

Humane saure Ceramidase
Baculovirus-Expression, Prozessierung, Reinigung,
Charakterisierung und Strukturanalyse mittels MALDI-TOF-
und ESI-Massenspektrometrie

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Heike Schulze
aus Berlin

Bonn 2007

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

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert. Erscheinungsjahr 2007

- | | |
|--------------|-------------------------------|
| 1. Referent: | Prof. Dr. Konrad Sandhoff |
| 2. Referent: | Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter |
| 3. Referent: | Prof. Dr. Siegfried Waldvogel |
| 4. Referent: | Prof. Dr. Heinz Bönisch |

Datum der Promotion: 29.8.2007

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgender Publikation enthalten:

Schulze H, Schepers U, Sandhoff K (2007) Overexpression and mass spectrometry analysis of mature human acid ceramidase. *Biol. Chem.* in Druck

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Arbeiten haben außerdem zu folgenden Publikationen beigetragen:

Kölzer M, Arenz C, Ferlinz K, Werth N, Schulze H, Sandhoff K. (2003) Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate is a potent and selective Inhibitor of Acid Sphingomyelinase. *Biol Chem* **384**, 1293-8.

He X, Okino N, Dhami R, Dagan A, Gatt S, Schulze H, Sandhoff K, Schuchman EH. (2003) Purification and Characterization of Recombinant, Human Acid Ceramidase: Catalytic Reactions and Interactions with Acid Sphingomyelinase. *J Biol Chem* **278**, 32978-86

Schulze H, Michel C, van Echten-Deckert G. (2000) Dihydroceramid Desaturase. *Methods Enzymol.* **311**, 22-30.

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Prof. Dr. Siegfried Waldvogel und Prof. Dr. Heinz Bönisch haben sich bereit erklärt, zusammen mit Prof. Dr. Konrad Sandhoff und Priv. Doz. Dr. Thomas Kolter die Promotionskommission zu bilden. Dafür sei Ihnen herzlich gedankt.

Christine Königs danke ich für die exzellente technische Unterstützung bei der Expression der sauren Ceramidase.

Heike Hupfer und Dr. Jörg Hörnschemeyer danke ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Massenspektrometrie.

Susanne Brodesser und Dr. Bernadette Breiden danke ich für die fachliche Unterstützung und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danken.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft haben das Forschungsprojekt im Rahmen des Graduiertenkollegs 246, des SFB 400 und des SFB 645 finanziell großzügig gefördert.

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	Absorptionseinheit
BCA	Bicinchoninsäure, 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin
BEVS	Baculovirus Expression Vector System
BSA	Bovine Serum Albumin
CHO	Chinese Hamster Ovary Zellen
Con A	Concanavalin A
cpm	Counts per minute
CV	Säulenvolumen
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fuc	Fucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
[³ H]	Tritium
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin G
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
Man	Mannose
MS	Massenspektrometrie
NaAc	Natriumacetat
NP-40	Nonidet P-40
OG	Octyl-β-D-glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PNGase F	Peptid-N-Glycanase F
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SAP	Sphingolipid-Aktivatorprotein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrose Faktor
TOF	Time of Flight
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Aminosäure-Symbole

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Inhalt	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Biosynthese der Sphingolipide	1
1.2 Ceramid in Signaltransduktionsprozessen	2
1.3 Lysosomaler Abbau der Sphingolipide	4
1.4 Farbersche Krankheit	6
1.5 Humane saure Ceramidase	7
1.6 MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie	10
1.6.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	11
1.6.2 ESI-Massenspektrometrie	12
1.6.3 Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie	13
2 Zielsetzung	14
3 Ergebnisse	15
3.1 Expression humaner saurer Ceramidase in Insektenzellen und Prozessierung zum reifen Enzym	15
3.2 Reinigung der rekombinanten sauren Ceramidase	18
3.3 Kristallisationsexperimente	23
3.4 Reinigung der sauren Ceramidase aus humaner Plazenta	24
3.5 Bestimmung der posttranslationalen Modifikationen der sauren Ceramidase	26
3.5.1 Glykosylierung der rekombinanten sauren Ceramidase	29
3.5.1.1 Glykosylierung an Asn152	31
3.5.1.2 Glykosylierung an Asn174	32
3.5.1.3 Glykosylierung an Asn238	32
3.5.1.4 Glykosylierung an Asn265	33
3.5.1.5 Glykosylierung an Asn321	34
3.5.1.6 Glykosylierung an Asn327	35
3.5.2 Disulfidverknüpfung der rekombinanten sauren Ceramidase	36
3.5.2.1 Disulfidverknüpfung von C10 und C319	38
3.5.2.2 Disulfidverknüpfung von C122 und C271	40
3.5.2.3 Disulfidverknüpfung von C367 und C371	41
3.6 Untersuchungen zum aktiven Zentrum des Enzyms	42
3.6.1 Photoaffinitätsmarkierung der sauren Ceramidase	42
3.6.2 Markierung der sauren Ceramidase mit N-Bromacetylsphingosin	46
4 Diskussion	51
4.1 Expression humaner saurer Ceramidase in Insektenzellen, Prozessierung und Reinigung des reifen Enzyms	51
4.2 Reinigung humaner saurer Ceramidase aus Plazenta	52

4.3 Posttranslationale Modifikationen der sauren Ceramidase	52
4.4 Untersuchungen zum aktiven Zentrum des Enzyms	56
4.4.1 Photoaffinitätsmarkierung	56
4.4.2 Markierung der sauren Ceramidase mit N-Bromacetylspingosin	57
5 Zusammenfassung	59
6 Material und Methoden	61
6.1 Material	61
6.1.1 Geräte	61
6.1.2 Säulenmaterialien	62
6.1.3 Chromatographie-Säulen	62
6.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	62
6.2 Methoden	64
6.2.1 Expression rekombinanter saurer Ceramidase in Insektenzellen	64
6.2.1.1 Medium für die Insektenzellkultur	64
6.2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen	64
6.2.1.3 Bestimmung des Virustiters durch <i>Plaque assay</i>	65
6.2.1.4 Amplifikation der Viren	65
6.2.1.5 Proteinexpression und Prozessierung des Proteins	66
6.2.2 Reinigung rekombinanter saurer Ceramidase aus dem Expressionsüberstand	66
6.2.2.1 Tangentialflussfiltration	66
6.2.2.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose	66
6.2.2.3 Chromatographie an Octyl-Sepharose	67
6.2.3 Reinigung saurer Ceramidase aus Plazenta	67
6.2.3.1 Homogenisation und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	67
6.2.3.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose	68
6.2.3.3 Chromatographie an Octyl-Sepharose	68
6.2.3.4 Farbstoffligandenchromatographie an Matrex Gel Red A	68
6.2.3.5 Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DMAE-650	69
6.2.4 Proteinanalytik	69
6.2.4.1 Enzymaktivitätsmessung	69
6.2.4.1.1 Messung der Aktivität der sauren Ceramidase im mizellaren Testsystem	69
6.2.4.1.2 Messung der Aktivität der sauren Ceramidase im liposomalen Testsystem	70
6.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	71
6.2.4.3 Detektion von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen durch Coomassie-Färbung	72
6.2.4.4 Detektion von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen durch Silber-Färbung	72
6.2.4.5 Immunochemischer Nachweis der sauren Ceramidase (Western-Blotting)	72
6.2.4.6 Proteinquantifizierung mit BCA-Reagenz	73
6.2.4.7 Proteinspaltung	74
6.2.4.7.1 Tryptischer Verdau	74
6.2.4.7.2 Alkylierung der sauren Ceramidase	74
6.2.4.7.3 Chymotryptischer Verdau	74
6.2.4.8 Trennung der Peptide	74
6.2.4.9 Reduktion und Alkylierung der Peptide, Reduktion des Proteins	75
6.2.4.10 Deglykosylierung	75
6.2.4.11 Isolierung der Glykane der sauren Ceramidase	75
6.2.5 Markierungsexperimente	75
6.2.5.1 Photoaffinitätsmarkierung	75

6.2.5.2 Affinitätsmarkierung mit BAS	76
6.2.6 Massenspektrometrie	77
6.2.6.1 MALDI-MS	77
6.2.6.2 ESI-MS	77
7 Anhang	79
7.1 <i>reversed phase</i> -HPLC Chromatogramm der Peptide tryptisch verdauter rekombinanter saurer Ceramidase	79
7.2 MALDI-MS eines tryptischen Verdaus der rekombinanten sauren Ceramidase	80
7.3 MALDI-MS eines chymotryptischen Verdaus der rekombinanten sauren Ceramidase	81
8 Literatur	82

1 Einleitung

1.1 Funktion und Biosynthese der Sphingolipide

Die Membranen eukaryontischer Zellen bestehen aus Lipiddoppelschichten mit integrierten und assoziierten Proteinen (Abb. 1.1). Die Hauptlipide eukaryontischer Plasmamembranen sind Phospholipide, Glykolipide und Cholesterol. Nach dem *Fluid-Mosaik-Modell* befinden sich die Membranbestandteile in einer flexiblen und dynamischen Anordnung, d.h. sie können sich innerhalb der Membranebene lateral bewegen (Singer und Nicolson, 1972). Die rasche transversale Diffusion von einer Seite der Doppelschicht zur anderen ist nur wenigen Lipiden, z.B. dem Cholesterol, spontan möglich. Dies ist einer der Gründe, für den asymmetrischen Aufbau biologischer Membranen (Bretscher, 1973).

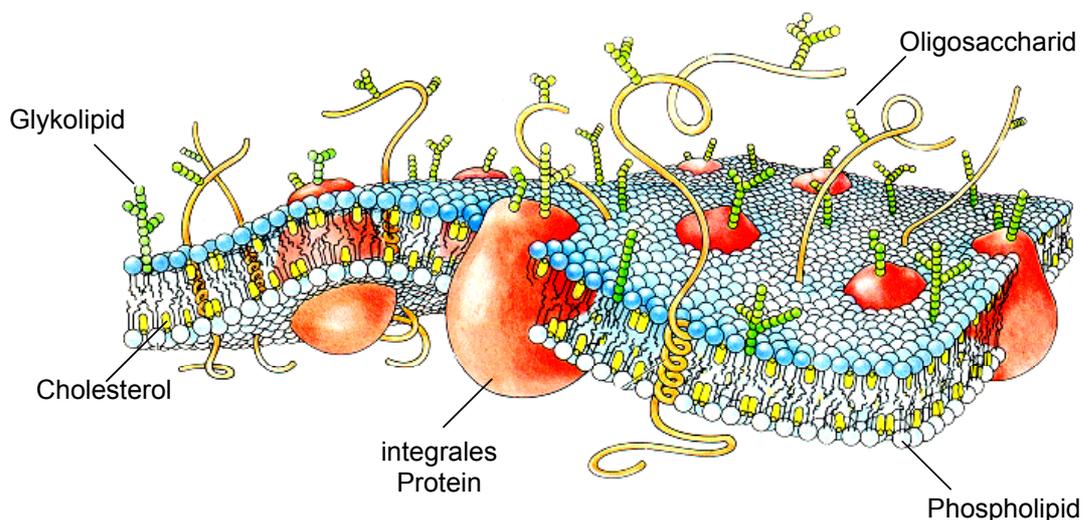


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer Plasmamembran (Voet, 1990). Integrale Proteine sind in die Membran eingebettet. Cholesterol (gelb) interferiert mit den Fettsäureketten der Phospholipide (blau), die eine Doppelschicht bilden. Die Kohlenhydratanteile der Glykolipide und Glykoproteine (grüne Perlenketten) befinden sich auf der äußeren Seite der Plasmamembran.

Charakteristische Bestandteile der extrazellulären Seite eukaryontischer Plasmamembranen sind Sphingolipide und die daraus abgeleiteten komplexen Glykosphingolipide (Gillard et al., 1993). Dort sind sie vermutlich nicht zufällig angeordnet, sondern bilden zusammen mit Cholesterol Mikrodomänen innerhalb der Zellmembran, die auch als *Lipid Rafts* bezeichnet werden (Simons und Ikonen, 1997; Anderson, 1998). In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, die die Beobachtung der Wechselwirkungen von Molekülen innerhalb von Membrandomänen unter nativen Bedingungen ermöglichen. Neben Messungen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers handelt es sich dabei vor allem um die *Single fluorophore tracking*-Mikroskopie und das *Single particle tracking*. Je nach angewandter

Untersuchungsmethode wurde dabei für die Mikrodomänen ein Durchmesser von 25 – 100 nm und eine Lebensdauer von 1 - 17 ms ermittelt (Murase et al., 2004; Kenworthy et al., 2000; Schütz et al., 2000).

Glykosphingolipide bestehen aus einem hydrophoben Ceramidrest, der sie in der Membran verankert, und einer in den Extrazellulärraum ragenden Oligosaccharid-Kopfgruppe. Die Glykosphingolipide zeigen ein zelltypspezifisches Muster auf der Zelloberfläche, das sich bei Zelldifferenzierung, viraler Transformation und Onkogenese verändert (Markwell et al., 1981; Zeller und Marchase, 1992). Zusammen mit Glykoproteinen und Glycosaminoglykanen bilden die Oligosaccharid-Kopfgruppen der Sphingolipide die Glykokalix eukaryontischer Zellen (Frey et al., 1996). Glykosphingolipide sind darüber hinaus an der Zell-Zell-Erkennung beteiligt und dienen als Bindungsstellen für Bakterien, Viren und Toxine (Holmgren et al., 1980; Karlsson, 1989). Langkettige Ceramide mit unterschiedlichen Hydroxylierungsmustern kommen in der Haut vor, wo sie eine wichtige Bedeutung für die epidermale Barrierefunktion haben (Bouwstra et al., 2003).

Die Biosynthese der Sphingolipide beginnt auf der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums mit der von der Serin-Palmitoyl-Transferase katalysierten Kondensation von L-Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Keto-Sphingarin (Mandon et al., 1992). Nach Reduktion zu *D-erythro*-Sphingarin entsteht durch Acylierung der Aminogruppe Dihydroceramid. Diese Reaktion wird von Ceramid-Synthasen katalysiert, die von *Lass*-Genen (*longevity assurance*-Genen) codiert werden (Pewzner-Jung et al., 2006). Dihydroceramid wird anschließend von der Dihydroceramid-Desaturase zum Ceramid oxidiert (Rother et al., 1992; Michel et al., 1997). Ceramid kann dann auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparats an der primären OH-Gruppe zum Glucosylceramid glukosyliert werden. Nach Translokation des Glucosylceramids auf die luminal Seite der Golgimembran entstehen die komplexen Glykosphingolipide durch die von Glykosyltransferasen katalysierte sequentielle Übertragung von Zuckereinheiten (Schwarzmann und Sandhoff, 1990). Durch vesikulären Membranfluss gelangen die Sphingolipide und Glykosphingolipide anschließend zur Plasmamembran.

1.2 Ceramid in Signaltransduktionsprozessen

In der Plasmamembran kommt Ceramid hauptsächlich als Bestandteil von Sphingomyelin und als das hydrophobe Aglykon vor, mit dem Glykosphingolipide in der Lipidschicht verankert werden. Freies Ceramid kann aber auch innerhalb von Membranen aus Sphingomyelin freigesetzt werden und ist, wie sein Abbauprodukt Sphingosin und die Phosphorylierungsprodukte Ceramid-1-phosphat und Sphingosin-1-phosphat, ein biologisch aktives Molekül, das bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle spielt. In vielen Zelltypen lösen Ceramid und Sphingosin-1-phosphat

entgegengesetzte Effekte aus. Ceramid bewirkt einen Stop des Zellzyklus, Zellalterung, sowie die Einleitung der Apoptose (Übersicht in Bektas und Spiegel, 2004). Inkubiert man Zellen mit membrangängigen Ceramid-Analoga, so wird die Zellproliferation inhibiert und der programmierte Zelltod induziert (Hannun, 1996; Kolesnick und Kronke, 1998). Sphingosin-1-phosphat vermittelt dagegen vorwiegend gegenteilige Effekte wie Proliferation (Olivera und Spiegel, 1993). Außerdem besitzt Sphingosin-1-phosphat einen protektiven Effekt bei der durch Zytokine bzw. Ceramid vermittelten Apoptose (Cuvillier et al., 1996). Das an Signaltransduktionsprozessen beteiligte Ceramid wird entweder durch *de novo* Synthese gebildet oder entsteht aus Sphingomyelin (Abb. 1.2), das vor allem in der äußeren Schicht der Plasmamembran vorkommt. Intralysosomal freigesetztes Ceramid scheint nicht an Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein (Tohyama et al., 1999).

