peptid enthalten waren. Die Aminosäuremenge war sehr gering, der größte Teil gelangte demnach in Fraktion (13), die die Peptide ohne Lipid enthalten sollte. Die Auftrennung über die C4-Säule war dementsprechend sehr erfolgreich. Allerdings war die Menge an Peptiden in Fraktion (15) zur Detektion offensichtlich viel zu gering. Dieses Ergebnis lässt sich schon anhand eines Vergleichs der Lipidgehalte in Pellet (8), Pellet (10) und Pellet (11) erklären. Pellet (8) enthielt etwa 60 µg w-OH-Lipid pro mg Trockengewicht. Nach der partiellen Hydrolyse, durch die der Angriff von Proteinase K erleichtert werden sollte, enthielt Pellet (10) noch 12 – 15 µg w-OH-Lipid pro mg Trockengewicht. Nach dem Verdau mit Proteinase K, bei dem Lipopeptide und Peptide abgespalten werden sollten, wurde Pellet (11) erhalten, dessen Lipidgehalt wieder bei über 50 µg/mg lag. Proteinase K setzte also anscheinend keine Lipopeptide frei, sondern fast nur Peptide, bei denen es sich vermutlich um ehemalige Lipopeptide, deren Lipide durch die partielle Hydrolyse abgespalten worden waren, handelte. Daher war der Anteil an freigesetzten Lipopeptiden in Überstand (12) nach dem Verdau verschwindend gering. Diese Lipopeptide wurden über die C4-Säule von den Peptiden getrennt, was zu der kaum messbaren Aminosäuremenge in Fraktion (14) bzw. (15) und damit zu den hohen Werten für die w-OH-Lipide pro Aminosäuremenge führte. Um gut analysierbare Mengen von Fraktion (14) bzw. (15) zu erhalten, also 300 – 500 µg, sind 2 – 3 g SC notwendig, was etwa 400 – 600 humanen Vorhäuten entspricht.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die verwendeten Ausgangsmengen evtl. viel zu gering waren. Da Marekov und Steinert in ihrer Arbeit die Lipopeptide aus 20 Vorhäuten sammelten (Marekov und Steinert, 1998), wurden in der vorliegenden Arbeit stets CE-

4. Diskussion

Präparate aus 18 – 30 Vorhäuten verwendet. Die Tatsache, dass vergleichbare Mengen eingesetzt wurden, bedeutet natürlich nicht, dass diese Mengen auch ausreichend waren. Solange jedoch kein Verfahren entwickelt worden ist, dass reproduzierbar sequenzierbare Peptide liefert, bedeutet der Einsatz solch großer Mengen für ein Experiment, das mit hoher Wahrscheinlichkeit ohnehin keine Peptide liefert, Verschwendung von Material.

4.5 Affinitätsspaltung

Da es mit keiner der untersuchten proteolytischen Methoden gelang, aus CE reproduzierbar sequenzierbare Peptide zu generieren, wurde eine Methode entwickelt, bei der der Peptidstrang chemisch und selektiv an der Esterbindung gespalten wird. Durch Inkubation mit Natriummethanolat über 8 h oder länger wird der Peptidstrang spezifisch N-terminal vom veresterten Glutamat gespalten. Aus dem Glutaminsäureester entsteht am N-Terminus des neuen Peptids ein Pyroglutamat, der neue C-Terminus am zweiten Peptid trägt einen Methylester (Sawatzki *et al.*, 2005). Die während dieser Spaltung freigesetzten *w*-OH-Lipide zeigen die gleiche Verteilung in gleichen Mengen wie *w*-OH-Lipide, die durch alkalische Hydrolyse abgespalten wurden (Abb. 36).

Durch diese Affinitätsspaltung sollte es möglich sein, Peptide, die sich zwischen zwei Lipidbindungsstellen befinden, aus dem Proteinverband herauzulösen, sofern sie nicht zusätzlich z.B. über eine Isodipeptidbindung an den CE angebunden sind. Diese Methode wurde soweit entwickelt, dass nach einer Trennung über HPLC massenspektrometrisch Substanzen detektiert wurden, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um Peptide handelte. Die entsprechenden MS/MS-Spektren enthielten einen Peak bei 112 amu, der das b1-Ion eines Pyroglutamats hätte sein können. Das Auftreten dieses Peaks ist jedoch nicht spezifisch für dieses Ion. Weitere Untersuchungen durch ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie ergaben, dass es sich bei diesem Fragment nicht um das b1-Ion von Pyroglutamat handelte.

Bei der Aufnahme dieses MS/MS-Spektrums ergaben sich jedoch Probleme. Da die Intensität der Probe für FT-ICR-Messungen sehr gering war, konnten keine Vorläuferionen isoliert werden. Das MS/MS-Spektrum zeigt also alle Fragmente aller Vorläuferionen. Damit muss das detektierte Ion von 112,0871 nicht zwangsläufig aus einem der Vorläuferionen stammen, die im ESI-QToF-MS/MS-Spektrum ein Fragment bei 112 amu zeigten. Es ist theoretisch möglich, dass diese Ionen dennoch ein

Pyroglutamat, dessen b1-Ion wegen zu geringer Intensität nicht detektiert wurde, tragen. Dann wäre das detektierte Ion bei 112,0871 amu ein Fragment einer anderen Substanz in der vermessenen Probe.

In den drei ESI-QToF-MS/MS-Spektren, in denen der Peak bei 112 amu detektiert worden war, kommt dieser Peak in hoher Intensität vor. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass er im ESI-FT-ICR-MS/MS-Spektrum gar nicht gefunden wurde und statt dessen ein bislang nicht detektierter Peak auftrat. Außerdem scheinen diese drei Vorläuferionen zu drei sehr ähnlichen Peptiden, die sich nur um ein Cystein in verschiedenen Modifikationen unterscheiden, zu gehören. Deshalb ist anzunehmen, dass das Fragment bei 112 amu bei allen drei Peptiden identisch ist und damit die gleiche Masse hat.

Unter der Annahme, dass im Spektrum in Abb. 35 die Summe der identischen Fragmente aus drei MS/MS-Spektren detektiert wurden, kann man sagen, dass sich alle drei Peptide nur um ein Cystein unterscheiden und ein Fragment abspalten, das kein Pyroglutamat ist. Damit sind diese Peptide nicht wie geplant durch die Affinitätsspaltung entstanden, sondern auf einem anderen Weg.

Geht man davon aus, dass das in Abb. 35 detektierte Signal bei 112,0871 amu nicht aus den genannten Vorläuferionen entstanden ist und die entstandenen Pyroglutamat-b1-Ionen nicht detektiert wurden, könnte man vermuten, dass die Spaltung dennoch stattgefunden hat, die Fragmente aber wegen zu geringer Intensität nicht detektiert werden konnten.

Darüber hinausgehend waren die erhaltenen Daten nicht interpretierbar². Vermutlich haben während der Behandlung mit Natriummethanolat weitere Modifizierungen an Aminosäuren stattgefunden, so dass diese nicht mehr identifiziert werden konnten. Da diese Modifikationen am Modellpeptid nicht aufgetreten sind, ist anzunehmen, dass sie an Isodipeptidbindungen stattgefunden haben. Eine Abspaltung von 112 amu vom Molekülpeak und die gleichzeitig fehlende Wasserabspaltung vom Molekülpeak könnten darauf hinweisen, dass der C-Terminus modifiziert wurde³. Rein rechnerisch entspricht dies z.B. einem Ester der Form $R-COOC_7H_{11}$, für dessen Struktur oder Entstehung es aber im Rahmen der Affinitätsspaltung keinen Anhaltspunkt gibt. Die Abspaltung von 112 amu könnte aber auch bei einer bisher unbekanntem weiteren Modifizierung, z.B. an

² J. Peter-Katalinic und G. Pohlentz, persönliche Mitteilung

³ G. Pohlentz, persönliche Mitteilung

4. Diskussion

Isodipeptidbindungen, entstanden sein. Um dies zu klären, sind weitergehende Untersuchungen an noch zu synthetisierenden isodipeptid-verknüpften Peptiden notwendig.

Grundsätzlich stellt die Affinitätsspaltung eine sehr elegante Methode zur Identifizierung von Protein-Lipid-Bindungsstellen dar. Sie führte jedoch bisher noch nicht zu Peptiden mit N-terminalen Pyroglutamaten. Statt dessen treten weitere unbekannte Modifikationen auf. Bevor diese Methode effektiv eingesetzt werden kann, müssen diese Modifikationen analysiert und die Methode soweit weiterentwickelt werden, dass Peptide mit N-terminalen Pyroglutamaten detektiert werden können.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav 50050, H+P Labortechnik Oberschleißheim
Bio Imaging Analyzer	Fujix BAS 1000, Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Brutschrank	Begasungsbrutschrank Heraeus CO₂- Auto-Zero, Heraeus Instruments, Hanau
DC-Horizontalkammern	Camag, Berlin
DC-Plattenheizer	TLC-Plate Heater III, Camag, Berlin
Densitometer	CS-9301PC, Shimadzu, Kyoto, Japan
ESI-QToF-Massenspektrometer	Q-ToF-2 Hybrid Quadrupol-Massen- spektrometer mit Nanoflow-Interface, Micromass, Manchester, UK
Steuerungs-Software für Massen- spektrometer	Masslynx, Version 3.5, Micromass, Manchester, UK
Flüssig-Szintillations-Zählgerät	TriCarb 1600 TR, Packard Instruments, Dovners Grove, Connecticut, USA
Heizblock	Reacti-Therm, Pierce, Rockford, USA
Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage	BalTec, Coating System: MED 020, Multi Control System: MCS 010, Balzers, Liechtenstein
Homogenisator	Handhomogenisator aus Glas, konisch, 5 ml, Wheaton Science Products, Millville, New Jersey, USA
HPLC-Anlage	Ettan LC, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HPLC-Software	Unicorn, Version 3.10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lichtmikroskop	Diavert, Seitz, Wetzlar
Linomat	Linomat IV, Camag, Berlin
MALDI-ToF-Massenspektrometer	TOFSpec E, Micromass, Manchester, UK

5. Material und Methoden

Mikroplatten-Fluorometer	Fluoroscan II, Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
Mikroplatten-Photometer	Multiscan Ascent, Labsystems Oy, Helsinki, Finnland
Reinstwasseranlage	Super-Q (mit Ultrafiltration), Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
Speedvac	Automatic Environmental Speedvac AES 1000, Savant, Farmingdale, New York, USA
Spitzen-Zieher (ESI)	Micropipette Puller PC-10, Narishige, Tokyo, Japan
Sterilbänke	LaminAir HA 2472 GS, Heraeus Instruments GmbH, Hanau LaminAir HB 2448, Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermomixer	comfort, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson, Danbury, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 100, Bandelin, Berlin
Waagen	ScalTec SBC 31, Sartorius, Göttingen LC 6215, Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	UE 500, Memmert, Schwabach
Zentrifugen	Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg Rotina 48 R, Hettich, Mühlheim a. d. Ruhr Multifuge 3 S-R, Heraeus Instruments, Hanau
Ultrazentrifuge mit Rotor	L8-70M, Beckmann, München Ti 41

5.1.2 Verbrauchsmaterial

DC-Platten	DC-Platten Kieselgel 60, 20 x 20 cm, Merck, Darmstadt
Glaskapillaren für ESI-Spitzen	Borosilicat-Glaskapillaren, L = 1060 mm, D_a = 1,00 mm, D_i = 0,80 mm, Hilgenberg, Malsfeld
HPLC-Säulen:	
C4-Säule (reversed Phase)	Jupiter 5μ C4 300Å, 250 x 2,00 mm, phenomenex, Aschaffenburg
C18-Säule (reversed Phase)	Vertex Nucleosil-120 C18 3 μm, 250 x 2,00 mm, Knauer, Berlin

HPTLC-Platten	HPTLC-Platten Kieselgel 60, 20 x 10 cm und 10 x 10 cm, Merck, Darmstadt
Imaging Plate zur ³H-Detektion	BAS TR 2040S Imaging Plate, Fuji Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Objektträger und Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Schraubkappenglas	Culture Tubes 16 x 100, Pyrex, Bibby Sterilin, Stone, UK
silanierte Glasfaserwatte	Macherey-Nagel, Düren
silikonisierte Reaktionsgefäße aus Polypropylen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Sterilfilter für die Zellkultur	Sartorius, Göttingen
Zellflaschen	Corning, New York, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen für die Ultrazentrifuge (Rotor TI 41)	Nalgene, Rochester, New York USA

5.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, von höchstem erhältlichem Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde durch die Reinstwasseranlage gereinigt, für HPLC und Massenspektrometrie wurde HPLC-Wasser (J. T. Baker, Deventer, Niederlande) verwendet.