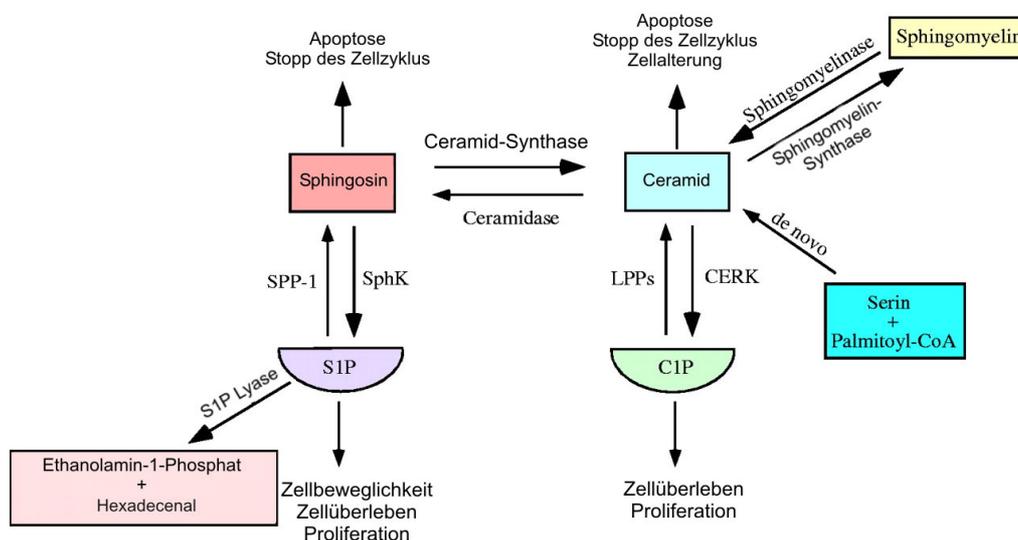


Abb. 1.2: Stoffwechsel der bioaktiven Sphingolipide (modifiziert nach Chalfant und Spiegel, 2005). Das Schema zeigt den Stoffwechsel von Ceramid bei Signaltransduktionsprozessen von der Biosynthese an. S1P: Sphingosin-1-phosphat; C1P: Ceramid-1-phosphat; LPPs: Lipid-Phosphat-Phosphatasen; SPP-1: Sphingosin-1-phosphat-Phosphatase 1; CERK: Ceramid-Kinase; SphK: Sphingosin-Kinase.

Aus membrangebundenem Sphingomyelin wird von Sphingomyelinasen mit einem pH-Optimum im neutralen, sauren oder alkalischen Bereich Ceramid freigesetzt. Diese Sphingomyelinasen können bei Schädigung der Zelle z.B. durch Bestrahlung, DNA-schädigende Agenzien oder Behandlung mit pro-apoptotischen Liganden, wie Tumor Nekrose Faktor α , aktiviert werden (Dressler et al., 1992). Wie das entstandene Ceramid auf molekularer Ebene wirkt, ist bisher noch unklar. So kann es beispielsweise Membraneigenschaften ändern oder möglicherweise die Aktivität von Bindungsproteinen wie durch Ceramid aktivierbare Proteinkinasen (PKC ζ), oder einer Protein-Phosphatase (CAPP)

regulieren (Kolesnick und Hemer, 1990; O'Reilly, 1992; Müller et al., 1995; Hannun, 1996; van Blitterswijk et al., 2003). Phosphorylierung von Ceramid durch die Ceramid-Kinase CERK führt zu dem ebenfalls als Signalmolekül bedeutsamen Ceramid-1-phosphat (Dressler und Kolesnick, 1990). Studien mit embryonalen Stammzellen haben gezeigt, dass Ceramid durch Wechselwirkung mit PKC ζ oder λ Einfluss auf die Morphogenese des primitiven Ektoderms hat (Krishnamurthy et al., 2007). Ceramid kann aber auch zu Sphingosin hydrolysiert werden. Der *Platelet derived growth factor* kann dann beispielsweise die Phosphorylierung des Sphingosins aktivieren, was zur Bildung des mitogenen Botenstoffes Sphingosin-1-phosphat führt (Olivera et al., 1993).

In Signaltransduktionsprozessen erfolgt die Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin nicht unter Katalyse der lysosomalen sauren Ceramidase, sondern durch Ceramidasen mit einem pH-Optimum im neutralen oder alkalischen Bereich. Diese Ceramidasen sind in der Plasmamembran und in den Mitochondrien lokalisiert (El Bawab et al., 2000; Hwang et al., 2005; Tani et al., 2005). Sie werden von anderen Genen codiert als die saure Ceramidase und zeigen weder in ihrer Sequenz, noch in ihrer Struktur eine Ähnlichkeit zu dem lysosomalen Enzym (Tani et al., 2000).

1.3 Lysosomaler Abbau der Sphingolipide

Der Abbau der Glykosphingolipide erfolgt in den sauren Kompartimenten der Zelle, in den späten Endosomen und Lysosomen (Zeller und Marchase, 1992; Sandhoff und Kolter, 2003) (Abb. 1.3).

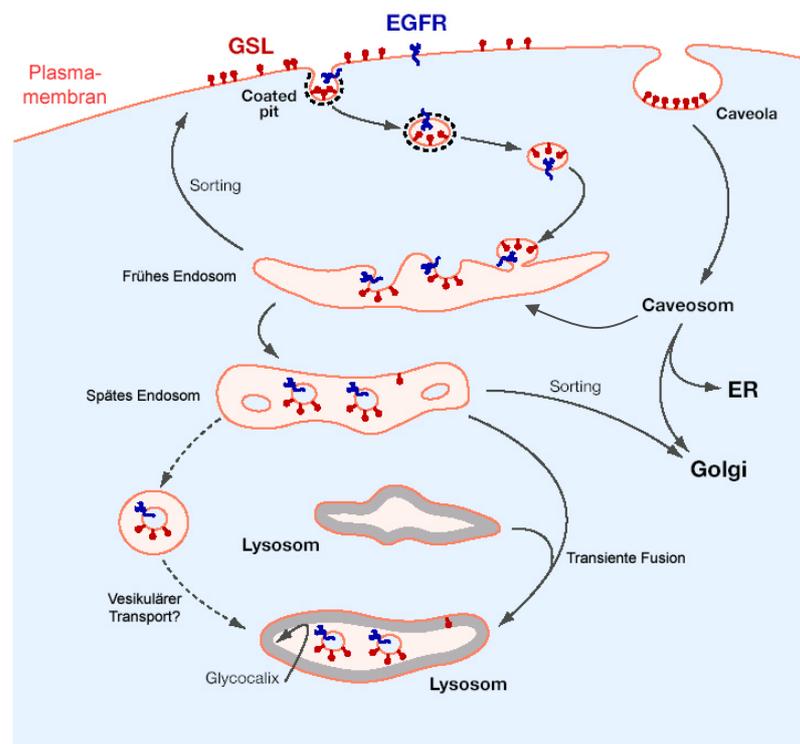


Abb. 1.3: Modell der Endozytose und des lysosomalen Abbaus von Membranen (Kolter und Sandhoff, 2005). GSL: Glykosphingolipide, EGFR: *epidermal growth factor receptor*

Glykosphingolipid-haltige Bereiche der Plasmamembran werden durch vesikulären Membranfluss über *Coated pits* oder *Caveolae* internalisiert und verschmelzen mit frühen Endosomen. Dem in Abb. 1.3 gezeigten Modell zufolge knospen Teile der limitierenden Membran des frühen Endosoms in das Innere des Organells ab (Fürst und Sandhoff, 1992). Die Glykosphingolipide, die sich zuvor auf der Innenseite dieser Membran befunden haben, sind jetzt auf der Außenseite intra-endosomaler und -lysosomaler Vesikel lokalisiert. Der Katabolismus der Sphingolipide findet an diesen intralysosomalen Strukturen statt. Die das Lysosomen begrenzende Membran wird auf der Innenseite durch eine Glykokalix vor Selbstabbau geschützt.

Der Abbau der Glykosphingolipide erfolgt durch spezifische Exohydrolasen, die die terminalen Zuckerreste sequentiell abspalten (Abb. 1.4).

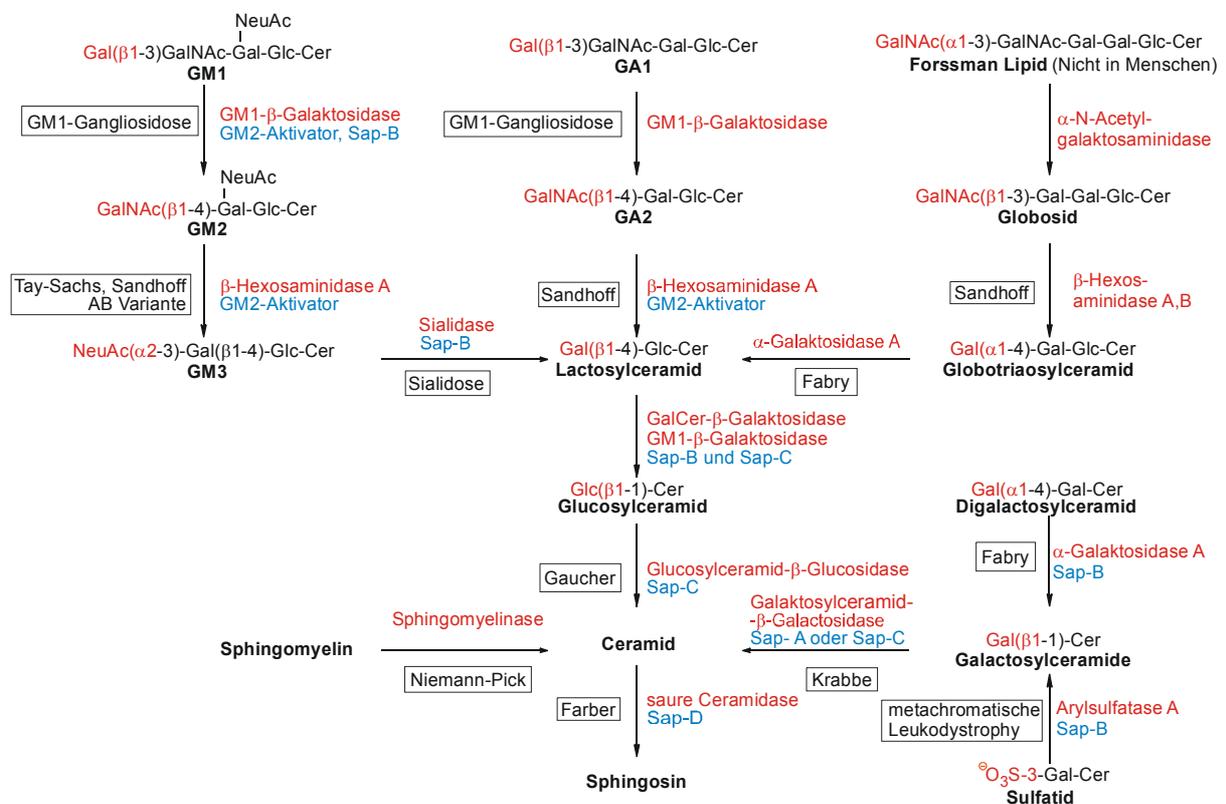


Abb. 1.4: Lysosomaler Sphingolipidkatabolismus (modifiziert nach Kolter und Sandhoff, 1998). Die beteiligten Hydrolasen und die abzuspaltenden Reste sind rot, Aktivatorproteine blau dargestellt. Die Namen der bei Abwesenheit der jeweiligen Hydrolasen oder Aktivatorproteine auftretenden Sphingolipidspeicherkrankheiten (Sphingolipidosen) sind eingrahmt.

Für die Hydrolyse von Glykosphingolipiden mit kurzen hydrophilen Kopfgruppen benötigen die Hydrolasen kleine, nichtenzymatische Proteine als Kofaktoren, die Sphingolipidaktivatorproteine (Fürst und Sandhoff, 1992). Sie ermöglichen den

hydrolytischen Abbau, z.B. indem sie das membranständige Glykosphingolipid ein wenig aus der Membran herausheben und es so dem wasserlöslichen Enzym zugänglich machen. Es gibt fünf Sphingolipidaktivatorproteine, die Saposine Sap-A, -B, -C und -D und das GM2-Aktivatorprotein. Die Saps-A bis -D entstehen durch Proteolyse des gemeinsamen Vorläufers Prosaposin. Die Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin und freier Fettsäure benötigt die Anwesenheit von Sap-D. Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* stimuliert Sap-D den Abbau von Ceramid nach einem noch unbekanntem Mechanismus (Klein et al., 1994). Sap-D defiziente Mäuse speichern Ceramide mit hydroxylierten Fettsäureketten im Gehirn und in den Nieren (Matsuda et al., 2004). *In vitro* ermöglichen auch Sap-C und Sap-A in Anwesenheit anionischer Phospholipide den Ceramidabbau (Ferlinz et al., 2001; Übersicht in Kolter und Sandhoff, 2005).

Sphingolipidaktivatorproteine können darüberhinaus auch Lipide oder Glykolipide aus der inneren lysosomalen Membran herauslösen und zu CD1-Proteinen an der Perimetermembran transportieren. Die Lipid-beladenen CD1-Proteine gelangen zur Plasmamembran und aktivieren dort Lipid-Antigen spezifische T-Lymphozyten (Kolter und Sandhoff, 2005).

Krankheiten, die auf einem ererbten Defekt in einem anabolen Enzym des Sphingolipid-Stoffwechsels beruhen, waren lange Zeit unbekannt. Mittlerweile wurden aber Mutationen im Gen der Serin-Palmitoyl-Transferase beschrieben, die zu einer reduzierten Aktivität des Eingangsenzyms der Sphingolipid-Biosynthese führen (Bejaoui et al., 2002). Desweiteren ist eine seltene Form der Epilepsie bekannt, die auf einer Mutation im Gen der GM3-Synthase beruht (Simpson et al., 2004). Defekte in einem katabolen Enzym oder Aktivatorprotein führen zur Akkumulation des entsprechenden Glykosphingolipids. Solche Sphingolipidosen sind für nahezu jeden Abbauschritt bekannt. Ebenso wie die Monosaccharide und die Sialinsäure, können auch Sphingosin und Fettsäuren nach Abbau der Sphingolipide das Lysosomen verlassen. Sie werden anschließend entweder erneut in der Biosynthese eingesetzt oder weiter abgebaut und im Energiestoffwechsel genutzt.

1.4 Farbersche Krankheit

Defekte im Gen der sauren Ceramidase führen zur Farberschen Krankheit, einer erstmals 1952 von Sidney Farber beschriebenen Sphingolipidose, bei der es zu einer massiven Speicherung von Ceramid in den Lysosomen kommt (Farber, 1952; Moser et al., 2001). Diese autosomal rezessiv vererbte Krankheit ist selten, bisher wurden ca. 100 Fälle beschrieben. Die Krankheit manifestiert sich im allgemeinen innerhalb der ersten Lebensmonate mit einer charakteristischen Kombination von Symptomen. Die Patienten leiden unter subkutanen lipidhaltigen Knoten, schmerzhaften Schwellungen der Gelenke und fortschreitender Heiserkeit. Bei schwer erkrankten Patienten können auch andere Organe

wie Lunge, Herz, Nieren oder das Nervensystem betroffen sein. Die Farbersche Krankheit wird in sieben Subtypen unterteilt. Die Subtypen unterscheiden sich in der Schwere des Krankheitsverlaufs und dem Alter der Patienten beim Auftreten der ersten Symptome. Bei den Subtypen 1-6 liegen Mutationen im Gen der sauren Ceramidase vor (Koch et al., 1996; Bär et al., 2001).

Ein Sonderfall ist Typ 7 der Farberschen Krankheit, der auch Sphingolipidaktivatorprotein-Defizienz genannt wird. Hier liegt kein Defekt im Gen des Enzyms vor, sondern eine Mutation im Gen des gemeinsamen Vorläufers der Saposine, die zur Abwesenheit der Saps-A bis -D führt (Schnabel et al., 1992; Bradova et al., 1993; Hulkova et al., 2001).

Für die Farbersche Krankheit wurde ein Mausmodell entwickelt (Li et al., 2002). Die Ausschaltung des *asah1* Gens, des sauren Ceramidase-Gens in Mäusen, führt bei heterozygoten Tieren, bei denen die saure Ceramidase-Aktivität vermindert ist, zur Speicherung von Ceramid in verschiedenen Geweben. Die vollständige Abwesenheit der sauren Ceramidase führt bereits im Zwei-Zell Stadium der Embryonalentwicklung zu Apoptose (Eliyahu et al., 2007).

1.5 Humane saure Ceramidase

Die saure Ceramidase (*N*-Acetylsphingosinamidohydrolase, EC 3.5.1.23) katalysiert die Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin und freier Fettsäure (Abb. 1.5).

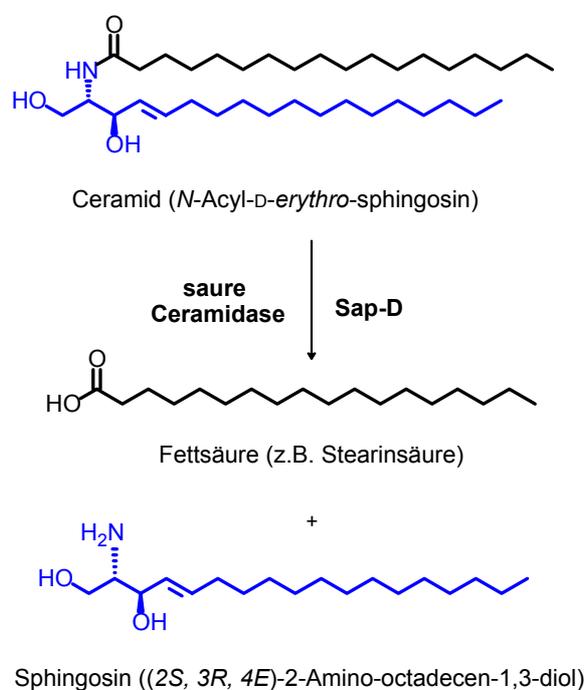


Abb. 1.5: Die saure Ceramidase katalysiert die Hydrolyse der Amidbindung im Ceramid in Gegenwart des Sphingolipidaktivatorproteins Sap-D.

Das Enzym wurde erstmals 1963 von Gatt beschrieben und 1995 aus menschlichem Urin gereinigt und charakterisiert (Gatt, 1963; Bernardo et al., 1995). Mikrosequenzierung von 117 Aminosäuren der gereinigten sauren Ceramidase ermöglichte die Isolierung der vollständigen cDNA mit einer Länge von 1205 Bp. Die cDNA enthält einen offenen Leserahmen von 1185 Bp und codiert für 395 Aminosäuren (Koch et al., 1996). Das Gen der humanen sauren Ceramidase wurde der chromosomalen Region 8p21.3/22 zugeordnet, umfasst 30 kB und besteht aus 14 Exons (Li et al., 1999). Die humane saure Ceramidase ist ein heterodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten. Die α -Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 13 kDa, die β -Untereinheit von 40 kDa. Die beiden Untereinheiten entstehen durch Spaltung eines Vorläufer-Proteins und sind im reifen Enzym über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden (Abb. 1.6).

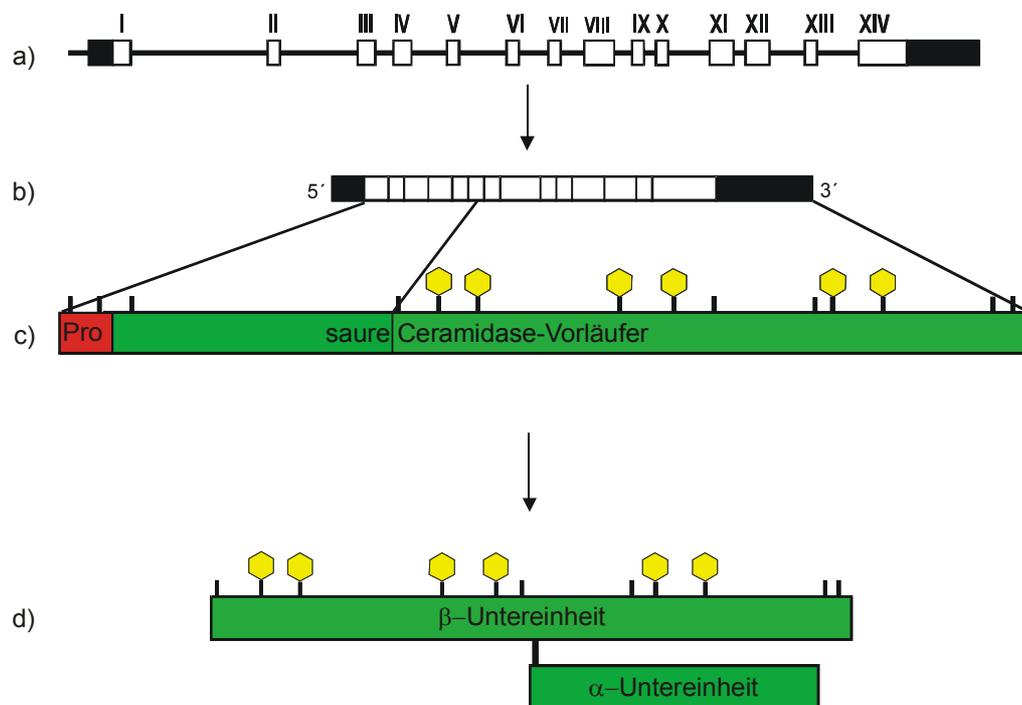


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der humanen sauren Ceramidase (Bär et al., 2001).

a) Genomische Struktur, b) c-DNA, c) Vorläufer-Protein (Pro: Signalsequenz), d) reifes Protein. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind als Sechsecke dargestellt, Cystein-Reste als schwarze Striche

Die Biosynthese der humanen sauren Ceramidase beginnt im rauhen Endoplasmatischen Retikulum mit der Bildung eines Vorläufer-Polypeptids mit einem Molekulargewicht von 55 bzw. 53 kDa. In *Pulse-Chase*-Experimenten mit humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass der 53 kDa-Vorläufer durch einen frühen Prozessierungsschritt aus dem 55 kDa Protein hervorgeht. Der Transport des Enzyms ins Lysosomen erfolgt vermutlich über den Mannose-

6-phosphat Rezeptor. Proteolytische Spaltung des 53 kDa-Vorläufer-Proteins führt zu den beiden Untereinheiten der aktiven Form der sauren Ceramidase (Ferlinz et al., 2001).

Das Enzym hat im Vergleich zu anderen Enzymen des Sphingolipid-Stoffwechsels eine geringe spezifische Aktivität. Die aus humanem Gewebe gereinigte saure Sphingomyelinase z.B. hat eine spezifische Aktivität von 1000 $\mu\text{mol/h mg}$ (Lansmann et al., 1996). Die saure Ceramidase dagegen nur von ca. 0,5 $\mu\text{mol/h mg}$ (Linke et al., 2000). Ausgehend von den Ergebnissen der Reinigung aus humaner Plazenta, enthalten Lysosomen aber ca. 100 mal mehr saure Ceramidase als saure Sphingomyelinase (Lansmann et al., 1996; Linke et al., 2000). Die Spaltung von Ceramid durch die saure Ceramidase erfolgt bei einem pH-Optimum von 4,0 (Ferlinz et al., 2001). Bei einem pH-Wert von 5,5 katalysiert das Enzym dagegen die Synthese von Ceramid (Okino et al., 2003).

Die β -Untereinheit der sauren Ceramidase verfügt über sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr), von denen die ersten fünf in COS-Zellen glykosyliert vorliegen. Die sechste potentielle N-Glykosylierungsstelle wird nicht besetzt. Die Entfernung der N-Glykosylierungsstellen eins, drei und fünf, vom N-Terminus aus betrachtet, verhindert die Spaltung der Vorläufer-Form in das reife, enzymatisch aktive Protein. Deglykosylierung mit PNGaseF reduziert das Molekulargewicht der β -Untereinheit auf ca. 29 kDa. Die α -Untereinheit enthält keine N-Glykosylierungsstelle und verändert dementsprechend ihr Molekulargewicht nicht (Ferlinz et al., 2001).

Die humane saure Ceramidase gehört möglicherweise zur Familie der Ntn-Hydrolasen (N-terminales Nucleophil). Dabei handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen unterschiedlicher Größe, Komplexität und Substratspezifität. Auch die Aminosäuresequenz variiert zum Teil erheblich (Oinonen und Rouvinen, 2000).

Den Mitgliedern dieser Gruppe ist gemeinsam, dass sie Amidbindungen spalten und aus inaktiven Vorläufern autokatalytisch zum aktiven Enzym prozessiert werden (Guan et al., 1996; Seemüller et al., 1996; Tikkanen et al., 1996). Alle Ntn-Hydrolasen verfügen N-terminal über ein Nucleophil (einen Cystein-, Serin- oder Threonin-Rest), das einen Teil ihres katalytisch aktives Zentrum darstellt. Die Strukturen einiger Ntn-Hydrolasen, z.B. der Penicillin G-Acylase und der Penicillin V-Acylase (Abb. 1.7) konnten aufgeklärt werden (Duggleby et al., 1995; Suresh et al., 1999). Alle bisher untersuchten Ntn-Hydrolasen haben eine sogenannte $\alpha\beta\beta\alpha$ -Core-Struktur mit zwei zentralen β -Faltblättern zwischen α -Helices (Brannigan et al., 1995).

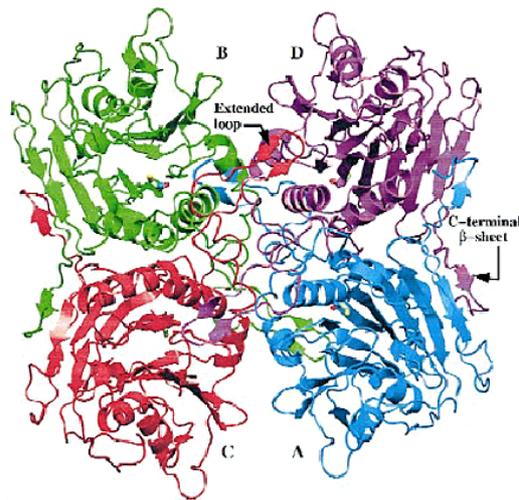


Abb. 1.7: Bändermodell der Penicillin V-Acylase (Suresh et al., 1999). Das Enzym liegt als Homotetramer aus zwei Dimeren (A und B, C und D) vor. In jedem Monomer werden zwei zentrale antiparallele β -Faltblätter von zwei α -Helices eingerahmt, so dass sich die für die Ntn-Hydrolasen charakteristische $\alpha\beta\beta\alpha$ -Struktur ergibt.

Ob die saure Ceramidase ebenfalls über diese Strukturmerkmale verfügt, ist nicht bekannt. Außerdem konnte bisher weder das katalytisch aktive Zentrum der sauren Ceramidase identifiziert, noch der Mechanismus der Spaltung des Vorläufers aufgeklärt werden.

1.6 MALDI-TOF- und ESI-Massenspektrometrie

Massenspektrometrie ist die Bestimmung der Molekülmasse freier gasförmiger Ionen im Hochvakuum. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, in der ein gasförmiger Ionenstrahl erzeugt wird, einem Massenanalysator, in dem der Ionenstrahl hinsichtlich des Masse/Ladung-Quotienten aufgetrennt wird und einem Detektor, mit dem bestimmt wird, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet werden (Abb. 1.8). Die Massenspektrometrie wurde zunächst nur bei relativ kleinen organischen Verbindungen, z.B. bei der Produktanalyse in der erdölverarbeitenden Industrie eingesetzt. Die Überführung großer, polarer und thermisch labiler Biomoleküle, wie z.B. Proteine, in einen gasförmigen und ionisierten Zustand war zunächst nicht ohne Fragmentierung der Moleküle möglich. In der Bioanalytik fand die Massenspektrometrie daher erst Anwendung, nachdem vor ca. 20 Jahren die schonenden Methoden Elektrospray-Ionisation (ESI) und Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (MALDI) etabliert wurden.

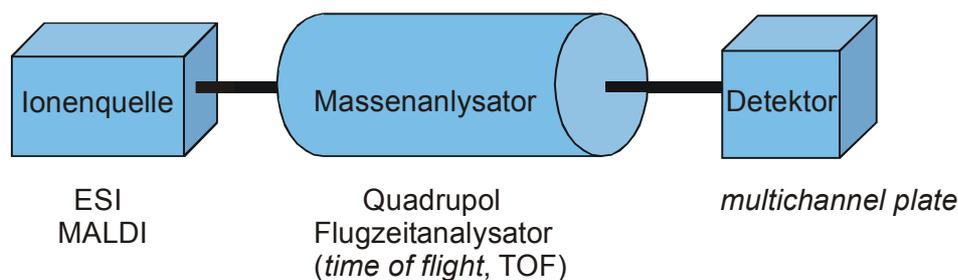


Abb. 1.8: Allgemeiner Aufbau eines Massenspektrometers. Als Beispiel sind die bei der ESI- und MALDI-Massenspektrometrie eingesetzten Komponenten angegeben (verändert nach Lottspeich, 1998).

1.6.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-Massenspektrometrie wurde von Michael Karas und Franz Hillenkamp in Frankfurt und Münster entwickelt (Karas et al., 1987). Das Ionisierungsprinzip beruht auf einer Kokristallisation des Analyten mit großem Überschuss einer Matrix. Als Matrixsubstanzen werden kleine organische Moleküle, oft aromatische Säuren, gewählt, die in der Lage sind, Energie der verwendeten Laserwellenlänge zu absorbieren. Die nach einem kurzen Laserimpuls zunächst in den Matrixmolekülen gespeicherte Energie relaxiert in das Kristallgitter, was bei der Verdampfung der Matrix zu einer explosionsartigen Teilchenablösung an der Oberfläche des Kristalls führt. Der Ionisierungsmechanismus selbst ist noch nicht vollständig bekannt. Vermutet wird ein Protonentransfer von photoionisierten, radikalischen Matrixmolekülen auf elektrisch geladene Probenmoleküle.

Die geladenen, gasförmigen Analytenmoleküle werden dann an einem Gitter, an dem eine elektrische Spannung anliegt, gesammelt und in ihrer Position und kinetischen Energie angeglichen. Einige Sekunden nach dem Laserimpuls wird die Spannung am Gitter um die *Pulse Voltage* herabgesetzt, die Ionen werden in das elektrische Feld beschleunigt und einem Massenanalysator zugeführt. Durch diese verzögerte Ionenextraktion (*Delayed Extraction*) wird die Startgeschwindigkeitsverteilung für Ionen gleicher Masse reduziert und die Massengenauigkeit und Massenauflösung verbessert. Häufig werden bei der MALDI-Massenspektrometrie Flugzeitmassenanalysatoren (*time of flight*, TOF) verwendet. Bei MALDI-TOF-Massenspektrometern werden die Ionen durch einen gepulsten Laserstrahl erzeugt, in der Quelle durch das elektrostatische Feld beschleunigt und durchlaufen dann eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse/Ladungs-Quotienten aufgetrennt werden. Gemessen wird die Flugzeit der Ionen zwischen Quelle und Detektor. Die Massenauflösung von Flugzeitmassenspektrometern lässt sich durch Reflektoren steigern. Dabei schließt sich der Driftstrecke ein elektrisches Gegenfeld an, in das die Ionen unterschiedlich tief eindringen, an. Nach der Richtungsumkehr im Reflektor werden die Ionen zurückbeschleunigt und Ionen gleicher Masse aber unterschiedlicher Startenergie gleichzeitig detektiert (Abb. 1.9).

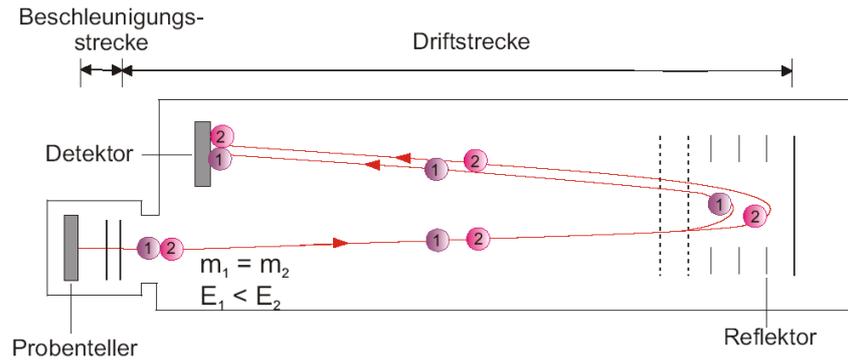


Abb. 1.9: Prinzip eines Reflektormassenspektrometers (Lottspeich, 1998)

1.6.2 ESI-Massenspektrometrie

Bei der ESI-Massenspektrometrie wird der Analyt gelöst und die Lösung mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes in viele kleine Tröpfchen dispergiert. Bei diesem Elektrospray-Prozess kommt es zur definierten Ionisation und zur kompletten Desolvatation, d.h. zum Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase (Abb. 1.10).

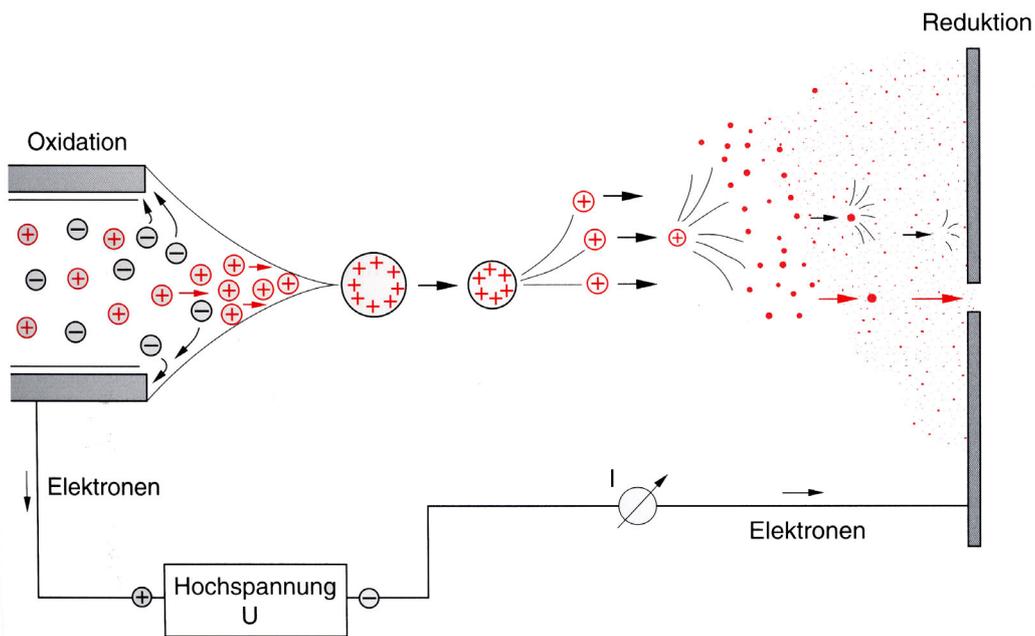


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des mikroskopischen ESI-Prozesses (Lottspeich, 1998). Der gelöste Analyt wird durch eine vergoldete Glaskapillare, die als Anode dient, versprüht. Es kommt zum spontanen Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosion) und zur Desolvatation beim Transfer in das Massenspektrometer.

Die Ionisation findet bei Atmosphärendruck statt. Die Ionen werden dann durch eine spezielle Schnittstelle (*Interface*) dem Massenanalysator, in dem Hochvakuum herrscht, zugeführt. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Q-TOF2-Massenspektrometer

erfolgt die Massenanalyse zunächst durch ein Quadrupolmassenspektrometer. Die Ionen gelangen danach in eine Hexapol-Kollisionszelle, in der der Analyt für MS/MS-Messungen durch Zusammenstöße mit Argonatomen fragmentiert werden kann. Die Fragmente werden dann in einem orthogonal zum Quadrupol angeordneten Flugzeitmassenspektrometer analysiert.