<i>N</i>-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Arachidonsäureumbelliferylester	Sigma, Taufkirchen
Bicinchoninsäure (BCA)-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Biochrom, Berlin
Ethanolamin	Biochrom, Berlin
Ficoll® Type 400	Sigma, Taufkirchen
L-Histidin	Sigma, Taufkirchen
Hydrocortison	Biochrom, Berlin
L-Isoleucin	Sigma, Taufkirchen
Kupfersulfat-Lösung, 4 % (w/v)	Sigma, Taufkirchen
LiChroprep® RP-18, 40 – 63 µm	Merck, Darmstadt
MCDB 153-Medium	Biochrom, Berlin
L-Methionin	Sigma, Taufkirchen

5. Material und Methoden

Penicillin/ Streptomycin	Gibco, Berlin
L-Phenylalanin	Sigma, Taufkirchen
Phosphorylethanolamin	Biochrom, Berlin
Plasmin	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Becton & Dickinson, Bredford, Connecticut, USA
Szintillationsflüssigkeit	Ultima Gold Szintillationscocktail, PerkinElmer Life an Analytical Sciences, Boston, Massachusetts, USA
Trifluoressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	aus Schweine-Pankreas, Typ IX-S, lyophilisiertes Pulver, Sigma, Taufkirchen
Trypsin, modifiziert	Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Mannheim
Trypsin-Lösung, 2,5 %	Gibco, Berlin
L-Tryptophan	Sigma, Taufkirchen
L-Tyrosin	Sigma, Taufkirchen
Umbelliferon	Aldrich, Taufkirchen

5.1.4 Standardsubstanzen

Ceramid 2 (NS, N-Stearoyl-D-sphingosin)	Sigma, Taufkirchen
Ceramid 3 (NP, N-Stearoylphytosphingosin)	Cosmoferm, Delft, Niederlande, jetzt Goldschmidt, Essen
Ceramid 6 (AP, N-a-Hydroxystearoylphytosphingosin)	Cosmoferm, Delft, Niederlande, jetzt Goldschmidt, Essen
16-Hydroxy-Palmitinsäure	Sigma, Taufkirchen
D,L-a-Hydroxystearinsäure	Sigma, Taufkirchen
Modellpeptid A: (Cys(Bzl)⁸⁴, Glu(OBzl)⁸⁵)-CD4 (81 – 92)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Palmitinsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Phytosphingosin	Sigma, Taufkirchen
Sphingosin	Sigma, Taufkirchen
Stearinsäure	Sigma, Taufkirchen

5.1.5 Radioaktiv markierte Chemikalien

[³H]-NaBH₄, 15,8 Ci/mmol	Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg
D-erythro-[3-³H]-Sphingosin, 20 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA

5.1.6 Verwendete Puffer und Lösungen

Aminosäure-Standard:

Alle 20 proteinogenen Aminosäuren werden zu gleichen Massenanteilen gemischt und mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 600 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 6,8 gelöst.

Medien:

- low Calcium-Medium:

Serumfreies MCDB 153 Medium wird mit folgenden Zusätzen supplementiert:

Penicillin/Streptomycin	50 mg/ml
Insulin	5 µg/ml
Phosphorylethanolamin	100 µM
Ethanolamin	100 µM
Hydrocortison	400 ng/ml
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	24 µg/ml
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	100 pg/ml
L-Histidin	240 µM
L-Isoleucin	750 µM
L-Methionin	90 µM
L-Phenylalanin	90 µM
L-Tryptophan	45 µM
L-Tyrosin	60 µM
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	4,8 mM
Calciumchlorid	0,1 mM

5. Material und Methoden

- **high Calcium-Medium:**

Diese Medium wird analog zum *low Calcium*-Medium angesetzt, die Ca^{2+} -Konzentration beträgt jedoch 1,1 mM. Zusätzlich wird 10 μM Linolsäure/BSA-Komplex zugesetzt.

Zur Herstellung der Stammlösung des Linolsäure/BSA-Komplexes wird 1 ml einer 10 mM Lösung von Linolsäure in Ethanol im Schraubkappenglas im Stickstoffstrom eingedampft. Danach werden 10 ml einer Lösung von 200 mg BSA in *low Calcium*-Medium zugegeben. Diese Mischung wird zehnmal abwechselnd 10 s auf 60 °C erhitzt und 10 s gevortext. Nach Sterilfiltration wird die Stammlösung bei -20 °C gelagert und beim Ansetzen des *high Calcium*-Mediums 1:100 verdünnt.

Methanolische RP-18-Suspension:

Das Lichroprep-RP-18-Pulver wird in Chloroform/Methanol (2:1) aufgeschlemmt und das überstehende Lösungsmittel nach 30 min. abdekantiert. Anschließend wird die RP-18-Suspension 4 – 5 mal mit Methanol gewaschen. Nach erneutem Aufschlemmen in Methanol ist die Suspension gebrauchsfertig. Sie enthält RP-18-Material und überstehendes Methanol im Verhältnis 1:1.

PBS-Puffer:

Für einen zehnfach konzentrierten Puffer werden 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 11,45 g Na_2HPO_4 und 80 g NaCl in 1 l Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wird der konzentrierte Puffer mit Wasser 1:10 verdünnt.

Puffer A: 100 mM Tris
20 mM Dithiothreitol (DTT)
5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
2 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
pH 8,0

Puffer B: 100 mM Tris
20 mM Dithiothreitol (DTT)
5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
pH 8,0

Trypsin-EDTA-Lösung: 0,5 % Trypsin
0,02 % EDTA
4 mM Glucose
3 mM Kaliumchlorid
130 mM Natriumchlorid
1 mM Na₂HPO₄
3,3 µM Phenolrot
in 30 mM Hepes-Puffer pH 7,4

5.1.7 Biologische Materialien

Vorhäute wurden uns von Dr. Meyer, Praxisklinik Grevenbroich, zur Verfügung gestellt.

Primäre Keratinozyten wurden von Frau Petra Speuser, Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Universität Bonn, aus frischen Vorhäuten (Dr. Meyer, Praxisklinik Grevenbroich) in Kultur genommen (Rheinwald und Green, 1975; O'Keefe *et al.*, 1982) und uns zur Verfügung gestellt.

Mäuse NMRI-Mäuse, ca. 6 Tage alt, wurden von Frau Priv.-Doz. Dr. G. van Echten-Deckert zur Verfügung gestellt.

5. Material und Methoden

5.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei allen beschriebenen Verhältnissen von Flüssigkeiten und Lösungen um Volumenverhältnisse (v/v).

5.2.1 Probenpräparation

5.2.1.1 Präparation von Stratum corneum aus humaner Vorhaut

Literatur: Reichelt *et al.*, 1999

Die gefrorenen Vorhäute werden in PBS-Puffer aufgetaut und das Fettgewebe abgeschnitten. Sie werden mit der SC-Seite nach oben auf 0,5 % Trypsin in PBS-Puffer gelegt, 30 min im Ultraschallbad behandelt und danach über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das auf der Lösung schwimmende SC wird abgenommen und je zweimal in PBS-Puffer und in Wasser gewaschen. Zur Bestimmung des Trockengewichts wird das SC lyophilisiert und gewogen.

5.2.1.2 Präparation von Stratum corneum von jungen Mäusen

Den toten Mäusen wird die Haut des Rumpfes abgezogen, die wie für die Vorhäute beschrieben (5.2.1.1), auf Trypsin inkubiert und weiter bearbeitet wird.

5.2.1.3 Präparation von Cornified Envelope aus Stratum corneum

Alle Gegenstände, die mit dem Präparat in Berührung kommen, müssen eine stark hydrophobe Oberfläche besitzen. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen werden als silikonisierte Produkte gekauft und ohne weitere Behandlung verwendet. Andere Verbrauchsmaterialien wie z.B. Zentrifugenröhrchen werden dreimal mit Trimethylsilylchlorid überzogen und an der Luft getrocknet. Nach der dritten Benetzung werden sie über Nacht bei 60 °C getrocknet.

Literatur: Jarnik *et al.*, 1996; Jarnik *et al.*, 1998; Jarnik *et al.*, 2002

Das Stratum corneum (100 – 500 mg) wird in einem Becherglas mit Puffer A (1 ml Puffer pro 10 mg SC) 10 min unter Rühren zum Sieden erhitzt. Anschließend wird die Suspension in der Ultrazentrifuge mit 10.000 rpm (entspricht 17.147 x g) 10 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, die Pellets werden wieder in das Becherglas überführt und erneut 10 min lang in Puffer A gekocht und zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal mit Puffer B gewaschen, indem man es im Zentrifugenröhrchen durch Vortexen im Puffer suspendiert und wie vorher abzentrifugiert.

Anschließend wird das Pellet in wenig Puffer B suspendiert, vorsichtig auf 7 ml einer 3 % igen Lösung von Ficoll in Puffer B gegeben und 30 min bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Phase über der Ficoll-haltigen Schicht wird in Schraubkappengläser überführt und mit Puffer B gewaschen, bis sich beim Zentrifugieren (3.000 x g) ein klar erkennbares Pellet bildet.

Das Pellet wird in Puffer B suspendiert. Die Suspension wird solange mit Ultraschall (Sonifier 250) behandelt, bis im Lichtmikroskop keine intakten Korneozyten mehr erkennbar sind (etwa 1 – 6 h). Der entstandene CE wird sukzessive in einem silikonisierten Reaktionsgefäß bei 14.000 rpm (entspricht 20.800 x g) über 10 min als Pellet abzentrifugiert. Das Pellet wird noch zweimal mit Puffer B gewaschen und der CE als Suspension in Puffer B bei 4°C gelagert.

Zur Ermittlung des Trockengewichts des CE wird ein Aliquot entnommen, mehrfach mit Methanol gewaschen, in der Speedvac getrocknet und anschließend gewogen.

Üblicherweise erhält man Ausbeuten von ca. 6 % CE bezogen auf das Trockengewicht des eingesetzten SC.

Größere Mengen CE werden, im Handhomogenisator in Methanol oder einem geeigneten Puffer wie *N*-Ethylmorpholin-Acetat-Puffer suspendiert.

5. Material und Methoden

5.2.2 Freisetzung und Extraktion von Lipiden

5.2.2.1 Extraktion frei extrahierbarer Lipide

Ist eine spätere Analyse der Peptide geplant, wird die Probe (SC oder CE) mit Tetrahydrofuran/10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8 (4:1) versetzt (Tettamanti *et al.*, 1973), 15 min im Ultraschallbad behandelt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Pellet durch mehrfaches Waschen mit Wasser von Tetrahydrofuran befreit.

Unter diesen Bedingungen bilden sich keine Methylester an vorhandenen Proteinen. Die so extrahierten Lipide können ohne vorherige Entsalzung auf ein DC aufgetragen werden.

Ist anstelle einer Analyse von Proteinen oder Peptide eine Lipidanalyse vorgesehen, werden die frei extrahierbaren Lipide mit Chloroform/Methanol (1:1) extrahiert. Diese Art der Extraktion ist geeignet, um die frei extrahierbaren Lipide vollständig aus SC oder CE zu entfernen.

Vor Abspaltung der proteingebundenen Lipide muss sichergestellt sein, dass die frei extrahierbaren Lipide vollständig extrahiert wurden. Dazu versetzt man die Probe mit 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) und inkubiert 15 min bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation nimmt man den Überstand ab und analysiert ihn dünnschichtchromatographisch (5.2.3.3). Erst wenn sich keine freien Lipide mehr nachweisen lassen, werden die proteingebundenen Lipide abgespalten.

5.2.2.2 Abspalten der proteingebundenen Lipide durch alkalische Hydrolyse

Literatur: Wertz und Downing, 1987

1 – 5 mg SC oder CE werden mit 1 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95 % Methanol versetzt, 2 h bei 60 °C inkubiert und anschließend mit 68,75 µl Eisessig neutralisiert. Die Probe wird zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit je 200 µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Überstände werden im Stickstoffstrom eingedampft.

5.2.2.3 Partielle alkalische Hydrolyse von CE

1 – 5 mg CE werden in 1 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95 % Methanol suspendiert, 10 min bei 45 °C inkubiert und mit 68,75 µl Eisessig neutralisiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit je 200 µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Überstände werden im Stickstoffstrom eingedampft.

5.2.2.4 Abspalten der proteingebundenen Lipide durch Reduktion mit Natriumborhydrid

50 mg SC werden mit 107 mg (1,2 mmol) Lithiumbromid in 5 ml Tetrahydrofuran/Wasser (9:1) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Dann werden 57 mg (1,5 mmol) Natriumborhydrid zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation bleibt das reduzierte SC als Pellet zurück, während sich die abgespaltenen Lipide im Überstand befinden.

5.2.2.5 Abspalten der proteingebundenen Lipide durch Umesterung

1 – 5 mg CE werden unter Argonatmosphäre mit 750 µl wasserfreiem Methanol versetzt. Nach Zugabe von 750 µl einer 0,5 M Lösung von Natriummethanolat in Methanol wird das Gemisch 30 min mit Ultraschall behandelt, weitere 90 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 450 µl Eisessig neutralisiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit je 200 µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Überstände werden im Stickstoffstrom eingedampft.

5. Material und Methoden

5.2.3 Lipidanalytik

5.2.3.1 Entsalzen der Lipidextrakte über RP-18-Säulchen

Literatur: Williams und McCluer, 1980

In Pasteurpipetten, die mit etwas silanisierter Glasfaserwatte gefüllt sind, werden 1,5 ml methanolische RP-18-Suspension gegeben. Zur Entfernung von unter 43 µm großen RP-18-Partikeln und zur Äquilibration werden die Säulchen nacheinander mit folgenden Lösungen gespült:

1 ml Methanol

2 ml Wasser

1 ml Methanol

2 ml Chloroform/Methanol (1:1)

1 ml Methanol

2 ml theoretische Oberphase (Chloroform/Methanol/0,1 M wäßrige Kaliumchlorid-Lösung (3:48:47))

Die zu entsalzenden trockenen Proben werden in 750 µl Methanol gelöst, 5 min im Ultraschallbad behandelt, mit 750 µl 300 mM wäßriger Ammoniumacetat-Lösung versetzt und auf die RP-18-Säulchen gegeben. Die Probengefäße werden mit 1 ml einer Lösung von 200 mM Ammoniumacetat in Methanol/Wasser (1:1) nachgespült. Die Salze werden mit 8 ml Wasser eluiert. Nach Aufgabe von 600 µl Methanol werden die Lipide mit weiteren 400 µl Methanol und dann mit 8 ml Chloroform/Methanol (1:1) eluiert und im Stickstoffstrom eingedampft.

5.2.3.2 Entsalzen der Lipidextrakte nach der Bligh-Dyer-Methode

Literatur: Signorelli und Hannun, 2002

Die zu entsalzenden trockenen Proben werden im Schraubkappenglas mit 2 ml Methanol, 1 ml Chloroform und 800 µl Wasser versetzt und 30 s kräftig gevortext. Man erhält ein homogenes Gemisch. Dieses wird für 15 min auf -20°C gekühlt und dann mit 1 ml Chloroform und 1 ml Wasser versetzt. Nach 30 s vortexen wird 20 min bei 4.000 rpm zentrifugiert. Dabei bilden sich zwei Phasen. Die obere Phase wird entfernt, die untere enthält die Lipide und wird im Stickstoffstrom eingedampft.

5.2.3.3 Auftrennung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie

Die eingedampften Lipide werden in Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen, und Volumina, die gleichen Mengen an Trockengewicht oder Protein entsprechen, mit dem Linomaten auf HPTLC-Platten aufgetragen. Radioaktive Proben werden von Hand mit Glaskapillaren aufgetüpfelt. Die HPTLC-Platten werden 30 min lang im evakuierten Excikator über Kaliumhydroxid getrocknet.

Die Platten werden in eine Horizontalkammer gelegt, die mit Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1) befüllt ist, und 20 min äquilibriert. Dann wird die Platte entwickelt, getrocknet und nochmals im gleichen Laufmittel entwickelt.

Zur Detektion der Lipide werden die Platten in eine Lösung von 10 % Kupfersulfat (w/v) in 8 %iger Phosphorsäure (w/v) getaucht und anschließend für 10 min auf 180 °C erhitzt.

Die Identifikation der Banden erfolgt über authentische Standard-Substanzen.

Die Quantifizierung der Lipidbanden erfolgt am Densitometer. Dazu werden Eichreihen im Bereich von 0,5 bis 15 µg erstellt. Für die *w*-OH-Fettsäuren dient *w*-OH-Palmitinsäure als Eichsubstanz, während für die Ceramide Ceramid (NP) verwendet wird (Weerheim und Ponec, 2001).

Radioaktiv markierte Lipide werden mit Hilfe des Bio Imaging Analyzers visualisiert und quantifiziert.

5.2.3.4 Detektion kovalent gebundener ω -OH-Lipide in Lösungen (Kap. 3.2.3)

Der Lösung wird ein geeignetes Aliquot entnommen (2 – 10 ml), im Stickstoffstrom eingedampft und auf eine Kieselgelsäule (Kieselgel in Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1), 15 ml Volumen) gegeben. Die frei eluierbaren Lipide werden mit demselben Laufmittel vollständig eluiert. Zur Kontrolle werden 10 ml Eluat dünn-schichtchromatographisch auf die Anwesenheit von Lipiden überprüft.

Zur Analyse der frei eluierbaren Lipide verwendet man nur die ersten 50 ml des Eluats, da sonst mitgeschleppte Pufferbestandteile stören.

Wenn alle extrahierbaren Lipide eluiert wurden, wird der Inhalt der Säule (Kieselgel und nicht eluierte Substanzen) in ein geeignetes Gefäß überführt und einer alkalischen Hydrolyse (5.2.2.2) mit 20 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95 % Methanol

5. Material und Methoden

für 2 h bei 60°C unterzogen. Nach Neutralisation mit 1,375 ml Eisessig wird die Suspension erneut auf eine Kieselgelsäule (Chloroform/Methanol/Eisessig (190:9:1), 10 ml Volumen) gegeben und 50 ml eluiert.

Die zu analysierenden Eluate werden über RP-18-Säulchen entsalzt (5.2.3.1) und dünnschichtchromatographisch analysiert (5.2.3.3).

5.2.4 Spaltung von SC und CE

5.2.4.1 Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung der freien Cysteine

Literatur: Steinert, 1995

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wird CE in einer Konzentration von 1 mg/ml in einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 9,0), 8 M Harnstoff, 1 mM EDTA und 0,1 M β -Mercaptoethanol suspendiert und 4 h bei 37 °C gerührt.

Zur Alkylierung mit Iodessigsäure werden 1,3 ml einer Lösung von 200 mg Iodessigsäure in 1 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) zugegeben (entspricht 0,15 M Iodessigsäure).

Zur Alkylierung mit Iodacetamid werden 1,3 ml einer Lösung von 200 mg Iodacetamid in 1 ml 3 M Tris (Base) zugegeben (entspricht 0,15 M Iodacetamid).

Nach 1 h Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wird das reduzierte und alkylierte CE durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt.

5.2.4.2 Bromcyanspaltung

Literatur: Robinson *et al.*, 1997

SC wird in einer Konzentration von 2,5 mg/ml in einer 25 % igen Lösung (w/v) von Bromcyan in 70 % Ameisensäure bzw. Trifluoressigsäure (v/v) suspendiert. Die Suspension wird 30 min im Ultraschallbad behandelt und 24 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 2 ml Wasser zugegeben und lyophilisiert. Soll anschließend eine proteolytische Spaltung durchgeführt werden, wird die trockene Probe mit 500 μ l Wasser versetzt und erneut lyophilisiert. Dieser Schritt wird so oft wiederholt, bis der pH-Wert neutral ist.

5.2.4.3 Verdau von SC mit Trypsin

1 – 5 mg SC werden mit 5 % Trypsin (sequencing grade, Promega) (w/w) in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 7,8 versetzt (1 mg/ml) und unter ständiger Bewegung bei 37 °C für 48 h inkubiert. Die flüssige Phase wird abgenommen und das Pellet mit Puffer, Acetonitril/Wasser (1:1) und Methanol gewaschen. Die vereinigten wässrigen und organischen Überstände werden in der Speedvac auf unter 300 µl aufkonzentriert. Die Lösung kann einige Tage bei 4°C gelagert werden, sollte baldmöglichst weiter verarbeitet werden.

5.2.4.4 Verdau von CE mit Trypsin

Sollen die entstandenen Peptide massenspektrometrisch untersucht werden wird modifiziertes Trypsin (sequencing grade, promega) verwendet, in allen anderen Fällen unmodifiziertes Trypsin (Sigma).

CE wird in 0,1 M *N*-Ethylmorpholin-Acetat-Puffer pH 8,3 suspendiert, mit 3 % Trypsin (w/w, Trypsin/CE) versetzt und soviel Puffer zugegeben, dass der CE eine Konzentration von 2 mg/ml hat. Die Lösung wird unter ständiger Bewegung bei 37 °C für 6 h inkubiert. Dann wird bei 14.000 rpm (20.800 x g) 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit Puffer, Acetonitril/Wasser (1:1) und Methanol gewaschen. Die vereinigten wässrigen und organischen werden in der Speedvac auf unter 300 µl aufkonzentriert. Die Lösung kann einige Tage bei 4°C gelagert werden, sollte baldmöglichst weiter verarbeitet werden.

5.2.4.5 Verdau von CE mit Proteinase K

CE wird in *N*-Ethylmorpholin-Acetat-Puffer pH 8,3 suspendiert, mit 3 % Proteinase K (w/w, Proteinase K/CE) versetzt und soviel Puffer zugegeben, dass der CE eine Konzentration von 2 mg/ml hat. Die Lösung wird unter ständiger Bewegung bei 37 °C für 1 – 6 h inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgt wie für den Verdau mit Trypsin. Die Überstände werden jedoch bei -80 °C gelagert.

5. Material und Methoden

5.2.4.6 Verdau von CE mit Plasmin

1 - 5 mg CE werden mit einer Konzentration von 1 mg/ml in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 7,8 suspendiert und Plasmin im Verhältnis 1:1 (w/w) zum CE zugegeben. Die Suspension wird 30 min im Ultraschallbad behandelt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird durch Zentrifugation abgetrennt.

5.2.4.7 Affinitätsspaltung

Etwa 10 mg CE werden in Methanol suspendiert und zur Entfernung von Wasser fünfmal mit wasserfreiem Methanol unter Argonatmosphäre gewaschen. Pro mg CE werden 100 µl wasserfreies Methanol und 100 µl 0,5 M Natriummethanolat in Methanol zugegeben. Die Probe wird 30 min im Ultraschallbad behandelt und weitere 7,5 h bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Zur Neutralisation werden pro 100 µl Natriummethanolat-Lösung 60 µl Eisessig zugesetzt. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min) wird der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit je 500 µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Überstände werden mit 200 µl Wasser versetzt und im Stickstoffstrom bis auf ca. 200 µl eingedampft. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 150 µl Chloroform extrahiert und anschließend auf die HPLC-Säule aufgetragen.

5.2.5 RP-HPLC

5.2.5.1 Trennung von Peptiden und Lipopeptiden über RP-4-HPLC

Literatur: Marekov und Steinert, 1998

Die Trennung erfolgt an der ettan-LC mit einer Jupiter-C4-Säule (250 x 2,00 mm). Die Flussrate beträgt 220 µl/min. Laufmittel A besteht aus 0,1 % TFA und 10 % Acetonitril in Wasser, Laufmittel B aus 0,08 % TFA und 15 % Isopropanol in Acetonitril. Die Säule wird in Laufmittel A äquilibriert. Ist die Probe sehr viskos, wird sie in mehreren Portionen aufgetragen. Nach dem Probenauftrag werden über 15 min Salze und Peptide mit Laufmittel A eluiert. Anschließend erfolgt die Elution der Lipopeptide mit Hilfe eines Gradienten von 0 % bis 100 % B über 60 min und weitere 10 min bei 100 % B. Zur massenspektrometrischen Analyse wird das Eluat in Fraktionen von 100 µl gesammelt. Werden die Fraktionen später wieder vereinigt und z.B. alkalisch hydrolysiert, beträgt die Fraktionsgröße 1,5 ml.