1.6.3 Sequenzierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie

Bei Kollisionsaktivierung von Peptiden wird bevorzugt die Bindung zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff gespalten. Verbleibt bei der Spaltung die Ladung am N-terminalen Fragment, werden die Ionen der a-, b- und c-Serie detektiert. Verbleibt die Ladung jedoch am C-terminalen Ende, so werden die Fragmente als x-, y- und z-Ionen bezeichnet (Roepstorff und Fohlman, 1984) (Abb. 1.11).

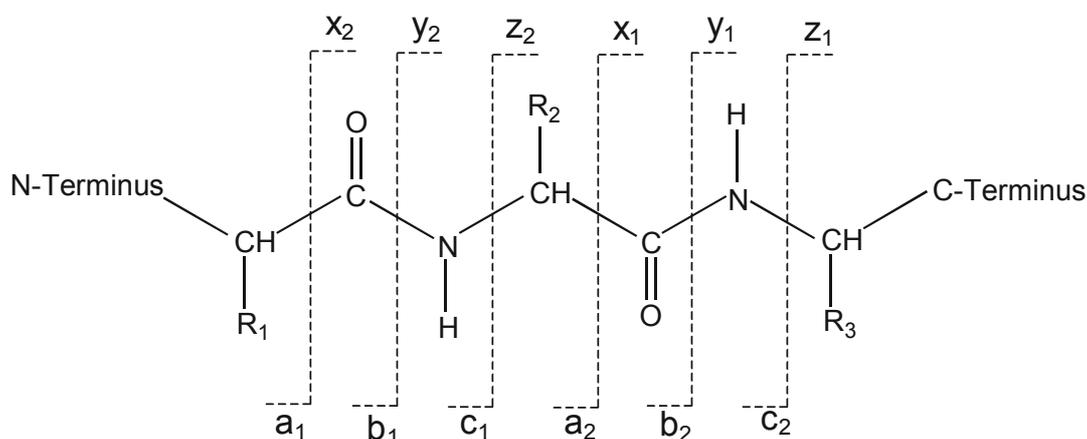


Abb. 1.11: Mögliche Bruchstellen bei der Fragmentierung von Peptiden.

Da bevorzugt die Peptidbindung gespalten wird, erhält man häufig Ionen der b- und der y-Serie. Die Anzahl der in dem Fragment-Ion enthaltenen Aminosäurereste wird durch einen Index am Ion angegeben. So können theoretisch in der b-Ionenserie die Ionen b₁ bis b_{n-1} (n = Anzahl der Aminosäuren des Mutterions) detektiert werden.

2 Zielsetzung

Die saure Ceramidase katalysiert den letzten Schritt des lysosomalen Abbaus aller Sphingolipide, die Spaltung von Ceramid zu Sphingosin und Fettsäure. Trotz dieser zentralen Stellung im Sphingolipid-Stoffwechsel sind bisher mit Ausnahme der Aminosäuresequenz nur wenige Strukturmerkmale des Enzyms bekannt. Frühere Expressionen der sauren Ceramidase mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems führten zu einem Gemisch aus Vorläufer-Protein und reifem Enzym (Bartelsen, 1999). Vorläufer und prozessiertes Enzym können unter nativen Bedingungen nicht voneinander getrennt werden. Da für die Röntgenstrukturanalyse aber eine Präparation benötigt wird, die ausschliesslich reife Form enthält, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems eine Methode zu etablieren, grosse Mengen des reifen, prozessierten Enzyms herzustellen und effektiv zu reinigen. Die posttranslationalen Modifikationen des Enzyms, wie N-Glykosylierung und Disulfid-Verbrückung, sollten aufgeklärt werden, und, soweit bekannt, mit dem aus Plazenta gereinigten Enzym verglichen werden. Die Kenntnis der Strukturparameter ist für eine weitergehende strukturelle Charakterisierung der sauren Ceramidase durch *molecular modelling* essentiell und für eine zukünftige Röntgenstrukturanalyse des Proteins äußerst hilfreich.

Darüber hinaus sollte das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms untersucht werden. Dazu sollten ein Photoaffinitätsligand und ein Bromacetylderivat auf ihre Eignung zur kovalenten Markierung von Aminosäureresten im enzymatisch aktive Zentrum der sauren Ceramidase untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression humaner saurer Ceramidase in Insektenzellen und Prozessierung zum reifen Enzym

Strukturuntersuchungen an Proteinen, wie z. B. Röntgenstruktorexperimente erfordern Präparate hoher Reinheit in relativ großer Menge (im Milligrammbereich). Die humane saure Ceramidase wurde bisher aus dem Urin von Peritonitis-Patienten und aus menschlicher Plazenta zur Homogenität gereinigt (Bernardo et al., 1995). Jedoch ist humanes Gewebe nicht immer verfügbar und die Ausbeute an saurer Ceramidase ist gering. Außerdem kann eine Koaufräumung von Saposinen, die die strukturellen Untersuchungen erschweren, nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde die Expression rekombinanter humaner Ceramidase im Baculovirus-Expressionsvektorsystem (BEVS) angestrebt. Das BEVS ist ein eukaryontisches Expressionssystem zur Darstellung posttranslational modifizierter Proteine. Baculoviren sind insektenpathogene Viren mit doppelsträngiger, zikulär-geschlossener DNA. Als Vektor wurde das Genom des *Autographa californica multiply embedded nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) verwendet, in dem das nicht-essentielle Polyhedrin-Gen durch die cDNA des Zielproteins ersetzt wurde. Die Transkription des heterologen Gens steht unter der Kontrolle des starken viralen Polyhedrin-Promotors. Das BVES wurde bereits für andere Proteine des Sphingolipid-Stoffwechsels erfolgreich angewendet (Bartelsen et al., 1998; Wendeler et al., 2003). Die cDNA der humanen sauren Ceramidase wurde stromabwärts des Polyhedrin-Promotors in das Baculovirus-Transferplasmid pAcMP3 inseriert. Daraus wurden rekombinante Baculoviren durch Kotransfektion von *Sf*-21 Zellen nach der BaculoGold-Methode hergestellt (Bartelsen, 1999). Bei der Expression der humanen sauren Ceramidase in *Sf*-21 Zellen mit Hilfe dieser Baculoviren wurde aber, neben der reifen, prozessierten Form des Enzyms, auch der Vorläufer im Medium nachgewiesen. Der Anteil des Vorläufers betrug bis zu 50% der Gesamtmenge des exprimierten Proteins (Bartelsen, 1999). Im Baculovirus-Expressionssystem wird ein großer Teil der rekombinanten sauren Ceramidase nicht ins Lysosomen transportiert und dort prozessiert, sondern direkt ins Kulturmedium sekretiert. Unter nativen Bedingungen unterscheiden sich Vorläuferprotein und prozessierte Form in ihren biophysikalischen Eigenschaften kaum. Eine Trennung der beiden Formen ist während der Reinigung nur unter denaturierenden, die Enzymaktivität zerstörenden Bedingungen möglich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, präparative Mengen homogener, reifer saurer Ceramidase herzustellen.

Die hier beschriebene Expression der sauren Ceramidase erfolgte in *Sf*-9 Zellen. Auf die häufig dem Zellkulturmedium zugesetzten 5-10% fötalem Kälberserum wurde vollständig verzichtet. Fötale Kälberserum erschwert aufgrund des hohen Proteingehalts die Reinigung. Die Zellen müssen vor der Infektion sukzessive an serumfreies Medium adaptiert werden.

3 Ergebnisse

Die durchgehend in serumfreiem Medium kultivierten Zellen zeigten innerhalb von 40 Passagen keine Veränderung hinsichtlich Wachstum und Infizierbarkeit. Die präparative Expression der sauren Ceramidase erfolgte in Schüttelkolben in Suspensionskultur. Im Vergleich zu adhärennten Kulturen werden die Zellen in Suspensionskultur gleichmässiger mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Infektion erfolgte bei einer Zelldichte von 2,3 Mio Zellen/ml mit einer *Multiplicity of Infection* von 5 plaque forming units/Zelle. Es wurden verschiedene Passagen der von Bartelsen hergestellten und oben beschriebenen Baculoviren verwendet. Nach 5 Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Expressionüberstand abgetrennt und so die Expression beendet. Ein Vergleich der sauren Ceramidase-Expression in Sf-21 und Sf-9 Zellen ergab identische Ausbeuten.

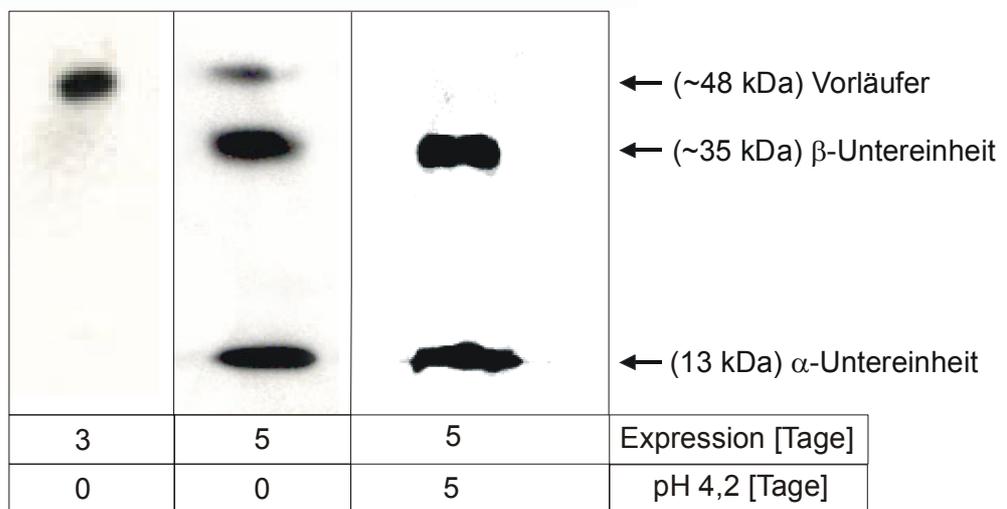


Abb. 3.1: Western Blot-Analyse der Expression der sauren Ceramidase in Insektenzellen. Aufgetragen wurden jeweils 200 μ l Expressionsüberstand, der auf 20 μ l konzentriert wurde. In dem Gel unter reduzierenden Bedingungen wird die reife Form der sauren Ceramidase in α - und β -Untereinheit aufgetrennt. Nach 3 Tagen Expression (linke Bahn) ist nur Vorläufer nachweisbar, nach 5 Tagen auch reife Form, aufgetrennt in α - und β -Untereinheit (mittlere Bahn). Wird die Expression nach 5 Tagen gestoppt und der Überstand angesäuert, so ist nach 5 Tagen bei 37°C ausschliesslich prozessierte Form detektierbar (rechte Bahn).

Drei Tage nach Infektion der Zellen ist bei der immunochemischen Analyse des Expressionsüberstands nur das Vorläufer-Protein der sauren Ceramidase nachweisbar (Abb. 3.1, linke Bahn). Nach 5 Tagen Expression ist sowohl der Vorläufer als auch reifes Enzym, bestehend aus α - und β -Untereinheit, im Expressionsüberstand vorhanden (Abb. 3.1, mittlere Bahn). In einem SDS-PAGE-Gel unter reduzierenden Bedingungen wurde die reife Form des Enzyms in die beiden Untereinheiten aufgetrennt. Der Vorläufer des Enzyms, der aus einem durchgehenden Peptidfaden besteht, ändert sein Molekulargewicht

durch Reduktion nur wenig. Die in Insektenzellen hergestellte humane saure Ceramidase ist ca. 5 kDa kleiner als das aus humaner Plazenta aufgereinigte Enzym. Dieser Unterschied kommt ausschliesslich durch eine weniger stark glykosylierte β -Untereinheit des rekombinanten Enzyms zustande. Die Größe der α -Untereinheit entspricht mit 13 kD der des plazentalen Enzyms.

Der zellfreie Expressionsüberstand wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,2-4,3 eingestellt und für fünf Tage bei 37°C inkubiert. Danach konnten durch immunochemische Analyse nur noch zwei Banden bei 35 und 13 kDa detektiert werden. Diese Banden entsprechen der α - und der β -Untereinheit der prozessierten sauren Ceramidase. Das 48 kDa Vorläufer-Protein war dagegen nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.1, rechte Bahn).

Auch wenn der Mechanismus noch nicht bekannt ist, so handelt es sich tatsächlich um eine Prozessierung und nicht um einen unspezifischen proteolytischen Abbau des Vorläufer-Proteins. Um dies zu belegen, wurde die Expression nach 3 Tagen beendet. Zu diesem Zeitpunkt ist ausschliesslich Vorläufer-Protein im Überstand nachweisbar (Abb. 3.2, linke Bahn). Nach Ansäuerung des Überstandes und Inkubation für 5 Tage bei 37°C, verschwand die Vorläufer-Bande und die vorher nicht detektierbaren Banden von α - und β -Untereinheit des reifen Enzyms waren nachweisbar (Abb. 3.2, rechte Bahn).

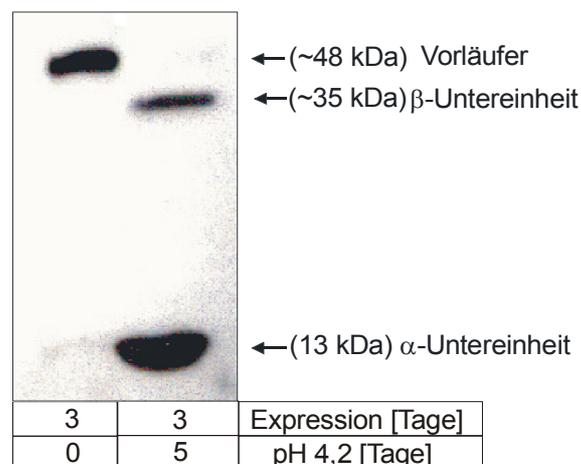


Abb. 3.2: Nach 3 Tagen Expression ist in der Western Blot Analyse des Expressionsüberstandes nur Vorläufer-Protein nachweisbar (linke Bahn). Säuert man diesen Expressionsüberstand auf pH 4,2 an und inkubiert den zellfreien Überstand 5 Tage bei 37°C verschwindet der Vorläufer und nur die α - und β -Untereinheit der prozessierten Form sind nachweisbar (rechte Bahn).

3.2 Reinigung der rekombinanten sauren Ceramidase

Die humane saure Ceramidase wurde in Anlehnung an das Reinigungsschema von Bernardo aus dem serumfreien Expressionsüberstand gereinigt (Bernardo et al., 1995).

Im angesäuerten Expressionsüberstand liegt das Protein stark verdünnt in einem großen Volumen bei einem pH-Wert von 4,2 – 4,3 vor. Häufig wird am Anfang einer Proteinreinigung eine Ammoniumsulfatfällung zur Abtrennung von Fremdproteinen, bzw. zur Konzentrierung des Zielproteins, durchgeführt. Dies ist hier nicht möglich, da dem Zellkulturmedium der Scherkräftminderer Pluronic F68 zugesetzt ist. Pluronic F68 erhöht die Dichte des Mediums so stark, dass das Protein nach Ammoniumsulfatzugabe nicht präzipitiert, sondern aufschwimmt. Dabei besteht die Gefahr, dass es an der Grenzfläche denaturiert. Im ersten Reinigungsschritt wurde daher eine Tangentialflussfiltration mit einem Vivaflow 200 Filter durchgeführt. Das Medium wurde dabei auf ca. $\frac{1}{5}$ - $\frac{1}{10}$ seines Ausgangsvolumens konzentriert und gegen Con A-Waschpuffer REK (30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 200 mM NaCl) ausgetauscht. Das Retenat der Tangentialflussfiltration wurde einer Lektinaffinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose unterzogen. Concanavalin A ist ein Lektin aus der Schwertbohne, das strukturbildende Mangan- und Calcium-Ionen enthält und bevorzugt Mannosereste bindet. Bei einem neutralen pH-Wert lagert es sich zu einem Tetramer zusammen. Im sauren pH-Bereich zerfällt es zu einem Dimer. Optimale Bindungseigenschaften hat Concanavalin bei pH 7. Der pH-Wert des Auftrags mußte daher neutral sein und das Concanavalin A-Säulenmaterial mit Mangan- und Calcium-Ionen haltigem Puffer regeneriert sein. Unspezifisch gebundenes Protein wurde durch Spülen mit dem Con A-Waschpuffer REK entfernt. Die gebundenen Glykoproteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0-15 % Methyl- α -D-mannopyranosid im Con A-Waschpuffer REK eluiert. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch die Messung der UV-Absorption bei 220 nm verfolgt.

Alle glykoproteinhaltigen Fraktionen der Concanavalin A-Chromatographie wurden vereinigt und einer hydrophoben Interaktionschromatographie auf einer Octylsepharose-Säule unterzogen. Hydrophile Proteine binden nicht an das Säulenmaterial und wurden durch Waschen mit Octylsepharose-Waschpuffer REK (30 mM Tris/HCl pH 7, 100 mM NaCl) entfernt. Die saure Ceramidase wurde bei einer Detergenzkonzentration von 1% Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) in Waschpuffer durch kompetitive Verdrängung von der Säule eluiert. Eine SDS-PAGE Analyse zeigte, dass in nur drei Reinigungsschritten nahezu reine saure Ceramidase gewonnen wurde. Tabelle 1 zeigt die Bilanz der einzelnen Anreicherungs-schritte der Reinigung von rekombinanter saurer Ceramidase aus dem Zellkulturüberstand.