5.2.5.2 Trennung von Peptiden über RP-18-HPLC

Die Trennung erfolgt an der ettan-LC mit einer Vertex-Nucleosil-C18-Säule (250 x 2,00 mm). Die Flussrate beträgt 100 µl/min. Laufmittel A besteht aus 0,1 % TFA in Wasser, Laufmittel B aus 0,08 % TFA in Acetonitril/Isopropanol (70:30). Die Säule wird in 5 % B äquilibriert. Ist die Probe sehr viskos, wird sie in mehreren Portionen aufgetragen. Nach dem Probenauftrag wird 15 min mit 5 % B gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Gradienten von 5 % bis 100 % B über 75 min und weitere 20 min bei 100 % B eluiert. Die Peptide werden in Fraktionen zwischen 100 und 500 µl gesammelt.

Bei Proben mit geringem Peptid-Gehalt wird TFA im Laufmittel durch Ameisensäure ersetzt, da TFA bei geringem Peptidgehalt die ESI-MS-Messung stört. Ameisensäure führt jedoch häufig zu unspezifischen Modifikationen der Peptide.

5. Material und Methoden

5.2.5.3 Trennung von ω -OH-Lipiden über RP-18-HPLC

Die Trennung erfolgt an der ettan-LC mit einer Vertex-Nucleosil-C18-Säule (250 x 2,00 mm). Aufgetragen werden etwa 100 μg Lipid. Die Flussrate beträgt 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Lipide werden isokratisch mit 3 % Tetrahydrofuran in Methanol über 90 min getrennt und in Fraktionen von 500 μl gesammelt. Aus jeder Fraktion werden 400 μl dünnschichtchromatographisch analysiert (5.2.3.3). Diejenigen Fraktionen, die wenige und intensive Banden enthalten, werden ohne weitere Aufarbeitung durch ESI-MS und ESI-MS/MS analysiert (5.2.7.3).

5.2.6 Photometrische und fluorometrische Bestimmungen

5.2.6.1 Proteinbestimmung

Literatur: Smith *et al.*, 1985

Feste Proben aus der CE-Präparation werden in Puffer B (s. Kap. 5.1.6) so lange mit Ultraschall (Sonifier 250) behandelt, bis sie suspendiert sind. Für die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode werden sie 1:20 verdünnt, da DTT sonst stört. Als Kontrolle dient eine bekannte Menge BSA, die analog behandelt wird.

Für die Proteinbestimmung werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte aus Gewebesuspensionen je 5 μl und 10 μl , aus dem Homogenat kultivierter Keratinozyten je 2,5 μl und 5 μl , in Doppelbestimmung mit Wasser auf 20 μl aufgefüllt und mit 200 μl eines 50:1-Gemisches aus BCA (Bicinchoninsäure-Lösung, pH 11,5) und 4 % iger Kupfersulfat-Lösung (w/v) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei 60 °C wird die Platte bei 595 nm in einem computergesteuerten Mikrotiterplatten-Photometer vermessen. Anhand der parallel erstellten Eichreihe aus BSA (0,25 – 5 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$) wird der Proteingehalt der Proben ermittelt.

5.2.6.2 Aminosäure-Quantifizierung

Proben mit einem Protein- bzw. Peptidgehalt von 50 – 100 µg werden in der Speedvac getrocknet, mit 7,5 µl 6 N Salzsäure versetzt, 48 h bei 99°C inkubiert und anschließend mit 150 µl 600 mM Na₂HPO₄-Lösung neutralisiert.

In einer 96-well-Mikrotiterplatte werden je 5 µl, 10 µl, 15 µl und 20 µl in Doppelbestimmung mit 600 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 auf 20 µl aufgefüllt und mit 200 µl einer 0,35 %igen Lösung von Ninhydrin in Ethanol (w/v) versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 60 °C wird die Platte bei 595 nm in einem computergesteuerten Mikrotiterplatten-Photometer vermessen.

Als Kontrolle werden 75 µg BSA analog behandelt.

Die Eichreihe wird anhand eines Aminosäure-Standards (s. Kap. 5.1.6) angefertigt, indem Volumina zwischen 0 µl und 20 µl (entspricht 0 µg bis 10 µg Aminosäuren) mit 600 mM Natriumphosphatpuffer ebenfalls auf 20 µl aufgefüllt, analog gefärbt und vermessen werden.

5.2.6.3 Quantifizierung der Esterhydrolyse mit Arachidonsäureumbelliferylester

5.2.6.3.1 Quantifizierung der Esterhydrolyse beim Aufkochen in Puffer A

Eine 1,5 µM Lösung von Arachidonsäureumbelliferylester in Puffer A wird mit und ohne Zusatz von ein wenig SC zweimal 10 min lang gekocht. Aliquots von je 100 µl in Doppelbestimmung werden bei 355 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 460 nm gemessen (Absorptionsmaximum: 364,8 nm, Emissionsmaximum: 451,2 nm). Eine Eichreihe wird aus Gemischen mit unterschiedlichen Anteilen einer 1,5 µM Lösung von Arachidonsäureester in Puffer A in einer 1,5 µM Lösung von Umbelliferon in Puffer A erstellt.

5.2.6.3.2 Quantifizierung der Esterhydrolyse beim tryptischen Verdau

Eine 300 nM Lösung von Arachidonsäureumbelliferylester in 100 µM N-Ethylmorpholin-Acetat-Puffer pH 8,3 wird mit und ohne die Zusätze von Trypsin und ein wenig SC 6 h

5. Material und Methoden

bei 37 °C inkubiert. Aliquots von je 100 µl in Doppelbestimmung werden bei 355 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 460 nm gemessen (Absorptionsmaximum: 364,8 nm, Emissionsmaximum: 451,2 nm). Eine Eichreihe wird aus Gemischen mit unterschiedlichen Anteilen einer 300 nM Lösung von Arachidonsäureester in 100 µM *N*-Ethylmorpholinacetat-Puffer in einer 300 nM Lösung von Umbelliferon im selben Puffer erstellt.

5.2.7 Massenspektrometrie

5.2.7.1 Glaskapillaren/Spitzen

Die käuflichen Glaskapillaren werden in 10 cm lange Stücke geschnitten und nacheinander mit Wasser, Wasser/Isopropanol (1:1), Methanol, Chloroform/Methanol (1:1) und wieder Methanol gründlich gespült. Die Kapillare wird im Spitzenzieher befestigt und das 2-Stufen-Verfahren ausgewählt. Die erste Stufe wird auf 57 eingestellt, die zweite Stufe auf 61. Das Programm wird unter Verwendung aller vier Gewichte gestartet. Aus der 10 cm langen Glaskapillare werden zwei ESI-Spitzen gezogen.

Die gezogenen Glasspitzen werden in der Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage mit vollautomatischer Prozesssteuerung mit Gold bedampft. Der Abstand zwischen der Goldfolie und den Glaskapillaren wird auf 4 cm eingestellt. Die Anlage wird bis zu einem Druck von 10⁻⁵ mbar evakuiert. Anschließend lässt man Argon einströmen, bis der Druck auf 5 x 10⁻² mbar gestiegen ist. Dann werden die Glasspitzen für 90 s bei 70 mA bedampft.

5.2.7.2 MALDI-ToF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight – Massenspektrometrie)

Die Massenspektren werden im Positiv-Modus und im Reflektron-Modus mit einem Stickstoff-Laser bei 337 nm aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung beträgt 20 kV, die Pulsspannung liegt bei 1800 – 2100 V.

Für Peptide wird als Matrix eine 1 %ige Lösung (w/v) von α -Cyano-4-hydroxymizsäure in Acetonitril/Wasser/TFA (40:60:0,1) verwendet.

Die Proben (im allgemeinen HPLC-Fractionen) werden in der Speedvac bis zur Trockne eingengt, in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen (etwa 10 pmol/ μ l) und 15 min im Ultraschallbad behandelt.

1 μ l Probelösung und 1 μ l Matrixlösung werden gemischt, auf den Probenhalter aufgetragen und an der Luft getrocknet.

Als Eichlösung dient ein Gemisch bekannter Peptide.

1.0.0.0.0 ESI-ToF-MS (Elektro Spray Ionization - Time of Flight - Massenspektrometrie)

Die Messungen werden, wenn nicht anders angegeben, im Positiv-Modus durchgeführt. Die Proben (im allgemeinen HPLC-Fractionen) werden in der Speedvac bis zur Trockne eingengt, in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen (etwa 10 pmol/ μ l) und 15 min im Ultraschallbad behandelt.

Ca. 5 μ l der Probelösung werden in die Glaskapillare (5.2.7.1) gefüllt und bei einer Quelltemperatur von 80 °C und einer Kapillarspannung von 900 – 1000 V vermessen. Die Konusspannung liegt bei 50 V.

Als Eichlösung dient eine Lösung von Natriumiodid (2 mg/ml) und Cäsiumiodid (0,05 mg/ml) in 1-Propanol/Wasser (1:1).

MS/MS-Spektren werden mit Argon als Kollisionsgas bei einem Argon-Partialdruck von 0,7 bar gemessen. Die Kollisionsenergie liegt für Peptide zwischen 30 und 40 eV.

5. Material und Methoden

5.2.8 Chemische Synthese

5.2.8.1 Allgemeine Angaben

Die für die Synthese verwendeten Chemikalien werden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Aldrich (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

Die Säulenchromatographie erfolgt an Kieselgel SI60 der Firma Merck (Darmstadt).

Die Dünnschichtchromatographie zur Reaktionskontrolle und zur Erstellung des säulenchromatographischen Profils erfolgt auf mit Kieselgel SI60 (40 - 63 μm) beschichteten Aluminium-DC-Platten (Merck, Darmstadt). Die Detektion erfolgt durch Eintauchen der Platten in eine Mischung Eisessig/Schwefelsäure/Anisaldehyd (500:10:2) (Kägi-Miescher-Reagenz) und anschließendes Erhitzen.

^1H -NMR-Spektren werden mit den Geräten DPX-300 (300 MHz) und DPX-400 (400 MHz) der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und sind auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, b = verbreitert.

^{13}C -NMR-Spektren werden mit den Geräten DPX-300 (75 MHz) und DPX-400 (100 MHz) der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und sind auf das jeweilige Lösungsmittel bezogen.

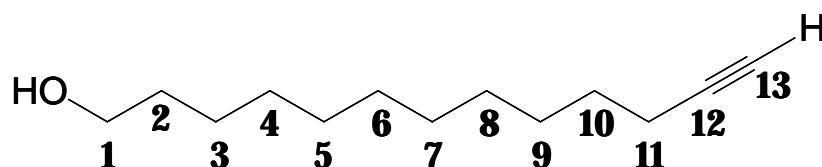
Fast Atom Bombardment Massenspektren (FAB-MS) werden mit dem Massenspektrometer Concept H1 der Firma Kratos (Manchester, UK) aufgenommen. Als Matrix wird 3-Nitrobenzoesäure (mNBA) verwendet.

Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektren (EI-MS) werden mit den Massenspektrometern MS 50 der Firma AEI (Manchester, UK) und MAT 95 der Firma Finnigan (Manchester, UK) bei 70 eV aufgenommen.

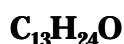
Elementaranalysen werden auf dem CHNO-Rapid-Gerät der Firma Heraeus Instruments (Hanau) im Mikroanalytischen Labor des Kekulé-Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

5.2.8.2 Synthese von Tetracos-11-en-23-insäure

5.2.8.2.1 Synthese von Tridec-12-in-1-ol (1)



(1)



$$M(\text{monoisotop.}) = 196,183 \text{ Da}$$

Literatur: Smith und Beumel Jr., 1974

Unter Argonatmosphäre werden 8 g (86,9 mmol) Lithiumacetylid-Ethylendiamin-Komplex in 40 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und auf 8 °C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min werden 19,77 g (78,4 mmol) 11-Brom-1-undecanol portionsweise zugegeben. Es wird eine weitere Stunde bei 8 °C gerührt, langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 15 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wird vorsichtig mit 20 ml Wasser versetzt, wobei die Temperatur 35 °C nicht übersteigen darf. Das Gemisch wird mit 80 g Kieselgel versetzt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (5:1)) erhält man 8,11 g (52,5 %) eines weißen Feststoffes.

Analytik:

$R_f = 0,24$ (n-Hexan/Ethylacetat (5:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,19 – 1,37 (m, b, 14 H, 3- CH_2 bis 9- CH_2); 1,41 – 1,54 (m, 4 H, 2- CH_2 und 10- CH_2); 1,87 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,65 \text{ Hz}$, 1 H, 13-CH); 2,11 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,08 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2,65 \text{ Hz}$, 2 H, 11- CH_2); 3,57 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,57 \text{ Hz}$, 2 H, 1- CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 18,42 (11- CH_2); 25,76 (3- CH_2); 28,52; 28,77; 29,11; 29,43; 29,48; 29,52; 29,58 (4- CH_2 bis 10- CH_2); 32,84 (2- CH_2); 63,12 (1- CH_2); 68,04 (13-CH); 84,82 (12- $\text{C}_{\text{quart.}}$).

5. Material und Methoden

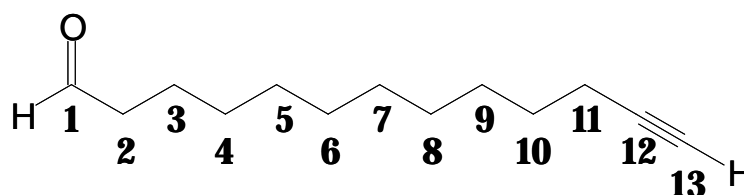
FAB-MS ($C_{13}H_{24}O$): $m/z = 350,2 [M+Matrix+H]^+$

Elementaranalyse ($C_{13}H_{24}O$):

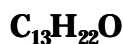
berechnet: C: 79,53 %, H: 12,32 %, O: 8,15 %

gefunden : C: 79,11 %, H: 12,26 %

5.2.8.2.2 Synthese von Tridec-12-inal (2)



(2)



$M(\text{monoisotop.}) = 194,167 \text{ Da}$

Literatur: Becker *et al.*, 1996

Unter Argonatmosphäre werden 4,7 ml (34,8 mmol) Oxalylchlorid in 120 ml Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird auf -78°C gekühlt. Dann werden langsam 8,3 ml (71,0 mmol) Dimethylsulfoxid in 50 ml Dichlormethan zugetropft und nach 5 min 6,5 g (33,0 mmol) Tridec-12-in-1-ol (1) in 50 ml Dichlormethan zugegeben. Es wird 15 min bei -78°C gerührt. Nach Zugabe von 36 ml (158 mmol) Triethylamin wird das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 h Rühren wird die Lösung mit 240 ml Wasser versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 240 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (10:1)) erhält man 3,39 g (51 %) eines farblosen Öls.

Da der entstandene Aldehyd oxidationsempfindlich ist, wird er so schnell wie möglich weiterverwendet.

Analytik :

$R_f = 0,39$ (n-Hexan/Ethylacetat (10:1))

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,15 – 1,39 (b, 12 H, 4- CH_2 bis 9- CH_2); 1,45 (m, 2 H, 10- CH_2); 1,55 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,64$ Hz, 1 H, 13-CH); 2,11 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,07$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,45$ Hz, 2 H, 11- CH_2); 2,35 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,35$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 1,88$ Hz, 2 H, 2- CH_2); 9,69 (t, $^3J_{\text{HH}} = 1,88$ Hz, 1 H, 1-CH)

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 18,39 (11- CH_2); 22,09 (3- CH_2); 28,48; 28,72; 29,05; 29,15; 29,31; 29,34; 29,39 (4- CH_2 bis 10- CH_2); 43,90 (2- CH_2); 68,04 (13-CH); 84,75 (12- C_{quart}); 202,86 (1-CH).

EI-MS ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}$): $m/z = 193,1$ [$\text{M} - \text{H}$] $^+$

ESI-MS ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}$): $m/z = 195,08$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

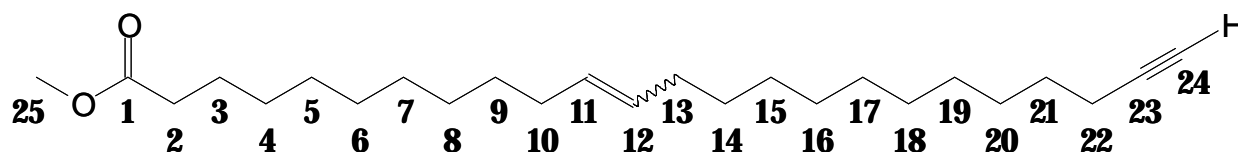
Elementaranalyse ($\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}$):

Wegen der Oxidationsempfindlichkeit des Aldehyds enthält die Probe immer große Mengen des Oxidationsprodukts (12-Tridecinsäure).

berechnet:	C: 80,35 %,	H: 11,41 %,	O: 8,23 %
gefunden :	C: 77,48 %,	H: 10,85 %	
berechnet (Aldehyd mit 50 % Säure):	C: 77,15 %,	H: 10,98 %,	O: 11,86 %

5. Material und Methoden

5.2.8.2.3 Synthese von Tetracos-11-en-23-insäuremethylester (3)



(3)



M(monoisotop.) = 376,334 Da

Literatur: Reist und Christie, 1970; Bestmann *et al.*, 1976

Unter Argonatmosphäre werden 5,95 g (21,3 mmol) 11-Bromundecansäuremethylester und 6,11 g (23,3 mmol) Triphenylphosphin 5 h bei 140 °C gerührt. Die klare Lösung wird auf unter 60 °C abgekühlt und mit 30 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden langsam 11,5 ml (23,0 mmol) einer 2 M Natrium-Hexamethyldisilazan-Lösung zugesetzt, wobei sich die Reaktionsmischung orange färbt. Es wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und eine weitere Stunde unter Rückfluß gerührt. Anschließend werden 3,56 g (18,3 mmol) Tridec-12-inal (2) in 30 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 60 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen. Die organische Phase wird isoliert und mit 60 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit je 30 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (50:1)) erhält man 2,21 g eines farblosen Öls (32,1 % bezogen auf Tridec-12-inal ohne Berücksichtigung der Verluste durch Oxidation).

Analytik:

$R_f = 0,47$ (n-Hexan/Ethylacetat (15:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,18 – 1,36 (b, 26 H, 4- CH_2 bis 9- CH_2 , 14- CH_2 bis 20- CH_2); 1,45 (m, 2 H, 21- CH_2); 1,55 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,65$ Hz, 1 H, 24- CH_2); 1,94 (m,

4 H, 10-CH₂, 13-CH₂); 2,10 (td, ³J_{HH} = 7,07 Hz, ⁴J_{HH} = 2,65 Hz, 2 H, 22-CH₂); 2,23 (t, ³J_{HH} = 7,52 Hz, 2 H, 2-CH₂); 3,59 (s, 3 H, 25-CH₃); 5,28 (m, 2 H, 11-CH, 12-CH).

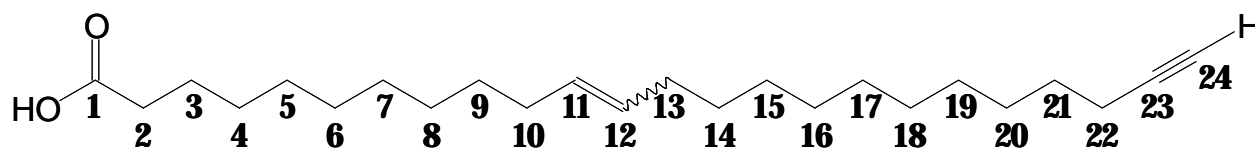
¹³C-NMR : (100 MHz, CDCl₃)

d [ppm] = 18,42 (22-CH₂); 24,99 (3-CH₂); 27,23; 28,53; 28,78; 29,13; 29,18; 29,26; 29,29; 29,32; 29,44; 29,49; 29,51; 29,54; 29,59; 29,77; 29,78; 32,61 (4-CH₂ bis 10-CH₂, 13-CH₂ bis 21-CH₂); 34,14 (2-CH₂); 51,42 (25-CH₃); 68,03 (24-CH); 84,80 (23-C_{quart.}); 129,89; 129,93 (11-CH, 12-CH); 174,31 (1-C_{quart.}).

EI-MS (C₂₅H₄₄O₂): m/z = 376,3 [M]⁺
345,3 [M - OMe]⁺

ESI-MS (C₂₅H₄₄O₂): m/z = 377,36 [M + H]⁺
399,32 [M + Na]⁺
775,66 [2M + Na]⁺

5.2.8.2.4 Synthese von Tetracos-11-en-23-insäure (IS-24)



(IS-24)

C₂₄H₄₂O₂
M(monoisotop.) = 362,318 Da

1,46 g (3,9 mmol) Tetracos-11-en-23-insäuremethylester (3) werden in 150 ml Chloroform/Methanol (1:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden langsam 50 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95% Methanol zugetropft. Man erwärmt langsam auf Raumtemperatur und lässt weitere 18 h rühren. Das Reaktionsgemisch wird auf ein Gemisch aus Eis und Salzsäure gegeben und die organische Phase isoliert. Die wässrige Phase wird zweimal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach

5. Material und Methoden

säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Etylacetat (5:1)) erhält man 0,40 g (28,3 %) eines weißen Feststoffes.

Analytik:

$R_f = 0,18$ (n-Hexan/Ethylacetat (5:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,18 – 1,36 (b, 26 H, 4- CH_2 bis 9- CH_2 , 14- CH_2 bis 20- CH_2); 1,45 (m, 2 H, 21- CH_2); 1,57 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,65$ Hz, 1 H, 24-CH); 1,95 (m, 4-H, 10- CH_2 , 13- CH_2); 2,10 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,08$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,65$ Hz, 2 H, 22- CH_2); 2,28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,52$ Hz, 2 H, 2- CH_2); 5,28 (m, 2 H, 11-CH, 12-CH).

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO-d_6)

δ [ppm] = 1,1 – 1,7 (b, 26 H, 3- CH_2 bis 9- CH_2 , 14- CH_2 bis 21- CH_2); 1,97 (m, 4 H, 10- CH_2 , 13- CH_2); 2,12 (td, $^3J_{\text{HH}} = 6,83$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,70$ Hz, 2 H, 22- CH_2); 2,16 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,35$ Hz, 2 H, 2- CH_2); 2,67 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,64$ Hz, 1 H, 24-CH); 5,25 – 5,40 (m, 2 H, 11-CH und 12-CH); 11,9 (b, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 18,42 (22- CH_2); 24,71 (3- CH_2); 27,23; 28,53; 28,79; 29,09; 29,13; 29,25; 29,29; 29,32; 29,42; 29,49; 29,51; 29,54; 29,59; 29,77; 29,78; 32,61 (4- CH_2 bis 10- CH_2 , 13- CH_2 bis 21- CH_2); 33,94 (2- CH_2); 68,04 (24-CH); 84,82 (23 C); 129,86; 129,94 (11-CH, 12-CH); 179,35 (1- C_{quart}).

EI-MS ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_2$): $m/z = 362,3$ [M] $^+$

ESI-MS (positiv-Modus) ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_2$): $m/z = 363,33$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$
 $385,30$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$
 $747,63$ [$2\text{M} + \text{Na}$] $^+$

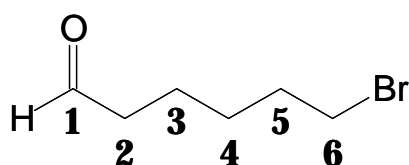
ESI-MS (negativ-Modus) ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_2$): $m/z = 361,29$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$
 $723,59$ [$2\text{M} - \text{H}$] $^-$

Elementaranalyse (C₂₄H₄₂O₂):

berechnet:	C: 79,50 %,	H: 11,68 %,	O: 8,82 %
gefunden:	C: 79,20 %,	H: 11,91 %	

5.2.8.3 Synthese von Tricont-17-en-29-insäure

5.2.8.3.1 Synthese von 6-Bromhexanal (4)



(4)



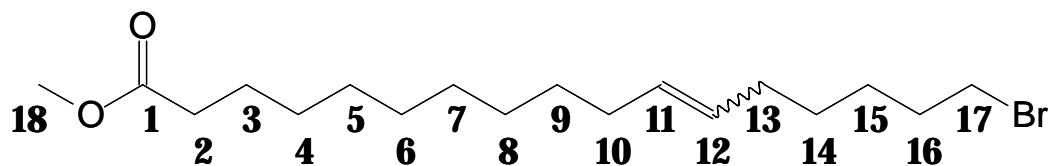
$M(\text{monoisotop.}) = 177,999 \text{ Da}$

Literatur: Becker *et al.*, 1996

Unter Argonatmosphäre werden 7,8 ml (92,2 mmol) Oxalylchlorid in 210 ml Dichlormethan gelöst und die Lösung auf -78°C gekühlt. Dann werden langsam 13,8 ml (194 mmol) Dimethylsulfoxid in 75 ml Dichlormethan zugetropft und nach 5 min 16,40 g (90,6 mmol) 6-Bromhexanol in 75 ml Dichlormethan zugegeben. Es wird 15 min bei -78°C gerührt. Nach Zugabe von 55,5 ml (399 mmol) Triethylamin wird das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 h Rühren wird die Lösung mit 375 ml Wasser versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wird zweimal mit je 375 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (10:1)) erhält man 6,31 g (42,7 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Da der entstandene Aldehyd oxidationsempfindlich ist, wird er so schnell wie möglich weiterverwendet.