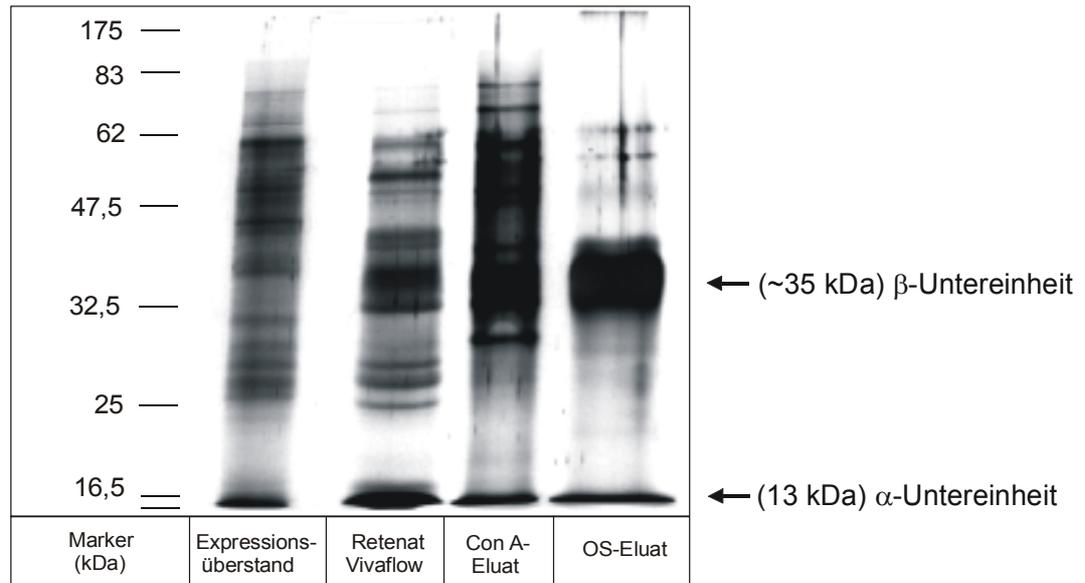


Abb. 3.3: SDS-PAGE-Gel der verschiedenen Reinigungsschritte der rekombinanten sauren Ceramidase. Pro Bahn wurden 3 μg Protein aufgetragen und die Proteine durch Silberfärbung visualisiert. Con A: Concanavalin A, OS: Octylsepharose.

Reinigungs-schritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	Gesamt-aktivität [nmolh^{-1}]	spezifische Aktivität [$\text{nmolh}^{-1}\text{mg}^{-1}$]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Expressions-überstand	2000	2190,0	n.b.	n.b.	-	-
Vivaflow-Retenat	200	488,0	2293,6	4,7	100	1
Con A-Eluat	36	18,7	1832,6	98,0	80,0	20,9
OS-Eluat	16	2,4	732,6	305,3	31,9	64,9

Tabelle 1: Bilanz der Anreicherungsschritte einer typischen Reinigung rekombinanter humaner saurer Ceramidase aus dem Expressionsüberstand. n.b.: nicht bestimmt, da sich im Zellkulturmedium der Insektenzellen Stoffe befinden, die den Aktivitätstest der sauren Ceramidase stören. Die Aktivität der sauren Ceramidase wurde im mizellaren Testsystem bestimmt.

Die kinetischen Parameter der rekombinanten sauren Ceramidase wurden sowohl im mizellaren Testsystem unter Zusatz von Detergenz, als auch in einem liposomalen System, in Gegenwart von Sap-D bestimmt. Die Messung des Ceramids-Abbaus bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ergab für beide Systeme eine Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.4). Die spezifische Ceramidase-Aktivität und die Substratkonzentration wurden doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk dargestellt (Lineweaver, 1934). Die Werte für

3 Ergebnisse

K_M und V_{max} wurden durch lineare Regression ermittelt. Für das mizellare Testsystem wurden ein K_M -Wert von $58 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $0,45 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ erhalten. Im Vergleich dazu wurden für das liposomale System ein K_M -Wert von $200 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $1,4 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Für das aus Plazenta gereinigte Protein wurde im mizellaren Testsystem ein K_M -Wert von $30 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $1,04 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ermittelt (Linke, 2000).

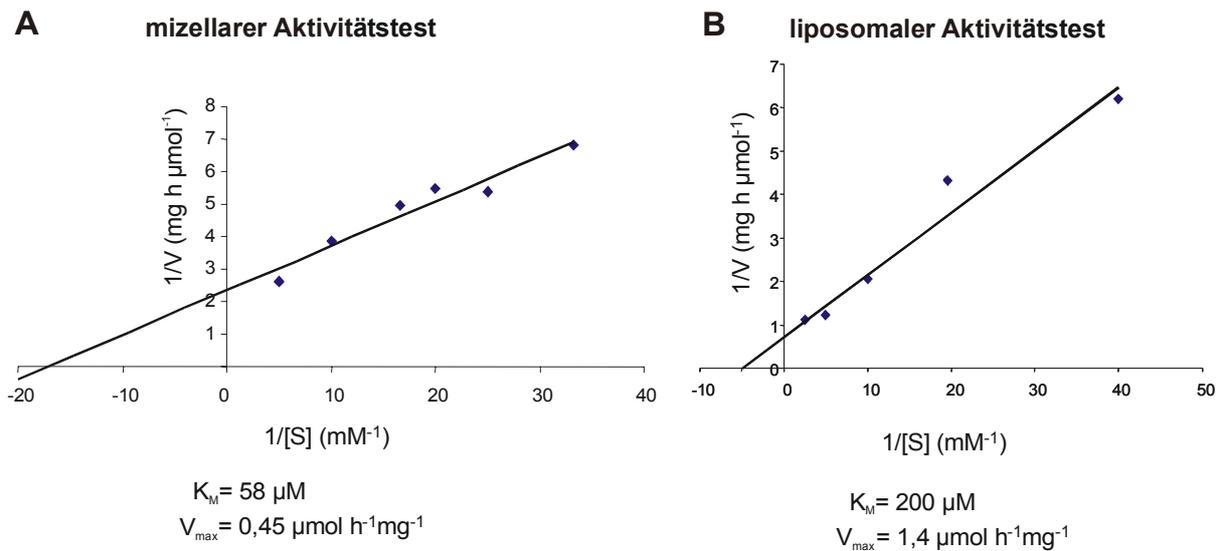


Abb 3.4: Bestimmung der kinetischen Parameter der rekombinanten sauren Ceramidase im mizellaren (A) und im liposomalen (B) Testsystem im Vergleich. Die spezifische Aktivität wurde mit steigenden Ceramidkonzentrationen gemessen. Im mizellaren Testsystem wurde das Substrat N-Lauroyl-Sphingosin 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,1 und 0,2 mM eingesetzt, im liposomalen Testsystem 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 und 0,4 mM. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass die Aktivität der sauren Ceramidase stark abhängig ist vom Redox-Zustand des Enzyms (Linke, 2000; Tsuboi et al., 2005). Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei Zugabe des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP). Nach Reduktion mit TCEP stieg die enzymatische Aktivität des gereinigten rekombinanten Enzyms auf bis zu 450 % an (Abb. 3.5).

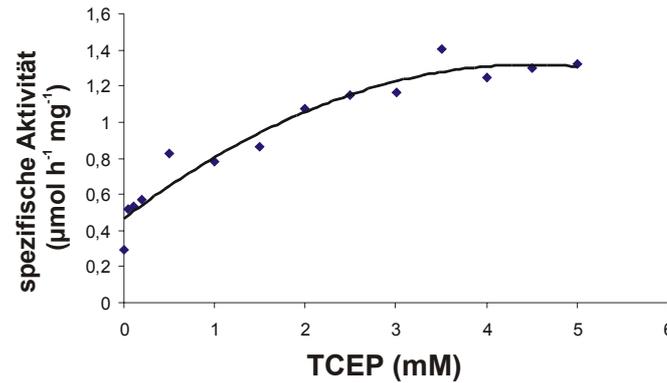


Abb. 3.5: Die Aktivität der sauren Ceramidase steigt durch Zugabe des Reduktionsmittels TCEP an. Die Aktivität wurde im mizellaren Aktivitätstest bestimmt. Das Enzym wurde in dem Natriumacetatpuffer bei pH 4, bei Raumtemperatur 15 min mit der entsprechenden Konzentration an TCEP vorinkubiert, bevor das Substrat N-Lauroyl-Sphingosin zum Reaktionsgemisch gegeben wurde. Angegeben sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen.

Die gereinigte rekombinante saure Ceramidase wurde massenspektrometrisch mittels MALDI untersucht (Abb. 3.6). Dabei ergab sich ein Molekulargewicht von ca. 47,8 kDa. Dies sind ca. 5,2 kDa weniger als in der Literatur für das aus Humangewebe gereinigte Enzym beschrieben (Bernardo et al., 1995). Diese Abweichung beruht auf einer unterschiedlichen Glykosylierung in humanen und in Insektenzellen (siehe Kapitel 3.5). Unter diesen Bedingungen lässt sich nicht differenzieren, ob es sich bei der 47,8 kDa Spezies um saure Ceramidase Vorläufer, also einen durchgehenden Peptidfaden, oder um prozessiertes Enzym bestehend aus α - und β -Untereinheit handelt. Im Massenspektrum der nicht-reduzierten Probe treten darüberhinaus Signale auf, die den unverbrückten α - und β -Untereinheiten entsprechen. Diese Beobachtung beruht wahrscheinlich auf einer ontarget- oder Gasphasenspaltung der Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten, ein bekanntes Phänomen unter MALDI-MS-Bedingungen (Patterson und Katta, 1994).

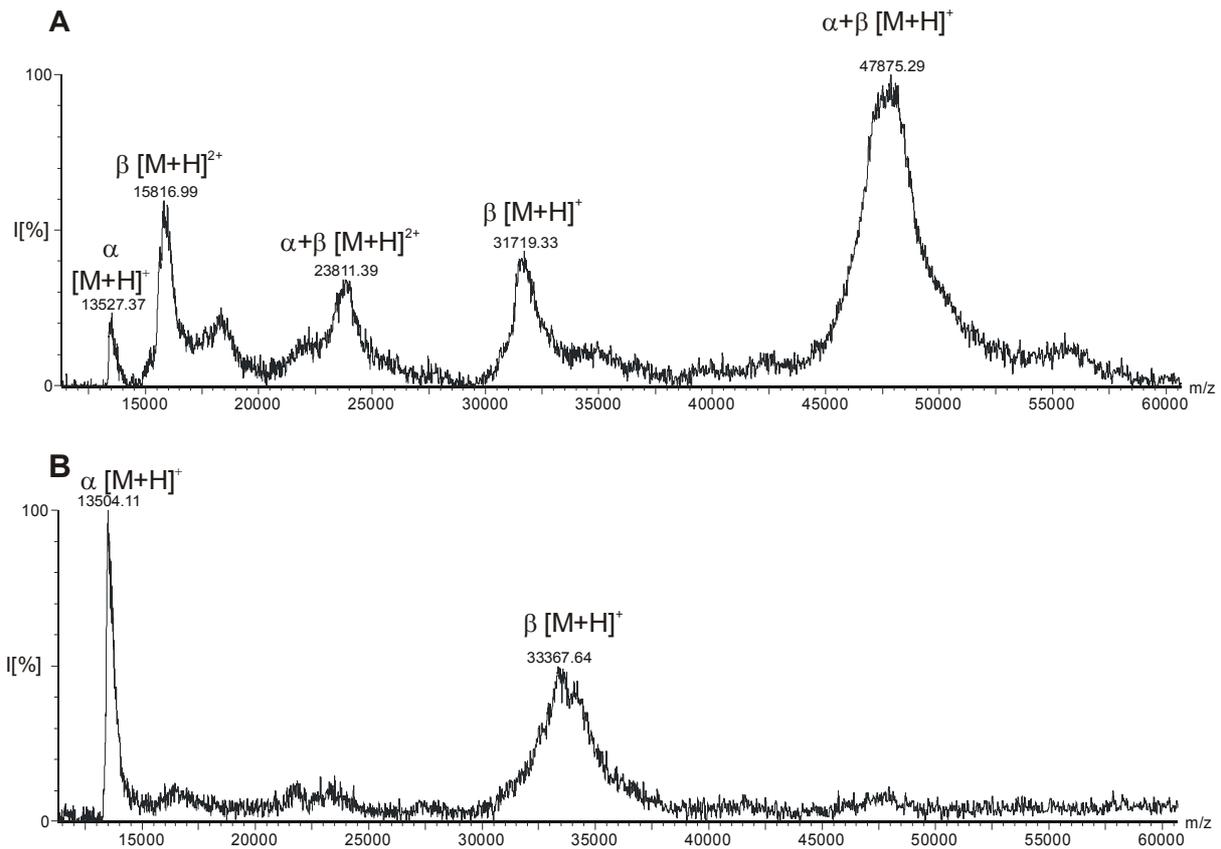


Abb. 3.6: MALDI-MS Spektrum der gereinigten rekombinanten sauren Ceramidase.

A: unbehandelte Probe. Beide Untereinheiten und ein dominanter Peak, der der Masse des Vorläufer-Proteins oder prozessierter Ceramidase entspricht, wurden detektiert. Darüberhinaus treten auch die doppelt geladenen Spezies auf.

B: Durch die Reduktion mit DTT sind nur noch die voneinander getrennten Untereinheiten nachweisbar. Die Spektren wurden mit einem *High-mass* Detektor und Sinapinsäure als Matrix aufgenommen. Es wurden Durchschnittsmassen bestimmt.

Reduziert man das Protein, erhält man im Massenspektrum Signale bei 13 und 33 kDa, die α - und β -Untereinheit entsprechen. Reduzierter Vorläufer, dessen Masse ungefähr der oxidierten prozessierten Form entspricht, war nicht mehr in nachweisbarer Menge vorhanden. Es handelt sich daher bei dem 47,8 kDa Protein nicht um Vorläufer, sondern um reife saure Ceramidase.

Die β -Untereinheit der sauren Ceramidase erscheint im MALDI-Spektrum kleiner, als im SDS-PAGE-Gel. Im SDS-PAGE-Gel wird die Untereinheit durch die Glykosylierung in einer breiten Bande bei ca. 35 kDa detektiert (Abb. 3.3). Im MALDI-Massenspektrum des unbehandelten Proteins bei 31,7 kDa, im Spektrum des reduzierten Verdau bei 33,3 kDa. Diese Unterschiede entstehen wahrscheinlich durch Abspaltung von Zuckerresten.

3.3 Kristallisationsexperimente

Mit der gereinigten und charakterisierten rekombinanten sauren Ceramidase wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Sänger an der FU Berlin Kristallisationsexperimente für die Röntgenstrukturanalyse begonnen. Die bisher dabei erhaltenen nadelförmigen Proteinkristalle (Abb. 3.7) erwiesen sich aber als noch nicht geeignet für die Strukturaufklärung.



Abb. 3.7: Kristalle der sauren Ceramidase unter dem Lichtmikroskop (Olympus) mit Polarisationsfilter. Die Größe der dargestellten Kristalle beträgt ca. 0,2 x 0,01 mm. Kristallisationsbedingungen: 10 mM Natriumacetat pH 4,0, 0,2 M MgSO₄, 15% PEG 4000, 3,8 µg saure Ceramidase/µl. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Herrn Maxim Rossokha zur Verfügung gestellt.

3.4 Reinigung der sauren Ceramidase aus humaner Plazenta

Die Eignung der rekombinanten sauren Ceramidase für Strukturuntersuchungen lässt sich durch den Vergleich von rekombinant hergestelltem und aus menschlichem Gewebe gereinigtem Protein feststellen. Dies gilt insbesondere für die Lage der Disulfid-Brücken. Die Reinigung der sauren Ceramidase aus Plazenta erfolgte mit kleinen Veränderungen nach einem Protokoll von Linke (Linke et al., 2000). Zur Verhinderung einer Aggregation der hydrophoben sauren Ceramidase erfolgte die Reinigung von Beginn an in Gegenwart nicht-ionischer Detergenzien. Zunächst wurden vier Plazenten (1 kg) von der Nabelschnur befreit und grob zerkleinert. Die Stücke wurden in Eiswasser in Gegenwart von 0,1 % Nonidet P40 homogenisiert. Durch die Wirkung des Detergenz, der Scherkräfte und des osmotischen Schocks wurden die Zellen und subzellulären Kompartimente lysiert. Große Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Zunächst wurden unerwünschte Proteine mit einer 30 %igen Ammoniumsulfat-Sättigung gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Dann wurde die saure Ceramidase zusammen mit anderen Proteinen bei 60 %iger Sättigung pelletiert. Das Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung wurde in Con A-Waschpuffer PL (30 mM Tris/HCl pH 7, 200 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Nonidet P 40) gelöst und auf die Concanavalin A-Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt und die gebundenen Glykoproteine durch einen linearen Gradienten von 0-25 % (w/v) Methyl- α -D-glucopyranosid in Con A-Waschpuffer PL eluiert. Alle glykoproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf eine Octylsepharose-Säule geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit detergentzfreiem Puffer (OS-Waschpuffer PL, 30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 100 mM NaCl) entfernt. Gebundene Proteine wurden mit 1% Nonidet P-40 im Waschpuffer eluiert. Die Fraktionen, die gemäß Western Blot-Analyse saure Ceramidase enthielten, wurden vereinigt und einer Affinitätschromatographie an dem immobilisierten Farbstoff Procion Red HE-3B (Matrex Gel Red A, MGR) unterzogen. Procion Red HE-3B ist ein Triazinyl-Farbstoff mit sulfonierten und aromatischen Gruppen, die bestimmte Proteine über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen binden. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen mit einem Waschpuffer, der 0,1 % Nonidet P-40 enthält (MGR-Waschpuffer 1, 30 mM Tris/HCl pH 7,2, 0,1 % Nonidet P 40), von der MGR-Säule entfernt. Dann wurde das Nonidet P-40 im Waschpuffer gegen 0,1 % OG getauscht (MGR-Waschpuffer 2, 30 mM Tris/HCl pH 7,2, 0,1 % OG) und die Säule bis zum vollständigen Austausch des Detergenz gespült. OG ist wesentlich teurer als Nonidet P-40, aber, zumindest in niedriger Konzentration, HPLC und MALDI-verträglich. Ausserdem ist es im Gegensatz zu Nonidet P-40 dialysierbar. Die Elution der an die MGR-Säule gebundenen Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in OG-haltigem

Waschpuffer. Das Eluat der Farbstoffchromatographie wurde auf ca. $\frac{1}{10}$ des Ausgangsvolumens konzentriert und der stark salzhaltige Puffer gegen NaCl-freien MGR-Waschpuffer 2 ausgetauscht. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DMAE-650 (M) durchgeführt. Das aufkonzentrierte Protein in MGR-Waschpuffer 2 wurde auf die Säule geladen. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass sich unter diesen Bedingungen die saure Ceramidase in den ersten Fraktionen des Durchlaufs befand (Abb. 3.8). Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug im mizellaren Aktivitätstest $340 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Die Ausbeute aus vier Plazenten betrug $550 \mu\text{g}$ saure Ceramidase.