5.2.8.3.2 Synthese von 17-Bromheptadec-11-ensäuremethylester (5)



(5)



$$M(\text{monoisotop.}) = 360,166 \text{ Da}$$

Literatur: Reist und Christie, 1970; Bestmann *et al.*, 1976

Unter Argonatmosphäre werden 11,30 g (42,6 mmol) 11-Bromundecansäuremethylester und 11,30 g (40,7 mmol) Triphenylphosphin 5 h bei 140 °C gerührt. Die klare Lösung wird auf unter 60 °C abgekühlt und mit 60 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, werden langsam 21,5 ml (43 mmol) einer 2 M Natrium-Hexamethyldisilazan-Lösung zugesetzt, wobei sich die Reaktionsmischung orange färbt. Es wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und eine weitere Stunde unter Rückfluß gerührt. Anschließend 6,00 g (33,5 mmol) 6-Bromhexanal (4) in 60 ml Tetrahydrofuran zugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 120 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen. Die organische Phase wird isoliert und mit 120 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit je 60 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (50:1)) erhält man 2,66 g einer farblosen Flüssigkeit (22,1 % bezogen auf 6-Bromhexanal ohne Berücksichtigung der Verluste durch Oxidation).

Analytik:

$R_f = 0,24$ (n-Hexan/Ethylacetat (50:1))

5. Material und Methoden

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,18 – 1,42 (b, 16 H, 4- CH_2 bis 9- CH_2 , 14- CH_2 , 15- CH_2); 1,54 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 7,32$ Hz, 2 H, 3- CH_2); 1,70 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 6,76$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,33$ Hz, 1,1 H) und 1,79 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,33$ Hz, 0,9 H, 16- CH_2); 1,94 (m, 4 H, 10- CH_2 , 13- CH_2); 2,23 (t, 2 H, $^3J_{\text{HH}} = 7,52$ Hz, 2- CH_2); 3,33 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, 1,1 H) und 3,46 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,76$ Hz, 0,9 H, 17- CH_2); 3,59 (s, 3 H, 18- CH_3); 5,28 (m, 2 H, 11- CH_2 , 12- CH_2).

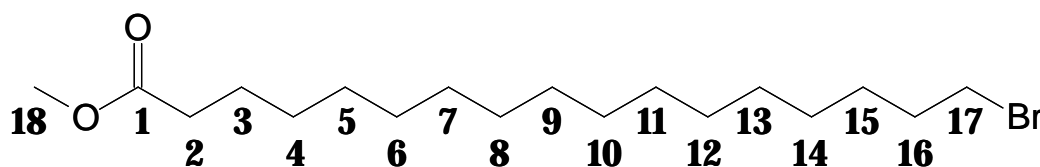
$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 24,96 (3- CH_2); 26,99; 27,85 (10- CH , 13- CH); 28,88; 29,01; 29,17; 29,26; 29,28; 29,42; 29,48; 29,73; 32,77 (4- CH_2 bis 9- CH_2 , 14- CH_2 , 16- CH_2); 33,82 (17- CH_2); 34,13 (2- CH_2); 51,41 (18- CH_3); 129,31; 130,36 (11- CH , 12- CH); 174,29 (1- C_{quart})

EI-MS ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{BrO}_2$): $m/z = 360,1$ [$\text{M}^{(79}\text{Br})$] $^+$
 $362,1$ [$\text{M}^{(81}\text{Br})$] $^+$

ESI-MS ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{BrO}_2$): $m/z = 361,16$ [$\text{M}^{(79}\text{Br}) + \text{H}$] $^+$
 $363,16$ [$\text{M}^{(81}\text{Br}) + \text{H}$] $^+$
 $383,15$ [$\text{M}^{(79}\text{Br}) + \text{Na}$] $^+$
 $385,14$ [$\text{M}^{(81}\text{Br}) + \text{Na}$] $^+$

5.2.8.3.3 Synthese von 17-Bromheptadecansäuremethylester (6)



(6)

$\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{BrO}_2$

$M(\text{monoisotop.}) = 362,182$ Da

Literatur: Fu und Harvey, 1978

2,15 g (5,95 mmol) 17-Bromheptadec-11-ensäuremethylester (5) werden in 300 ml Chloroform/Methanol (1:1) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze des Palladium-Kohle-Katalysators (10 % Pd) wird unter Wasserstoff-Atmosphäre 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Ethylacetat (50:1)) erhält man 1,71 g (79,1 %) eines weissen Feststoffes.

Analytik:

$R_f = 0,25$ (n-Hexan/Ethylacetat (50:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,14 – 1,40 (b, 24 H, 4- CH_2 bis 15- CH_2); 1,54 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,69 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,143$ Hz, 0,8 H) und 1,78 (tt, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7,14$ Hz, 1,2 H, 16- CH_2); 2,23 (t, 2 H, $^3J_{\text{HH}} = 7,52$ Hz, 2- CH_2); 3,34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, 1,3 H) und 3,46 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,82$ Hz, 0,7 H, 17- CH_2); 3,60 (s, 3 H, 18- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3),

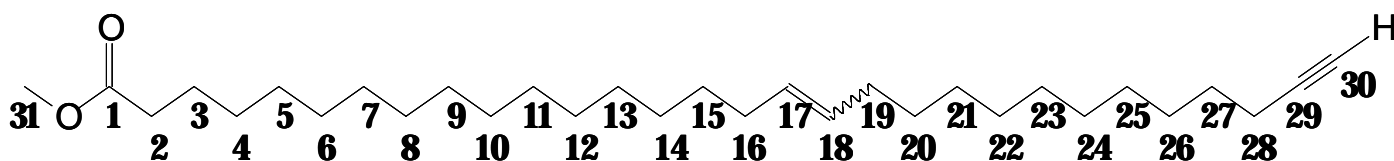
δ [ppm] = 24,99 (3- CH_2); 26,92; 28,21; 28,79; 28,92; 29,18; 29,27; 29,46; 29,56; 29,60; 29,63; 29,66; 32,70; 32,88 (4- CH_2 bis 16- CH_2); 34,02 (17- CH_2); 34,15 (2- CH_2); 51,43 (18- CH_3); 174,29 (1- C_{quart})

EI-MS ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{BrO}_2$) : $m/z = 362,1$ [$\text{M}(^{79}\text{Br})$] $^+$
 $364,1$ [$\text{M}(^{81}\text{Br})$] $^+$
 $283,2$ [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$

ESI-MS ($\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{BrO}_2$) : $m/z = 363,19$ [$\text{M}(^{79}\text{Br}) + \text{H}$] $^+$
 $365,19$ [$\text{M}(^{81}\text{Br}) + \text{H}$] $^+$
 $385,17$ [$\text{M}(^{79}\text{Br}) + \text{Na}$] $^+$
 $387,17$ [$\text{M}(^{81}\text{Br}) + \text{Na}$] $^+$
 $399,19$ [$\text{M}(^{79}\text{Br}) + \text{K}$] $^+$
 $401,19$ [$\text{M}(^{81}\text{Br}) + \text{K}$] $^+$

5. Material und Methoden

5.2.8.3.4 Synthese von Tricont-17-en-29-insäuremethylester (7)



(7)



$M(\text{monoisotop.}) = 460,428 \text{ Da}$

Literatur: Reist und Christie, 1970; Bestmann *et al.*, 1976

Unter Argonatmosphäre werden 1,55 g (4,3 mmol) 17-Bromheptadecansäuremethylester (7) und 1,24 g (4,73 mmol) Triphenylphosphin 5 h bei 140 °C gerührt. Die klare Lösung wird auf unter 60 °C abgekühlt und mit 6 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt wurde, werden langsam 2,4 ml (4,8 mmol) einer 2 M Natrium-Hexamethyldisilazan-Lösung zugesetzt, wobei sich die Reaktionsmischung orange färbt. Es wird eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und eine weitere Stunde unter Rückfluß gerührt. Anschließend werden 0,62 g (3,2 mmol) Tridec-12-inal (2) in 6 ml Tetrahydrofuran zugegeben werden. Das Reaktionsgemisch wird weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 12 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung abgebrochen. Die organische Phase wird isoliert und mit 12 ml kaltgesättigter Ammoniumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit je 12 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Etylacetat (50:1)) erhält man 0,51 g eines weissen Feststoffs (34,6 % bezogen auf Tridec-12-inal ohne Berücksichtigung der Verluste durch Oxidation).

Analytik:

$R_f = 0,24$ (n-Hexan/Ethylacetat (50:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

d [ppm] = 1,17 – 1,37 (b, 38 H, 4- CH_2 bis 15- CH_2 , 20- CH_2 bis 26- CH_2); 1,45 (m, 2 H, 27- CH_2); 1,55 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,65 \text{ Hz}$, 1 H, 30-CH); 1,94 (m,

4 H, 16-CH₂, 19-CH₂); 2,10 (td, ³J_{HH} = 7,07 Hz, ⁴J_{HH} = 2,65 Hz, 2 H, 28-CH₂); 2,23 (t, ³J_{HH} = 7,52 Hz, 2 H, 2-CH₂); 3,60 (s, 3 H, 31-CH₃); 5,28 (m, 2 H, 17-CH, 18-CH).

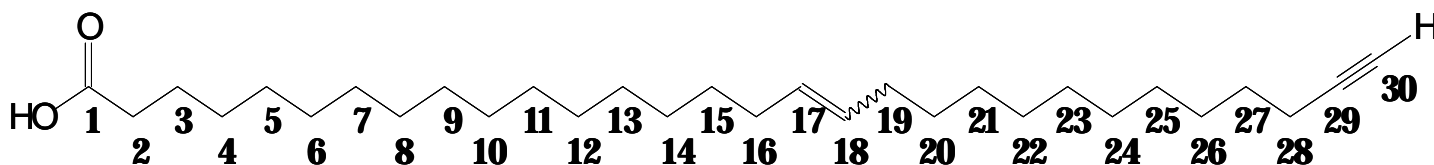
¹³C-NMR : (100 MHz, CDCl₃)

d [ppm] = 18,42 (28-CH₂); 24,99 (3-CH₂); 27,24; 28,54; 28,79; 29,13; 29,18; 29,27; 29,28; 29,31; 29,35; 29,47; 29,48; 29,51; 29,54; 29,56; 29,59; 29,62; 29,68; 29,69; 29,70; 29,79; 29,80; 31,90 (4-CH₂ bis 16-CH₂, 19-CH₂ bis 27-CH₂); 34,15 (2-CH₂); 51,42 (31-CH₃); 68,03 (30-CH); 84,81 (29-C_{quart.}); 129,89; 129,95 (17-CH, 18-CH); 174,34 (1-C_{quart.}).

FAB-MS (C₃₁H₅₆O₂): m/z = 461,4 [M + H]⁺

ESI-MS (C₃₁H₅₆O₂): m/z = 461,42 [M + H]⁺
483,40 [M + Na]⁺

5.2.8.3.5 Synthese von Tricont-17-en-29-insäure (IS-30)



(IS-30)

C₃₀H₅₄O₂

M(monoisotop.) = 446,412 Da

0,69 g (1,5 mmol) Tricont-17-en-29-insäuremethylester (7) werden in 60 ml Chloroform/Methanol (1:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden langsam 20 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95% Methanol zugetropft. Man erwärmt auf Raumtemperatur und lässt weitere 18 h rühren. Das Reaktionsgemisch wird auf ein Gemisch aus Eis und Salzsäure gegeben und die organische Phase isoliert. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach

5. Material und Methoden

säulenchromatographischer Reinigung (n-Hexan/Etylacetat = 5:1) erhält man 93 mg (13,9 %) eines weißen Feststoffes.