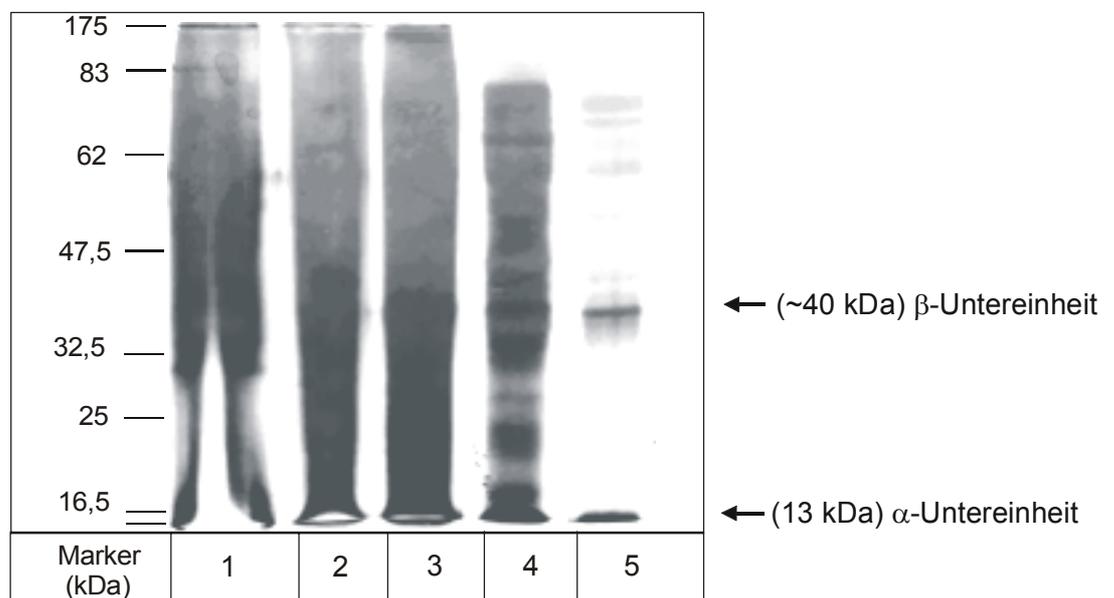


Abb. 3.8: Silbergefärbtes SDS-PAGE-Gel der verschiedenen Reinigungsschritte der plazentalen sauren Ceramidase. 1: Pellet der 60 % Ammoniumsulfatfällung, 2: Eluat der Concanavalin A-Chromatographie, 3: Eluat der Octylsepharose-Chromatographie, 4: Eluat der Chromatographie an MGR, 5: Durchlauf der Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DMAE-650. Auf jede Bahn wurden $10 \mu\text{l}$ Lösung aufgetragen. Die Proteine wurden durch Silberfärbung visualisiert.

3.5 Bestimmung der posttranslationalen Modifikationen der sauren Ceramidase

Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht die Darstellung homogener saurer Ceramidase im Milligramm-Maßstab. Wie in Kapitel 3.3 gezeigt, ist das Protein glykosyliert und für Kristallisationsstudien und andere strukturelle Untersuchungen geeignet. Allerdings werden rekombinantes und plazentales humanes Protein unterschiedlich proteolytisch prozessiert. In *Sf*-Zellen gelangt ein Großteil des neu gebildeten Enzyms nicht in die Lysosomen, sondern wird direkt ins Medium sezerniert (siehe Kapitel 3.1). Da die Zellen am Ende der Expression vom Medium getrennt werden, wird nur der in den Überstand sezernierte Anteil der sauren Ceramidase aufgereinigt.

Die genaue Kenntnis wesentlicher Strukturmerkmale der rekombinanten humanen sauren Ceramidase, wie die Lage der Disulfidbrücken und die N-Glykosylierung, sind für eine weitere Charakterisierung des Enzyms von großer Bedeutung.

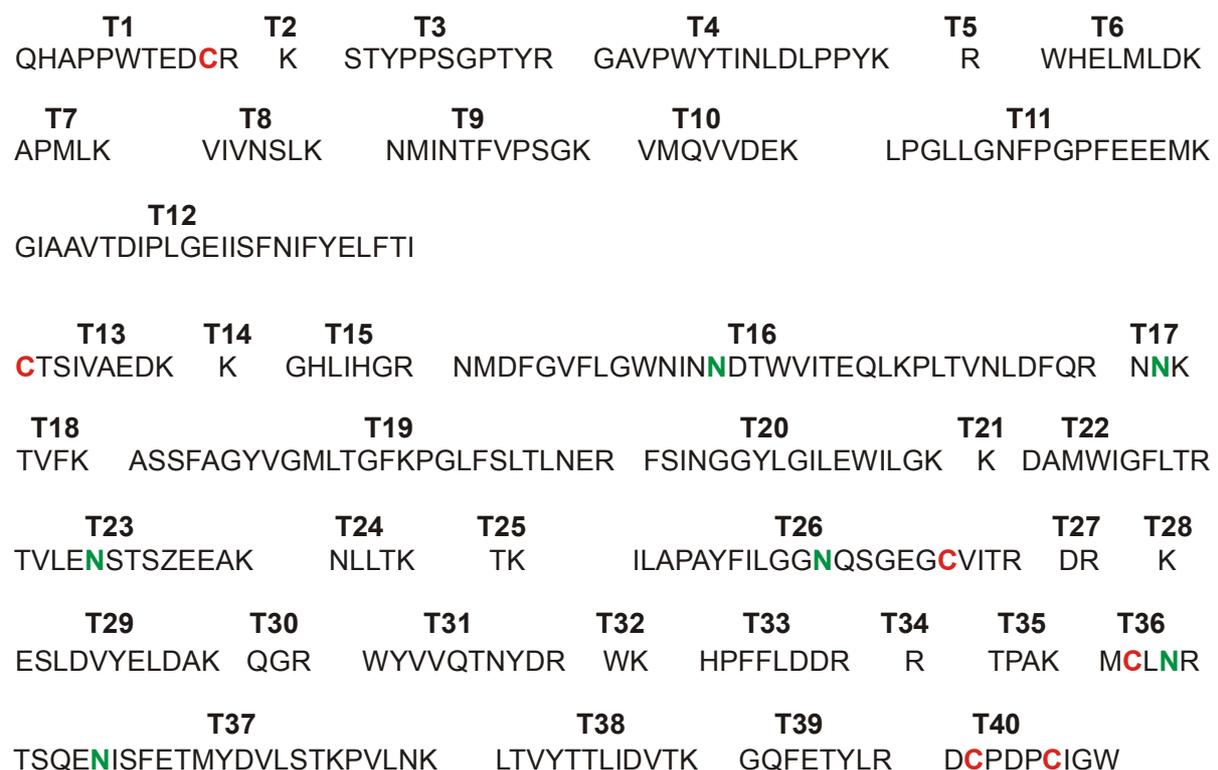


Abb. 3.9: Die Sequenz der sauren Ceramidase nach Entfernung der Signalsequenz. Die tryptischen Schnittstellen sind durch Abstände angedeutet. Tryptische Peptide werden mit T bezeichnet. Cystein-Reste sind rot, potentielle N-Glykosylierungsstellen grün dargestellt. Die α -Untereinheit besteht aus den tryptischen Peptiden T1-T12, die β -Untereinheit aus den Peptiden T13-T40.

Zur Analyse der Disulfidverknüpfungen und der N-Glykosylierung wurde das Protein zunächst tryptisch verdaut. Abbildung 3.9 zeigt die Aminosäuresequenz des reifen Proteins nach Abspaltung der Signalsequenz. Die α -Untereinheit besteht aus den Peptiden T1-T12, die β -Untereinheit aus den Peptiden T13-T40. Die tryptischen Schnittstellen nach den Aminosäureresten Lysin und Arginin sind durch Abstände angedeutet. Einige Peptide lassen sich bereits im MALDI-MS Spektrum eines tryptischen Verdau der unbehandelten rekombinanten sauren Ceramidase zuordnen (Abb. 3.10).

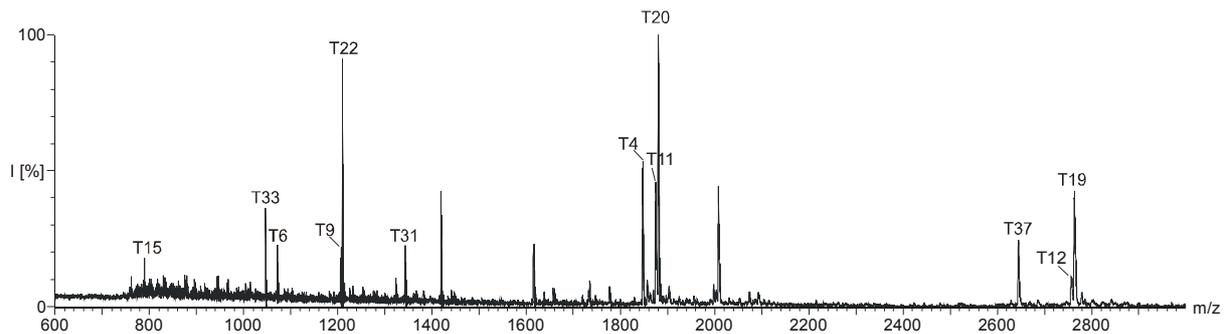


Abb. 3.10: MALDI-MS Spektrum des tryptischen Verdau der rekombinanten sauren Ceramidase. Einige Signale lassen sich direkt durch Vergleich mit den berechneten Massen der tryptischen Peptide zuordnen. Das Spektrum wurde im Reflektrom-Modus mit Sinapinsäure als Matrix aufgenommen.

In Tabelle 2 sind die Sequenzen der tryptischen Peptide, die sich bereits im Gesamtverdau der unbehandelten sauren Ceramidase anhand ihrer Masse zuordnen lassen, zusammengefasst. Peptide mit einer Masse kleiner 1000 Dalton, sind dabei deutlich schlechter zu identifizieren. Ein Charakteristikum der MALDI-Massenspektrometrie sind intensive Signale im niedrigen Massenbereich durch ionisierte Matrixionen. Damit die Empfindlichkeit des Detektors nicht herab gesetzt wird, werden die Signale der niedrigen Massen unterdrückt. Die Spektren wurden üblicherweise bei einer Matrixunterdrückung von 700 Da aufgenommen. Dadurch wurden Peptide in diesem Massenbereich möglicherweise nicht detektiert. Auffällig ist außerdem, dass im tryptischen Verdau kein einziges der cysteinhaltigen Peptide (T1, T13, T26, T36 oder T40) identifiziert werden konnte. Von den sechs potentiell N-glykosylierten Peptiden findet sich nur eine Spezies entsprechender Masse (T37).

3 Ergebnisse

tryptische Peptide mit mind. 3 Aminosäureresten	Masse (Da) [M+H] ⁺ theoretisch	Masse (Da) [M+H] ⁺ experimentell bestimmt
T1 (-)QHAPPWTE D C R	1339,59	- (Cystein)
T3 STYPPSGPTYR	1225,59	1225,46
T4 GAVPWYINLDLPPYK	1846,97	1847,60
T6 WHELM L DK	1071,53	1071,67
T7 A P MLK	559,33	-
T8 VIVNS L K	772,49	-
T9 NMINTFVPSGK	1207,61	1207,71
T10 VMQVVDEK	947,49	-
T11 LPGLLG N FPGPFEEEMK	1874,94	1875,59
T12 GIAAVTDIPLGEIISFNIFYELFTI(-)	2756,48	2756,82
T13 (-) C T S IVAEDK	964,45	- (Cystein)
T15 GHLI H GR	789,45	789,54
T16 NMDFGVFLGWNIN N DTWVITEQLKPLTVNLDFQR	4038,02	- (glykosyliert?)
T17 N N K	375,20	- (glykosyliert?)
T18 TV F K	494,30	-
T19 ASSFAGYVGMLTGFKPGLFSLTLNER	2763,42	2764,06
T20 FSINGGYLGILEWILGK	1880,03	1880,62
T22 DAMWIGFLTR	1209,61	1209,56
T23 TVLE N STSYEEAK	1470,70	- (glykosyliert?)
T24 NLLTK	588,37	-
T26 ILAPAYFILGG N QSGEG C VITR	2279,19	- (glykosyliert?,Cystein)
T29 ESLDVYELDAK	1281,62	-
T30 QGR	360,20	-
T31 WYVVQTN Y DR	1343,64	1342,56
T33 HPFFLDDR	1046,51	1046,55
T35 TPAK	416,25	-
T36 M C L N R	636,30	- (glykosyliert?,Cystein)
T37 TSQ E NISFETMYDVLSTKPVLNK	2644,32	2644,62
T38 LTVYTTLIDVTK	1366,78	1366,54
T39 GQFETYLR	1013,51	1013,46
T40 D C P D P C IGW	1005,38	- (Cystein)

Tabelle 2: Übersicht über die berechneten theoretischen und die gemessenen Massen der Peptide des tryptischen Verdaus der sauren Ceramidase. (Cystein) = Cystein-haltiges Peptid, (glykosyliert?) = Peptid mit potentieller N-Glykosylierungsstelle, das nicht zugeordnet werden konnte.

3.5.1 Glykosylierung der rekombinanten sauren Ceramidase

Die Glykosylierung von Proteinen ist stark abhängig vom Organismus, in dem sie exprimiert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass sich die N-Glykanstruktur der rekombinanten sauren Ceramidase aus Insektenzellen von der des aus Plazenta gereinigten Enzyms unterscheidet. Wie Ferlinz zeigen konnte, führt ortsspezifische Mutagenese der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen mit der Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx = alle Aminosäuren mit Ausnahme von Prolin) und Expression der mutierten cDNA-Konstrukte in COS Zellen bei Entfernung der Glykosylierungsstellen eins, drei oder fünf dazu, dass kein prozessiertes, aktives Enzym gebildet wird. Bei Mutation der Glykosylierungsstellen zwei und vier wurde prozessierte saure Ceramidase mit einem geringeren Molekulargewicht als der Wildtyp gebildet. Mutation der sechsten potentiellen N-Glykosylierungsstelle verändert das Protein weder hinsichtlich der Prozessierung, noch des Molekulargewichts (Ferlinz et al., 2001). Diese Glykosylierungsstelle wird *in vivo* vermutlich nicht genutzt.

Plazentale saure Ceramidase hat ein Molekulargewicht von ca. 53 kDa. Nach Reduktion erhält man eine 13 kDa schwere α -Untereinheit und eine ca. 40 kDa schwere β -Untereinheit. Deglykosylierung reduziert die β -Untereinheit auf ca. 28 kDa. Die rekombinante sauren Ceramidase aus dem Baculosystem ist etwas kleiner. Das Gesamtprotein hat ein Molgewicht von ca. 48 kDa. Reduziert ergibt sich eine molekulare Masse von ca. 35 kDa für die β -Untereinheit. Die molekulare Masse der β -Untereinheit des rekombinanten Enzyms ist damit kleiner als die Masse der β -Untereinheit des humanen, aus Plazenta gereinigten Enzyms. Deglykosylierung des Enzyms reduziert sowohl die Masse der rekombinanten, als auch der plazentalen β -Untereinheit auf ca. 28 kDa (Abb. 3.11).



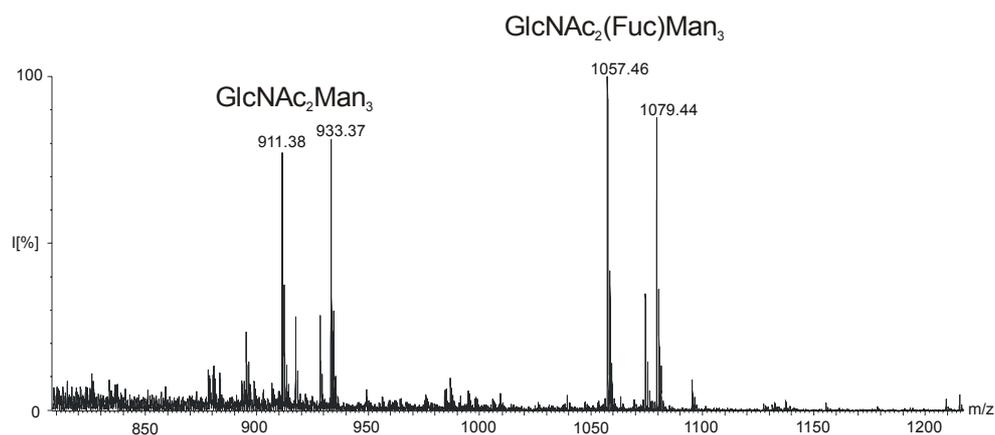
Abb. 3.11: Deglykosylierung der β -Untereinheit der rekombinanten und der plazentalen sauren Ceramidase mit PNGaseF. SDS-PAGE unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (3 μ g Protein/Bahn, Coomassie-Färbung).