Analytik:

$R_f = 0,25$ (n-Hexan/Ethylacetat (5:1))

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 1,17 – 1,36 (b, 38 H, 4- CH_2 bis 15- CH_2 , 20- CH_2 bis 26- CH_2); 1,45 (m, 2 H, 27- CH_2); 1,56 (m, 2 H, 3- CH_2); 1,86 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2,65$ Hz, 1 H, 30-CH); 1,94 (m, 4 H, 16- CH_2 , 19- CH_2); 2,11 (td, $^3J_{\text{HH}} = 7,07$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2,65$ Hz, 2 H, 28- CH_2); 2,28 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,52$ Hz, 2 H, 2- CH_2); 5,28 (m, 2 H, 17-CH, 18-CH).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 18,42 (28- CH_2); 24,75 (3- CH_2); 27,23; 28,53; 28,79; 29,09; 29,13; 29,18; 29,25; 29,29; 29,32; 29,37; 29,45; 29,49; 29,51; 29,54; 29,59; 29,60; 29,65; 29,68; 29,70; 29,77; 29,78; 31,94 (4- CH_2 bis 16- CH_2 , 19- CH_2 bis 27- CH_2); 33,43 (2- CH_2); 68,03 (30-CH); 84,82 (29- C_{quart}); 129,89; 129,94 (17-CH, 18-CH); 179,34 (1- C_{quart}).

ESI-MS (positiv-Modus) ($\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_2$): $m/z = 447,43$ $[\text{M} + \text{H}]^+$
 $469,42$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$

ESI-MS (negativ-Modus) ($\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_2$): $m/z = 445,41$ $[\text{M} - \text{H}]^-$

5.2.9 Zellkultur

5.2.9.1 Kultur primärer Keratinozyten

Primäre Kulturen von humanen Keratinozyten werden aus Vorhäuten von Patienten im Alter von 3 – 5 Jahren gewonnen und nach einer Modifikation (O'Keefe *et al.*, 1982) der Methode von Rheinwald und Green, 1975 kultiviert. Die Zellen werden unter 8 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C bis zur Konfluenz in *low Calcium*-Medium (0,1 mM Ca²⁺) kultiviert.

Um die Differenzierung der Keratinozyten zu induzieren, werden die konfluenten Zellen für weitere 7 Tage in *high Calcium*-Medium (1,1 mM Ca²⁺, 10 µM Linolsäure) kultiviert.

5.2.9.2 Inhibitorstudien

Nach 7 Tagen Differenzierung werden die Zellen für weitere 24 h im *high Calcium*-Medium, dem der jeweilige Inhibitor IS-24 bzw IS-30 als 10 mM Lösung in Ethanol zugesetzt wurde, weiter kultiviert. Die Inhibitoren lagen dabei in Konzentrationen 5 µM, 10 µM, 25 µM und 50 µM im Medium vor. Bei der höchsten Konzentration von 50 µM erreicht der Ethanolgehalt im Medium mit 0,5 % den gerade noch tolerierbaren Höchstwert.

Nach dieser Vorinkubation wird das Medium entfernt und durch *high Calcium*-Medium ersetzt, das neben dem jeweiligen Inhibitor in den oben angegebenen Konzentrationen [3-³H]-Sphingosin (1 µCi/ml Medium) enthält. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden die Zellen geerntet (5.2.9.3)

5. Material und Methoden

5.2.9.3 Zellernte

Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (s. Kap. 5.1.6) 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgeschabt und in Schraubkappengläser überführt. Die Zellflaschen werden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Waschlösungen werden ebenfalls in die Schraubkappengläser gegeben. Nach Zentrifugation (5 min, 5.000 rpm, 4°C) wird der Überstand verworfen, die Zellpellets werden für mindestens 2 h bei -20°C eingefroren.

5.2.9.4 Lipidanalyse an kultivierten Keratinozyten

Die Zellpellets werden aufgetaut, mit 1 ml Wasser versetzt und je zweimal für 30 s mit Ultraschall behandelt (Sonifier 250). Im Zellhomogenat werden Proteinmenge (5.2.6.1) und Radioaktivitätsmenge bestimmt. Nach Zugabe von 4 ml Methanol wird das Homogenat 15 min im Ultraschallbad behandelt. Es werden 3 ml Chloroform/Methanol/Wasser (10:5:1) zugegeben und die Lipide durch 24-stündige Inkubation bei 37°C extrahiert. Anschließend werden die ungelösten Zellreste durch Filtration durch silanisierte Glasfaserwatte abgetrennt. Die Schraubkappengläser werden mit je 2 ml Chloroform/Methanol (1:1) nachgespült und die waschlösung ebenfalls filtriert.

Die Lipidextrakte werden im Stickstoffstrom eingedampft, in 1 ml Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Aus dieser Lösung wird erneut die Radioaktivitätsmenge bestimmt.

Gegebenenfalls werden die Lipide einer alkalischen Hydrolyse (5.2.2.2) unterzogen. Dazu werden sie mit 1 ml einer 1 M Lösung von Kaliumhydroxid in 95% Methanol versetzt, 2 h bei 60°C inkubiert, mit 68,75 µl Essigsäure neutralisiert, eingedampft und über RP-18-Säulchen entsalzt (5.2.3.1).

Die Lipide werden dünnschichtchromatographisch analysiert (5.2.3.3).

6. Literaturverzeichnis

- Abernethy, J. L., Hill, R. L. und Goldsmith, L. A. (1977). epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links in human stratum corneum. *J Biol Chem* 252, 1837-1839.
- Alessandrini, F., Pfister, S., Kremmer, E., Gerber, J. K., Ring, J. und Behrendt, H. (2004). Alterations of glucosylceramide-beta-glucosidase levels in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 123, 1030-1036.
- Arbatsky, N. P., Derevitskaya, V. A., Zheltova, A. O., Kochetkov, N. K., Likhoshesterov, L. M., Senchenkova, S. N. und Yurtov, D. V. (1988). The carbohydrate chains of influenza virus hemagglutinin. *Carbohydr Res* 178, 165-181.
- Becker, H. G. O., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E., Faust, J., Fischer, M., Gentz, F., Gewalt, K., Gluch, R., Mayer, R., Müller, K., Pavel, D., Schmidt, H., Schollberg, K., Schwetlick, K., Seiler, E. und Zeppenfeld, G. (1996). *Organikum*. Heidelberg; Leipzig.
- Behne, M., Uchida, Y., Seki, T., de Montellano, P. O., Elias, P. M. und Holleran, W. M. (2000). Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* 114, 185-192.
- Bernardo, K., Hurwitz, R., Zenk, T., Desnick, R. J., Ferlinz, K., Schuchman, E. H. und Sandhoff, K. (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J Biol Chem* 270, 11098-11102.
- Bernardo, K., Krut, O., Wiegmann, K., Kreder, D., Micheli, M., Schafer, R., Sickman, A., Schmidt, W. E., Schroder, J. M., Meyer, H. E., Sandhoff, K. und Kronke, M. (2000). Purification and characterization of a magnesium-dependent neutral sphingomyelinase from bovine brain. *J Biol Chem* 275, 7641-7647.
- Bestmann, H. J., Stransky, W. und Vostrowsky, O. (1976). Reactions of alkylidene triphenylphosphoranes, XXXIII. Pheromones, VIII. Preparations of lithium salt-free ylide solutions with sodium bis(trimethylsilyl)amide as base. *Chemische Berichte* 109, 1694 - 16700.
- Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S. und Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res* 42, 1-36.
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. und Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 81, 253-263.
- Breiden, M. B. (2003). *Metabolische und morphologische Studien an differenzierenden Keratinozyten*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- CaJacob, C. A., Chan, W. K., Shephard, E. und Ortiz de Montellano, P. R. (1988). The catalytic site of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase. Protein versus prosthetic heme alkylation in the omega-hydroxylation of acetylenic fatty acids. *J Biol Chem* 263, 18640-18649.
- Candi, E., Melino, G., Mei, G., Tarcsa, E., Chung, S. I., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1995). Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* 270, 26382-26390.

6. Literaturverzeichnis

- Candi, E., Oddi, S., Terrinoni, A., Paradisi, A., Ranalli, M., Finazzi-Agro, A. und Melino, G. (2001). Transglutaminase 5 cross-links loricrin, involucrin, and small proline-rich proteins in vitro. *J Biol Chem* 276, 35014-35023.
- Candi, E., Tarcsa, E., Digiovanna, J. J., Compton, J. G., Elias, P. M., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1998). A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2067-2072.
- Candi, E., Tarcsa, E., Idler, W. W., Kartasova, T., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1999). Transglutaminase cross-linking properties of the small proline-rich 1 family of cornified cell envelope proteins. Integration with loricrin. *J Biol Chem* 274, 7226-7237.
- Champlaud, M. F., Burgeson, R. E., Jin, W., Baden, H. P. und Olson, P. F. (1998). cDNA cloning and characterization of sciellin, a LIM domain protein of the keratinocyte cornified envelope. *J Biol Chem* 273, 31547-31554.
- Cho, Y., Lew, B. L., Seong, K. und Kim, N. I. (2004). An inverse relationship between ceramide synthesis and clinical severity in patients with psoriasis. *J Korean Med Sci* 19, 859-863.
- Chuang, S. S., Helvig, C., Taimi, M., Ramshaw, H. A., Collop, A. H., Amad, M., White, J. A., Petkovich, M., Jones, G. und Korczak, B. (2004). CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J Biol Chem* 279, 6305-6314.
- Dierks, E. A., Zhang, Z., Johnson, E. F. und de Montellano, P. R. (1998). The catalytic site of cytochrome P450A11 (CYP4A11) and its L131F mutant. *J Biol Chem* 273, 23055-23061.
- Doering, T., Holleran, W. M., Potratz, A., Vielhaber, G., Elias, P. M., Suzuki, K. und Sandhoff, K. (1999a). Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem* 274, 11038-11045.
- Doering, T., Proia, R. L. und Sandhoff, K. (1999b). Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* 447, 167-170.
- Döring, T. (1999). Die Barriere der Haut - Der epidermale Stoffwechsel von Ceramid und Glucosylceramid. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Eckert, R. L. und Green, H. (1986). Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* 46, 583-589.
- Eckert, R. L., Stumliolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M. und Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 481-492.
- Elias, P. M., Cullander, C., Mauro, T., Rassner, U., Komuves, L., Brown, B. E. und Menon, G. K. (1998). The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3, 87-100.
- Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R. H. und Wohlrab, J. (2005). Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res* 296, 514-521.
- Folk, J. E. und Finlayson, J. S. (1977). The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem* 31, 1-133.
- Freinkel, R. K. und Traczyk, T. N. (1985). Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol* 85, 295-298.
- Fu, P. P. und Harvey, R. G. (1978). Dehydrogenation of polycyclic hydroaromatic compounds. *Chemical Reviews* 78, 317 - 361.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. und Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the

- mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156, 1099-1111.
- Gallala, H., Macheleidt, O., Doering, T., Schreiner, V. und Sandhoff, K. (2004). Nitric oxide regulates synthesis of gene products involved in keratinocyte differentiation and ceramide metabolism. *Eur J Cell Biol* 83, 667-679.
- Grayson, S., Johnson-Winegar, A. G., Wintroub, B. U., Isseroff, R. R., Epstein, E. H., Jr. und Elias, P. M. (1985). Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol* 85, 289-294.
- Hamanaka, S., Hara, M., Nishio, H., Otsuka, F., Suzuki, A. und Uchida, Y. (2002). Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol* 119, 416-423.
- He, L., Byun, H. S. und Bittmann, R. (2000). Stereoselective preparation of ceramide and its skeleton backbone modified analogues via cyclic thionocarbonate intermediates derived by catalytic asymmetric dihydroxylation of alpha, beta-unsaturated ester precursors. *J Org Chem* 65, 7627-7633.
- 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.
- Hohl, D., Mehrel, T., Lichti, U., Turner, M. L., Roop, D. R. und Steinert, P. M. (1991). Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem* 266, 6626-6636.
- Holleran, W. M. (1998). The formation and function of epidermal omega-hydroxy-ceramides: role of cytochrome P450-4A. Colloquium Teupitz.
- Holleran, W. M., Takagi, Y., Menon, G. K., Legler, G., Feingold, K. R. und Elias, P. M. (1993). Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest* 91, 1656-1664.
- Jarnik, M., de Viragh, P. A., Scharer, E., Bundman, D., Simon, M. N., Roop, D. R. und Steven, A. C. (2002). Quasi-normal cornified cell envelopes in loricrin knockout mice imply the existence of a loricrin backup system. *J Invest Dermatol* 118, 102-109.
- Jarnik, M., Kartasova, T., Steinert, P. M., Lichti, U. und Steven, A. C. (1996). Differential expression and cell envelope incorporation of small proline-rich protein 1 in different cornified epithelia. *J Cell Sci* 109 (Pt 6), 1381-1391.
- Jarnik, M., Simon, M. N. und Steven, A. C. (1998). Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J Cell Sci* 111 (Pt 8), 1051-1060.
- Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N., van Meer, G. und Wieland, F. (1992). Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* 117, 259-267.
- Jensen, P. J., Wu, Q., Janowitz, P., Ando, Y. und Schechter, N. M. (1995). Plasminogen activator inhibitor type 2: an intracellular keratinocyte differentiation product that is incorporated into the cornified envelope. *Exp Cell Res* 217, 65-71.
- Jones, A. J., Helmerhorst, E. und Stokes, G. B. (1983). The formation of dehydroalanine residues in alkali-treated insulin and oxidized glutathione. A nuclear-magnetic-resonance study. *Biochem J* 211, 499-502.
- Jung, E. G. (1995). Dermatologie. Stuttgart, Hippokrates Verlag.
- Kalinin, A., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (2001). Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 114, 3069-3070.
- Kalinin, A. E., Idler, W. W., Marekov, L. N., McPhie, P., Bowers, B., Steinert, P. M. und Steven, A. C. (2004). Co-assembly of envoplakin and periplakin into oligomers and Ca(2+)-dependent vesicle binding: implications for cornified cell envelope formation in stratified squamous epithelia. *J Biol Chem* 279, 22773-22780.