3 Ergebnisse

Die unterschiedlichen Massen der Untereinheiten sind also das Ergebnis einer unterschiedlichen Glykosylierung. Die α -Untereinheit hat jeweils ein Molekulargewicht von 13 kDa, das sich bei PNGaseF-Zugabe nicht verändert, da diese Untereinheit keine N-Glykosylierungsstelle hat.

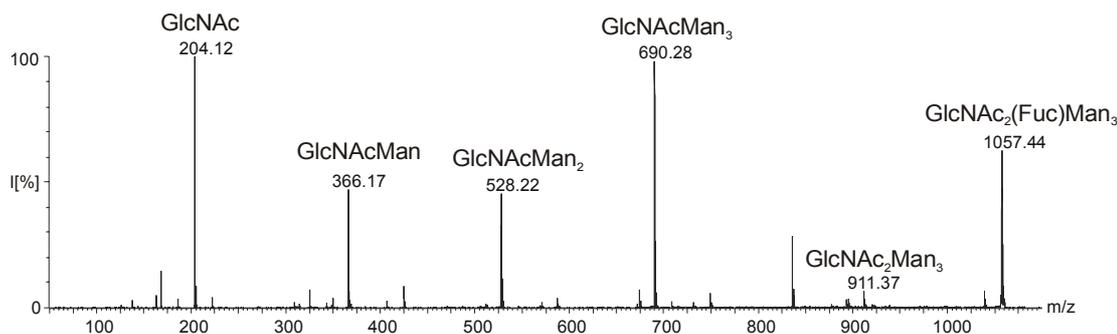
Zunächst wurde die N-Glykanstruktur des Gesamtproteins untersucht. Dazu wurde rekombinante saure Ceramidase mit PNGaseF enzymatisch deglykosyliert. Die freigesetzten N-Glykane wurden mit Hilfe einer Aktivkohlesäule isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Das ESI-Massenspektrum zeigte vier dominante Peaks mit den Massen 911, 933, 1057 und 1079 Da. 1079 Da entspricht der Masse des Natriumadduktes von zwei N-Acetylhexosaminen, drei Hexosen und einer Fucose. 1057 Da entspricht der Masse des entsprechenden $[M+H]^+$ -Ions (Abb. 3.12). Von diesem Signal wurde ein MS/MS-Fragmentspektrum angefertigt (Abb. 3.13). Auf der Grundlage des Fragmentmusters wurde dieses Signal identifiziert. Es handelt sich um die N-Glykanstruktur $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})\text{Man}_3$. Dieses Glykosylierungsmuster tritt bei Insektenzellen häufig auf (Altmann et al., 1999). Es besteht aus zwei N-Acetylglucosamin-Resten, die zusammen eine Chitobiose-Einheit bilden. Mit dem reduzierenden Ende ist ein N-Acetylglucosamin mit einem Asparaginrest im Peptidfaden verknüpft. Dieses N-Acetylglucosamin kann auch fucosyliert sein. An das nicht-reduzierende Ende der Chitobiose-Einheit ist eine Trimannosyl-Verzweigungseinheit gebunden. Häufig treten auch hochmannosylierte Oligosaccharid-Strukturen, z.B. Man_5 auf, die bei der rekombinanten sauren Ceramidase aber nicht nachgewiesen wurden.

Die Signale bei 911 und bei 933 Da entsprechen dem $[M+H]^+$ -, bzw. dem $[M+Na]^+$ -Ion der N-Glykanstruktur $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$.



Glykan	$\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$	$\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})\text{Man}_3$
$[M+Na]^+$ theor. (Da)	933,32	1079,37
$[M+Na]^+$ exp. bestimmt (Da)	933,37	1079,44
$[M+H]^+$ theor. (Da)	911,33	1057,39
$[M+H]^+$ exp. Bestimmt (Da)	911,38	1057,46

Abb. 3.12: ESI-MS Spektrum der isolierten N-Glykane der sauren Ceramidase.



Glykan	GlcNAc	GlcNAcMan	GlcNAcMan ₂	GlcNAcMan ₃	GlcNAc ₂ Man ₃	GlcNAc ₂ (Fuc)Man ₃
[M+H] ⁺ theor. (Da)	204,19	366,24	528,29	690,34	911,33	1057,39
[M+H] ⁺ exp. bestimmt (Da)	204,12	366,17	528,22	690,28	911,37	1057,44

Abb. 3.13: Das ESI-MS/MS Fragmentspektrum des Peaks bei 1057 Da bestätigt die N-Glykanstruktur GlcNAc₂(Fuc)Man₃. Die berechneten und die gemessenen Massen der Fragmente sind angegeben.

Für die korrekte Faltung, Stabilität und Funktionalität des Enzyms ist es von Bedeutung, welcher der in Frage kommenden Asparaginreste glykosyliert ist. Daher wurde die Glykosylierung aller sechs in Frage kommenden Peptide der proteolytischen Spaltung mit Trypsin untersucht.

3.5.1.1 Glykosylierung an Asn152

Die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle der sauren Ceramidase befindet sich an Position der 31. Aminosäure auf der β -Untereinheit. Nach einem tryptischen Verdau befindet sich Asn152 auf dem sehr großen Peptid T16 (NMDFGVFLGWNINNDTWVITEQLKPLTVNLDFQR), das eine Masse von 4037,01 Da ([M+H]⁺ 4038,02) hat. Da bei der Deglykosylierung mit PNGaseF der Asparaginrest zu einem Aspartatrest hydrolysiert wird, steigt die Masse des deglykosylierten Peptids um ein Dalton. Das Spektrum des unbehandelten tryptischen Verdau zeigt u.a. einen Peak bei 5077 Da (Abb. 3.14, A), der bei Deglykosylierung verschwindet (Abb. 3.14, B). Statt dessen taucht im Spektrum des deglykosylierten Verdau ein Peak bei 4039 Da auf, dessen Masse dem deglykosylierten Peptid T16 entspricht. Die Massendifferenz zwischen den Peaks beträgt 1038 Da. Dies entspricht der Masse von zwei N-Acetylhexosaminen, drei Hexosen und einer Fucose. Auf der Grundlage der bereits ermittelten N-Glykanstruktur kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Core-Struktur der Form GlcNAc₂(Fuc)Man₃ handelt.

3 Ergebnisse

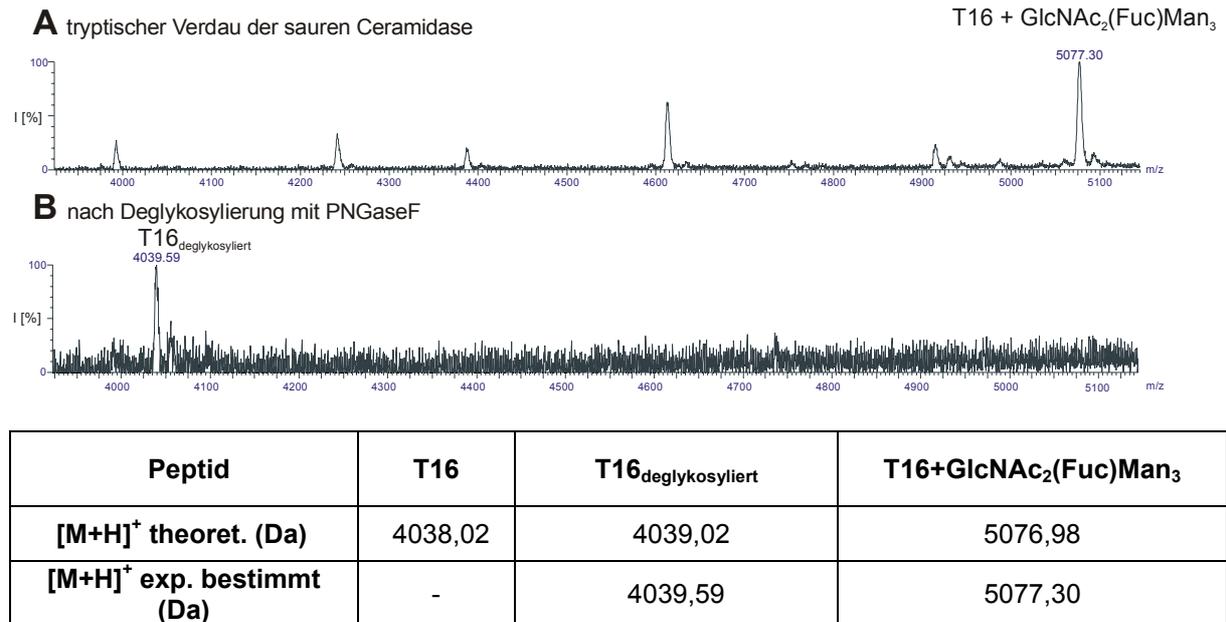


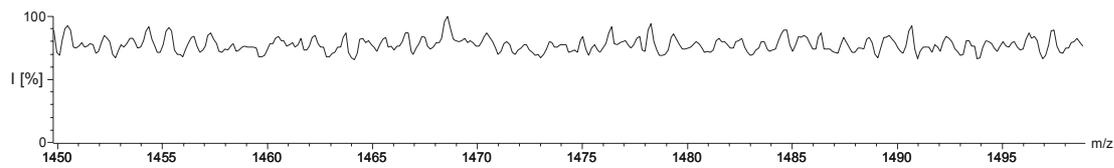
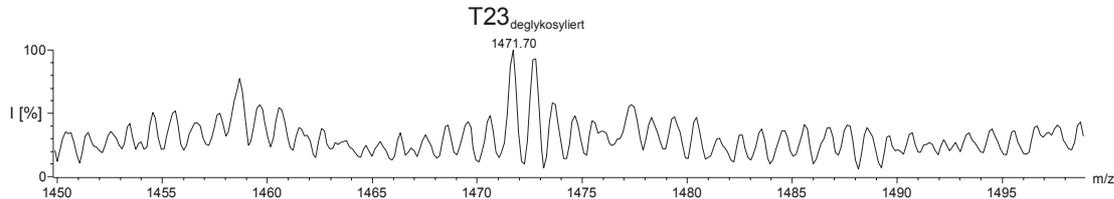
Abb. 3.14: MALDI-MS Spektrum des tryptischen Verdau der sauren Ceramidase. (A) unbehandelt, (B) nach Deglykosylierung mit PNGaseF.

3.5.1.2 Glykosylierung an Asn174

Das tryptische Peptid, das Asn174 enthält, ist relativ klein. T17 (NNK) hat eine Masse von 374,19 Da ([M+H]⁺ 375,20), liegt damit bei der MALDI-Massenspektrometrie im Bereich der Matrixunterdrückung und wird nicht detektiert. Die ESI-Massenspektrometrie ist für Spezies dieser Größe zwar geeignet, aber zu salzempfindlich. Auch nach Trennung der Peptide über *reversed phase*-Chromatographie wurde T15 weder glykosyliert noch unglykosyliert nachgewiesen. Im Spektrum des deglykosylierten tryptischen Verdau tauchte aber ein sehr schwaches neues Signal auf, dessen Masse (851 Da) einem Peptid entspricht, bei dem die tryptische Schnittstelle zwischen T17 und T18 übergangen wurde. Dies ist ein Hinweis auf eine Glykosylierung, auch wenn das glykosylierte Peptid nicht nachgewiesen wurde.

3.5.1.3 Glykosylierung an Asn238

Asn238 befindet sich auf dem Peptid T23 (TVLENSTSYEEAK), das eine Masse von 1469,69 Da ([M+H]⁺ 1470,70) hat. Ein Peptid entsprechender Masse konnte nicht zugeordnet werden. Die entsprechende Masse des deglykosylierten Peptids ([M+H]⁺ 1471,68) lässt sich im PNGaseF behandelten tryptischen Verdau der sauren Ceramidase nachweisen (Abb. 3.15). Das Peptid liegt also wahrscheinlich glykosyliert vor, auch wenn über das Glykosylierungsmuster keine Aussage getroffen werden kann.

A tryptischer Verdau der sauren Ceramidase**B** tryptischer Verdau, reduziert, alkyliert und mit PNGase F deglykosyliert

Peptid	T23	T23 _{deglykosyliert}
[M+H]⁺ theoretisch (Da)	1470,70	1471,68
[M+H]⁺ exp. bestimmt (Da)	-	1471,70

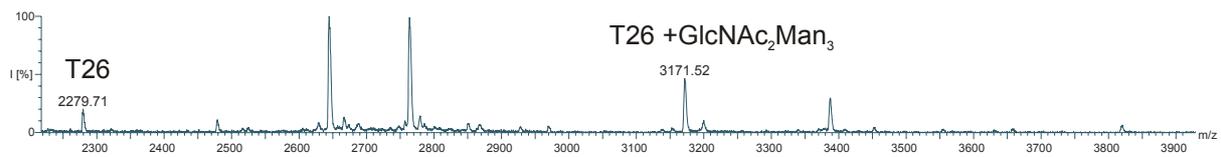
Abb. 3.15: Ausschnitt aus dem MALDI-Massenspektrum eines tryptischen Verdau der sauren Ceramidase (A), nach Reduktion mit DTT, Alkylierung mit Jodacetamid (IAA) und deglykosylierung mit PNGaseF (B). Das Gesamtspektrum ist im Anhang (Kapitel 7) abgebildet.

3.5.1.4 Glykosylierung an Asn265

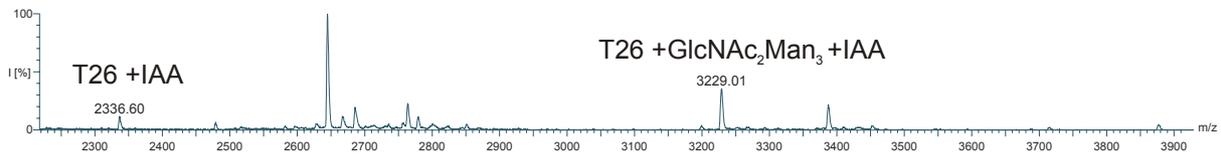
Asn265 befindet sich auf dem tryptischen Peptid T26 (ILAPAYFILGGNQS~~G~~EGCVITR), das auch einen Cysteinrest enthält. Daher wurde der tryptische Verdau zunächst reduziert und vor der Deglykosylierung mit Jodacetamid alkyliert. Bereits im reduzierten Verdau war ein Peak, dessen Masse dem des unglykosylierten Peptids T26 ($[M+H]^+$ 2279,19) entspricht, nachweisbar (Abb. 3.16). Alkylierung des Verdau verschob die Masse dieses Peaks um 57 Da. Ausserdem wurde noch ein Peak bei 3171 Da um 57 Da verschoben, diese Masse entspricht T26 + GlcNAc₂Man₃. Deglykosylierung führte zu T26_{deglykosyliert}.

3 Ergebnisse

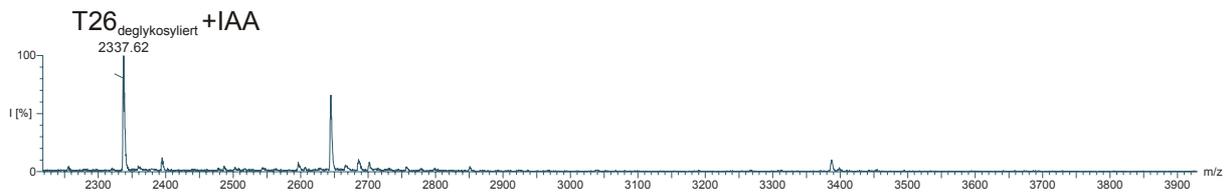
A tryptischer Verdau der sauren Ceramidase, reduziert mit DTT



B reduziert mit DTT und alkyliert mit Jodacetamid



C reduziert, alkyliert und mit PNGase F deglykosyliert



Peptid	T26	T26 +IAA	T26 _{deglykosyliert} +IAA	T26 +GlcNAc ₂ Man ₃	T26 +GlcNAc ₂ Man ₃ +IAA
[M+H]⁺ theoretisch (Da)	2279,19	2336,21	2337,19	3171,48	3228,50
[M+H]⁺ exp. bestimmt (Da)	2279,71	2336,60	2337,62	3171,52	3229,01

Abb. 3.16: MALDI-Massenspektren des reduzierten tryptischen Verdau (A), nach Alkylierung mit Jodacetamid (IAA), (B) und nach Deglykosylierung (C).

3.5.1.5 Glykosylierung an Asn321

Asn321 befindet sich auf T36 (MCLNR), es enthält nicht nur die potentielle N-Glykosylierungsstelle, sondern auch einen Cysteinrest.

Das Peptid hat deglykosyliert nur die relativ geringe Masse von 635,29 Da. In diesem niedrigen Massebereich ist das Peptid mittels MALDI-Massenspektrometrie schwer nachweisbar. Das Peptid oder eine der möglichen glykosylierten Spezies konnte weder durch ESI-, noch durch MALDI-MS detektiert werden. Im MALDI-MS-Spektrum des Gesamtverdau konnten auch keine glykosylierte Spezies des Peptids nachgewiesen werden. Eine Analyse des Gesamtverdau mittels ESI-MS ist aufgrund des hohen Salzgehaltes der Probe nicht möglich. Die Glykosylierung an Asn321 auf dem Peptid T36 wurde daher indirekt durch die Disulfid-Verknüpfung des Peptids bestimmt (siehe 3.5.2.1)

3.5.1.6 Glykosylierung an Asn327

Die sechste potentielle N-Glykosylierungsstelle, Asn327, befindet sich auf dem tryptischen Peptid T37 (TSQENISFETMYDVLSTKPVLNK) mit einer Masse von 2643,31 Da ($[M+H]^+$ 2644,32). Dieses Peptid wurde ausschliesslich unglykosyliert nachgewiesen. Es lagen keine glykosylierten Varianten, wie z.B. T34+GlcNAc₂Man₃ oder T34+GlcNAc₂(Fuc)Man₃ vor. Dies entspricht früheren Ergebnissen in transfizierten COS-Zellen, wo diese potentielle Glykosylierungsstelle auch nicht genutzt wird (Ferlinz et al., 2001). Die Identität des Peptids wurde durch Fragmentierung bestätigt (Abb. 3.17).