6. Literaturverzeichnis

- Kalinin, A. E., Kajava, A. V. und Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24, 789-800.
- Kartasova, T., Cornelissen, B. J., Belt, P. und van de Putte, P. (1987). Effects of UV, 4-NQO and TPA on gene expression in cultured human epidermal keratinocytes. *Nucleic Acids Res* 15, 5945-5962.
- Kartasova, T. und van de Putte, P. (1988). Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol* 8, 2195-2203.
- Kawakami, T., Kamo, M., Takamoto, K., Miyazaki, K., Chow, L. P., Ueno, Y. und Tsugita, A. (1997). Bond-specific chemical cleavages of peptides and proteins with perfluoric acid vapors: novel peptide bond cleavages of glycyl-threonine, the amino side of serine residues and the carboxyl side of aspartic acid residues. *J Biochem (Tokyo)* 121, 68-76.
- Kee, S. H. und Steinert, P. M. (2001). Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin. *Mol Biol Cell* 12, 1983-1993.
- Kirfel, J., Magin, T. M. und Reichelt, J. (2003). Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci* 60, 56-71.
- 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.
- Krieg, P., Schuppler, M., Koesters, R., Mincheva, A., Lichter, P. und Marks, F. (1997). Repetin (Rptn), a new member of the "fused gene" subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 43, 339-348.
- Kvedar, J. C., Manabe, M., Phillips, S. B., Ross, B. S. und Baden, H. P. (1992). Characterization of sciellin, a precursor to the cornified envelope of human keratinocytes. *Differentiation* 49, 195-204.
- Lampe, M. A., Burlingame, A. L., Whitney, J., Williams, M. L., Brown, B. E., Roitman, E. und Elias, P. M. (1983). Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 24, 120-130.
- Landmann, L. (1986). Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J Invest Dermatol* 87, 202-209.
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. und Franke, W. W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol* 81, 419-435.
- Lansmann, S., Ferlinz, K., Hurwitz, R., Bartelsen, O., Glombitza, G. und Sandhoff, K. (1996). Purification of acid sphingomyelinase from human placenta: characterization and N-terminal sequence. *FEBS Lett* 399, 227-231.
- Lavker, R. M. (1976). Membrane coating granules: the fate of the discharged lamellae. *J Ultrastruct Res* 55, 79-86.
- Lee, S. C., Kim, I. G., Marekov, L. N., O'Keefe, E. J., Parry, D. A. und Steinert, P. M. (1993). The structure of human trichohyalin. Potential multiple roles as a functional EF-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *J Biol Chem* 268, 12164-12176.
- Leyvraz, C., Charles, R. P., Rubera, I., Guitard, M., Rotman, S., Breiden, B., Sandhoff, K. und Hummler, E. (2005). The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAP1/Prss8. *J Cell Biol* 170, 487-496.

- Linke, T., Wilkening, G., Lansmann, S., Moczall, H., Bartelsen, O., Weisgerber, J. und Sandhoff, K. (2001). Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem* 382, 283-290.
- Macheleidt, O., Kaiser, H. W. und Sandhoff, K. (2002). Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 119, 166-173.
- Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1998). Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 273, 17763-17770.
- Marshall, D., Hardman, M. J., Nield, K. M. und Byrne, C. (2001). Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13031-13036.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M. und et al. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* 61, 1103-1112.
- Montagna, W., Kligman, A.M., and Carlisle, K.S. (1992). Atlas of Normal Human Skin. New York, Springer-Verlag.
- Morita, K. und Miyachi, Y. (2003). Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci* 31, 81-89.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S. und Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* 1182, 147-151.
- Nakanishi, T., Sato, T., Sakoda, S., Yoshioka, M. und Shimizu, A. (2004). Modification of cysteine residue in transthyretin and a synthetic peptide: analyses by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1698, 45-53.
- Nemes, Z., Marekov, L. N., Fesus, L. und Steinert, P. M. (1999a). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8402-8407.
- Nemes, Z., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1999b). Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity. *J Biol Chem* 274, 11013-11021.
- Nemes, Z. und Steinert, P. M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31, 5-19.
- O'Keefe, E., Battin, T. und Payne, R., Jr. (1982). Epidermal growth factor receptor in human epidermal cells: direct demonstration in cultured cells. *J Invest Dermatol* 78, 482-487.
- Ortiz de Montellano, P. R. und Reich, N. O. (1984). Specific inactivation of hepatic fatty acid hydroxylases by acetylenic fatty acids. *J Biol Chem* 259, 4136-4141.
- Plattner, H. und Hentschel, J. (1997). Taschenlehrbuch Zellbiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Ponec, M., Weerheim, A., Lankhorst, P. und Wertz, P. (2003). New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 120, 581-588.
- Raith, K., Zellmer, S., Lasch, J. und Neubert, R. H. (2000). Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 418, 167-173.
- Reichelt, J., Doering, T., Schnetz, E., Fartasch, M., Sandhoff, K. und Magin, T. M. (1999). Normal ultrastructure, but altered stratum corneum lipid and protein composition in a mouse model for epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol* 113, 329-334.
- Reist, E. J. und Christie, P. H. (1970). Synthesis of D-dihydrosphingosine. *J Org Chem* 35, 3521 - 3524.
- Rheinwald, J. G. und Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343.

6. Literaturverzeichnis

- Rice, R. H. und Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* 11, 417-422.
- Rice, R. H. und Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* 18, 681-694.
- Robinson, N. A., Lopic, S., Welter, J. F. und Eckert, R. L. (1997). S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, small proline-rich proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 272, 12035-12046.
- Robson, K. J., Stewart, M. E., Michelsen, S., Lazo, N. D. und Downing, D. T. (1994). 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* 35, 2060-2068.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Parry, D. A. und Watt, F. M. (1997). Periplakin, a novel component of cornified envelopes and desmosomes that belongs to the plakin family and forms complexes with envoplakin. *J Cell Biol* 139, 1835-1849.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Simon, M., Dooley, T. P. und Watt, F. M. (1996). Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *J Cell Biol* 134, 715-729.
- Sawatzki, P., Damm, I., Pierstorff, B., Hupfer, H., Sandhoff, K. und Kolter, T. (2005). Site-specific cleavage--a model system for the identification of lipid-modified glutamate residues in proteins. *ChemBioChem* 6, 178-185.
- Schreiner, V., Gooris, G. S., Pfeiffer, S., Lanzendorfer, G., Wenck, H., Diembeck, W., Proksch, E. und Bouwstra, J. (2000). Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* 114, 654-660.
- Schuette, C. G. (1999). Strukturuntersuchungen an beta-Hexosaminidase B und GM2-Aktivatorprotein durch proteinchemische Methoden und MALDI-Massenspektrometrie. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Schuette, C. G., Doering, T., Kolter, T. und Sandhoff, K. (1999). The glycosphingolipidoses--from disease to basic principles of metabolism. *Biol Chem* 380, 759-766.
- Signorelli, P. und Hannun, Y. A. (2002). Analysis and quantitation of ceramide. *Methods Enzymol* 345, 275-294.
- Silverman, R. B. (1995). Radical thoughts about the life of MAO. *Prog Brain Res* 106, 23-31.
- 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.
- Smith, W. N. und Beumel Jr., O. F. (1974). Preparation of Alkynes and Dialkynes by Reaction of Monohalo- and Dihaloalkanes with Lithium Acetylide-Ethylendiamine Complex. *Synthesis* 6, 441 - 442.
- Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. und Dawson, J. H. (1996). Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* 96, 2841-2888.
- Steinert, P. M. (1995). A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified envelope. *Cell Death Differ* 2, 33-40.
- Steinert, P. M., Kartasova, T. und Marekov, L. N. (1998). Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. *J Biol Chem* 273, 11758-11769.
- Steinert, P. M. und Marekov, L. N. (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 270, 17702-17711.

- Steinert, P. M. und Marekov, L. N. (1997). Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *J Biol Chem* 272, 2021-2030.
- Steinert, P. M. und Marekov, L. N. (1999). Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol Biol Cell* 10, 4247-4261.
- Steinert, P. M., Parry, D. A. und Marekov, L. N. (2003). Trichohyalin mechanically strengthens the hair follicle: multiple cross-bridging roles in the inner root sheath. *J Biol Chem* 278, 41409-41419.
- Steven, A. C. und Steinert, P. M. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 693-700.
- Stewart, M. E. und Downing, D. T. (1999). A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* 40, 1434-1439.
- Stewart, M. E. und Downing, D. T. (2001). The omega-hydroxyceramides of pig epidermis are attached to corneocytes solely through omega-hydroxyl groups. *J Lipid Res* 42, 1105-1110.
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P. W., Madison, K. C. und Downing, D. T. (1987). Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* 88, 709-713.
- Takagi, Y., Nakagawa, H., Kondo, H., Takema, Y. und Imokawa, G. (2004). Decreased levels of covalently bound ceramide are associated with ultraviolet B-induced perturbation of the skin barrier. *J Invest Dermatol* 123, 1102-1109.
- Tarcsa, E., Candi, E., Kartasova, T., Idler, W. W., Marekov, L. N. und Steinert, P. M. (1998). Structural and transglutaminase substrate properties of the small proline-rich 2 family of cornified cell envelope proteins. *J Biol Chem* 273, 23297-23303.
- Tarcsa, E., Kedei, N., Thomazy, V. und Fesus, L. (1992). An involucrin-like protein in hepatocytes serves as a substrate for tissue transglutaminase during apoptosis. *J Biol Chem* 267, 25648-25651.
- Tarcsa, E., Marekov, L. N., Andreoli, J., Idler, W. W., Candi, E., Chung, S. I. und Steinert, P. M. (1997). The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J Biol Chem* 272, 27893-27901.
- Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S. und Zambotti, V. (1973). A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 296, 160-170.
- Uchida, Y., Hara, M., Nishio, H., Sidransky, E., Inoue, S., Otsuka, F., Suzuki, A., Elias, P. M., Holleran, W. M. und Hamanaka, S. (2000). Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* 41, 2071-2082.
- Voet, D. und Voet, J. G. (1994). Biochemie. Weinheim, VCH.
- Walsh, K. A. und Wilcox, P. E. (1970). Methods in Enzymology. G. Perlmann und L. Lorand. New York, San Francisco, London, Academic Press. 19.
- Watt, F. M. und Green, H. (1981). Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J Cell Biol* 90, 738-742.
- Weerheim, A. und Ponec, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res* 293, 191-199.
- Wertz, P. W. und Downing, D. T. (1983). Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* 24, 759-765.
- Wertz, P. W. und Downing, D. T. (1987). Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 917, 108-111.
- Wertz, P. W., Madison, K. C. und Downing, D. T. (1989). Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 92, 109-111.

6. Literaturverzeichnis

- 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.**
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Madison, K. C. und Downing, D. T. (1987). Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol* 89, 419-425.**
- 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.**
- Williams, M. A. und McCluer, R. H. (1980). The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem* 35, 266-269.**