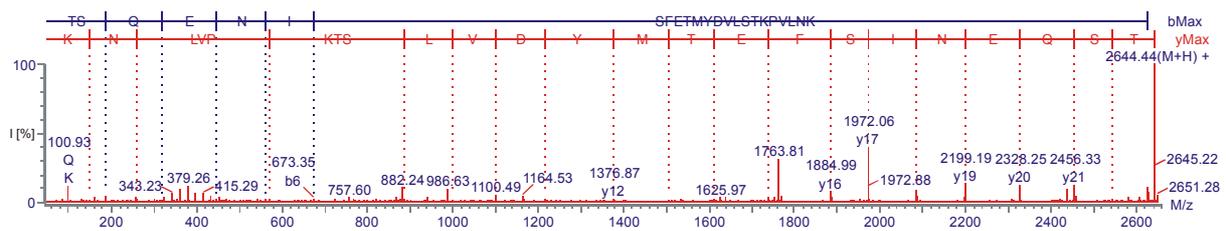


Abb. 3.17: Das ESI-MS/MS-Fragmentspektrum des tryptischen Peptids T37 bestätigt die Sequenz TSQENISFETMYDVLSTKPVLNK.

3.5.2 Disulfidverknüpfung der rekombinanten sauren Ceramidase

Neben den sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen enthält die saure Ceramidase sechs Cysteinreste, es werden also maximal drei Disulfidbrücken gebildet. Ein Vergleich der SDS-PAGE-Analyse unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte, dass α - und β -Untereinheit über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Abb. 3.18). Da sich auf der α -Untereinheit nur ein Cysteinrest befindet, muss dieser Teil einer Disulfidbrücke sein.

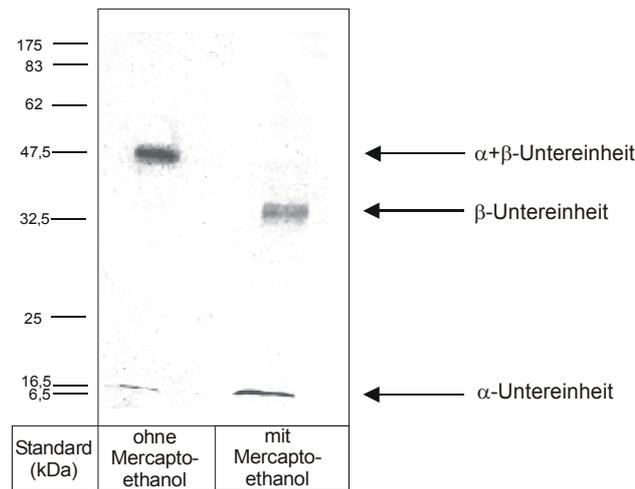


Abb. 3.18: α - und β -Untereinheit der rekombinanten sauren Ceramidase werden durch Reduktion mit Mercaptoethanol getrennt.

Von den sechs Cysteinresten der sauren Ceramidase liegen also zwei als Disulfidbrücke zwischen α - und β -Untereinheit vor. Die verbleibenden vier Cystein-Reste können entweder ebenfalls verbrückt, oder auch frei mit Thiolgruppen vorliegen. Insbesondere der Redox-Zustand von C122 ist von Interesse, da dieser nucleophile Aminosäurerest am N-Terminus der β -Untereinheit der sauren Ceramidase möglicherweise ein Teil des aktiven Zentrums des Enzyms sein könnte. Es wurde versucht, freie Cystein-Reste mit Jodacetamid zu alkylieren. Dazu wurde rekombinante gereinigte saure Ceramidase mit 5 mM [14 C]-Jodacetamid inkubiert, das Protein tryptisch verdaut und die Peptide über *reversed phase* (RP)-HPLC an einer C18-Phase getrennt. Das [14 C]-Jodacetamid hatte eine spezifische Aktivität von 58 Ci/mol. Diese hohe spezifische Aktivität führte zu hohen Radioaktivitätswerten in den einzelnen Fraktionen, insbesondere am Anfang der Elution. In keiner Fraktion konnte aber ein, im Vergleich zu den anderen Fraktionen, deutlich erhöhter Radioaktivitätswert gemessen werden (Abb. 3.19).

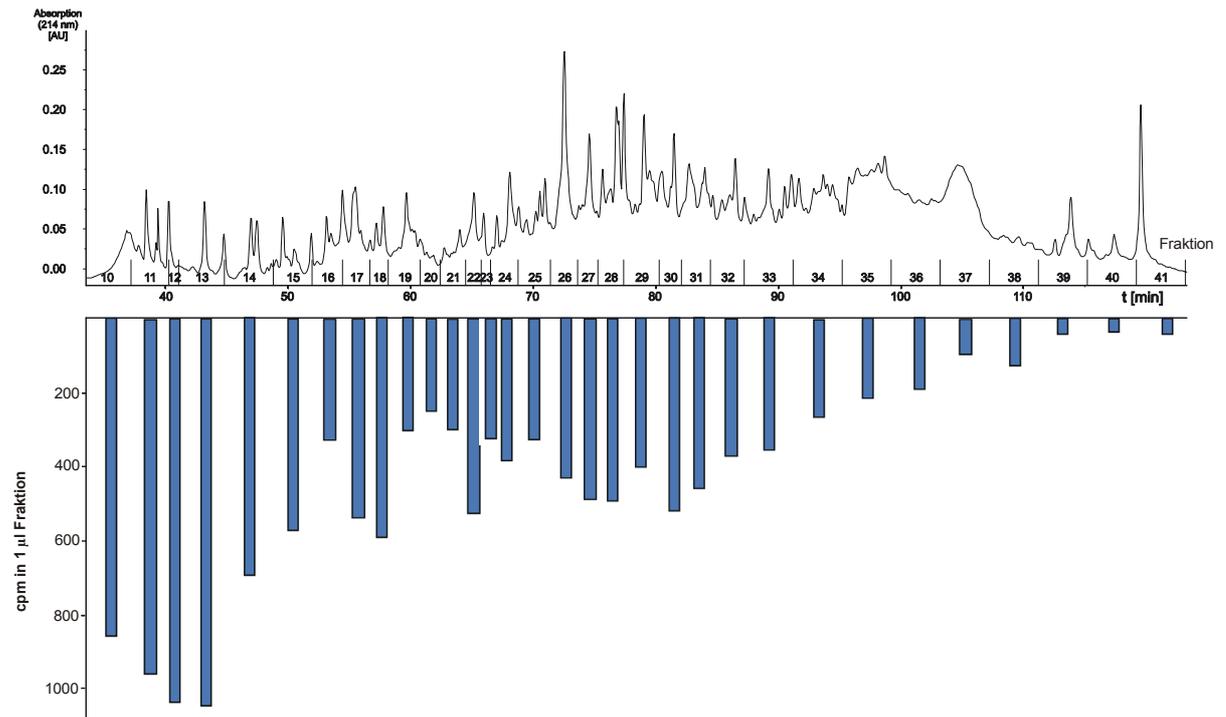


Abb. 3.19: Trennung der tryptischen Peptide der, zuvor mit [^{14}C]-Jodacetamid inkubierten sauren Ceramidase über *reversed phase* HPLC (Nucleosil RP18-Säule, Laufmittel A: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser, Laufmittel B: 0,06% TFA in 70% Acetonitril, 30% Isopropanol, eluiert wird mit einem linearen Gradienten von 5-100% B in A zwischen der 25. und der 100. Minute. Darunter ist das Radioaktivitätsprofil dargestellt.

Da die Disulfid-Brücken nicht durch massenspektrometrische Analyse des gesamten tryptischen Verdaus identifiziert werden konnten, wurden die Peptide durch RP-HPLC getrennt (Abb. 3.20) und jede einzelne Eluatfraktion auf cysteininhaltige Peptide untersucht.

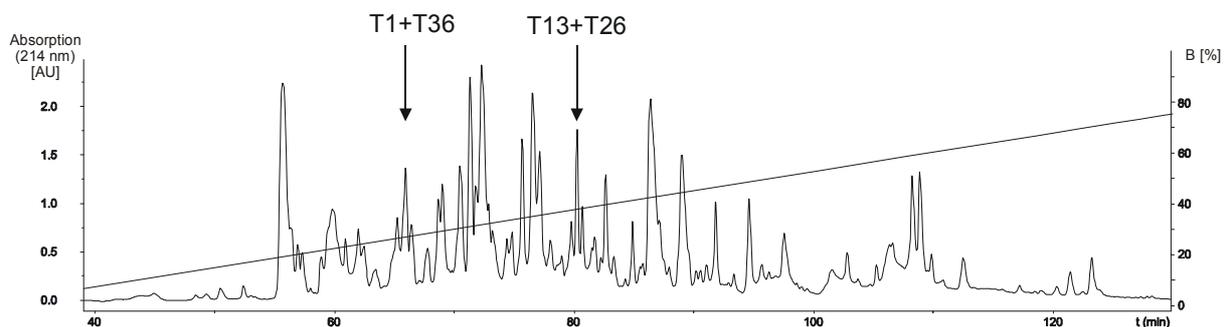
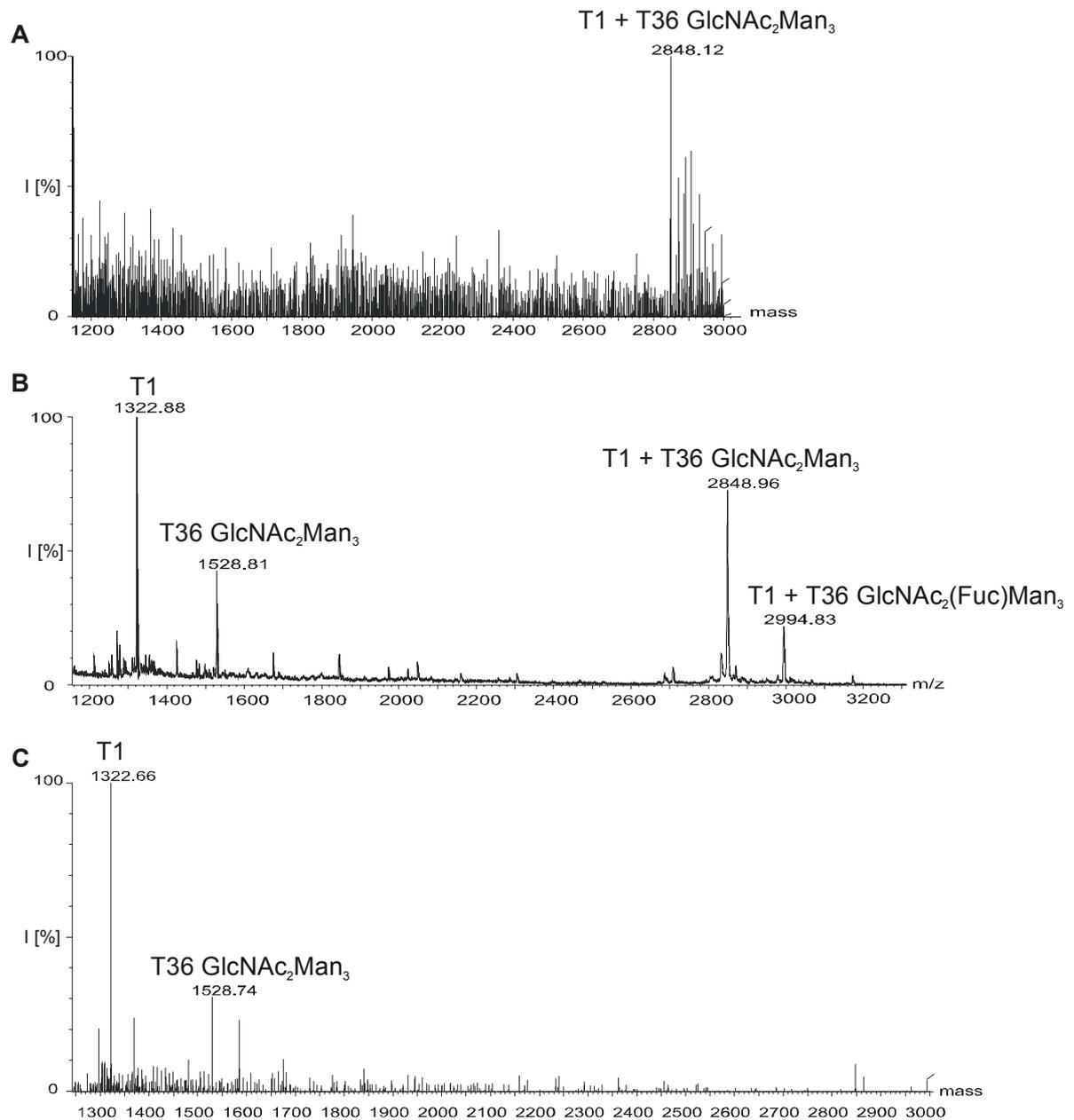


Abb. 3.20: Trennung der Peptide eines tryptischen Verdaus von rekombinanter saurer Ceramidase über RP-HPLC auf einer Nucleosil RP18-Säule. Laufmittel A: 0,1% TFA in Wasser; B: 0,06% TFA in 70% Acetonitril, 30% Isopropanol. Eluiert wurde mit einem Acetonitril/Isopropanol-Gradienten. Signale, die nach massenspektrometrischer Analyse disulfidverknüpften Peptiden entsprechen, sind durch Pfeile markiert.



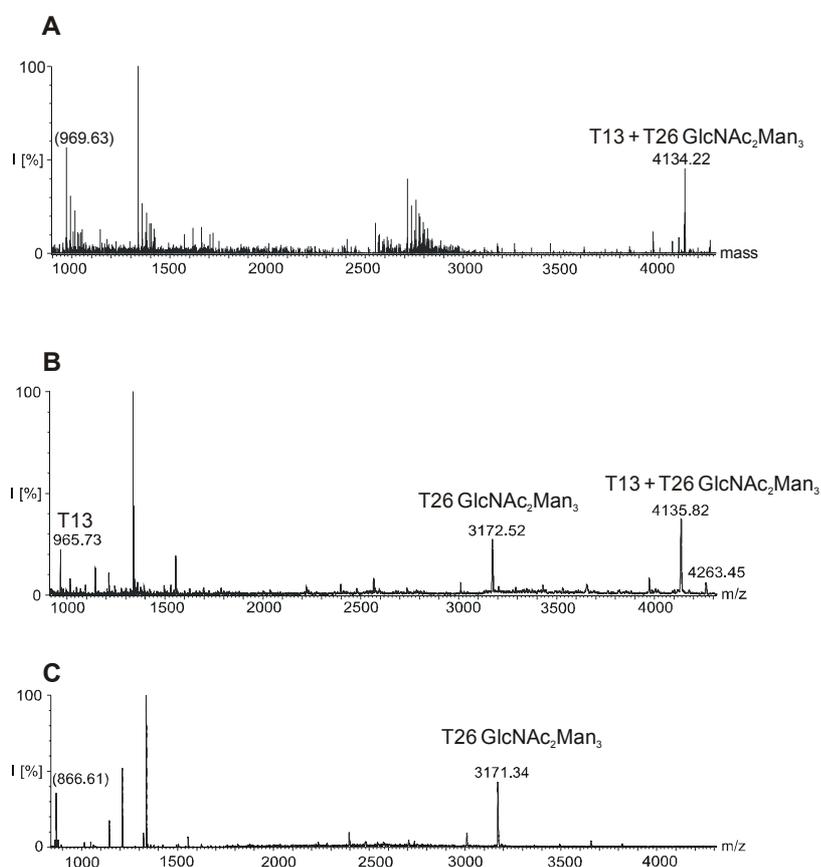
Peptid	T1+T36 GlcNAc ₂ Man ₃	T1	T36 GlcNAc ₂ Man ₃
[M+H] ⁺ theoretisch (Da)	2849,18	1322,59	1528,59
[M+H] ⁺ exp. Bestimmt (Da)	2848,96/2848,16	1322,66/1322,88	1528,74/1528,81

Abb. 3.22: Massenspektren des isolierten disulfidverknüpften Peptids T1+T36. (A) ESI-Massenspektrum der unbehandelten RP-Fraktion. (B) MALDI-MS der unbehandelten RP-Fraktion. (C) ESI-TOF-Spektrum nach Reduktion mit TCEP.

3.5.2.2 Disulfidverknüpfung von C122 und C271

Die saure Ceramidase gehört wahrscheinlich zur Gruppe der Ntn-Hydrolasen. Alle Enzyme dieser Gruppe haben N-terminal einen nucleophilen Aminosäurerest. Bei der sauren Ceramidase befinden sich mit Cystein, Serin und Threonin drei Aminosäuren mit nukleophilen Resten am N-Terminus der β -Untereinheit. Der Redoxzustand des Cysteins könnte für die katalytische Aktivität des Enzyms entscheidend sein.

Die Glykosylierung von T26 wurde bereits als $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ identifiziert (siehe 3.5.1.4). Diese Masse wurde nur in einer einzigen RP-HPLC-Fraktion nachgewiesen. In dieser Fraktion befand sich auch ein Peptid, dessen Masse T13 entspricht und ein Peptid, dessen Masse $\text{T13}+\text{T26 GlcNAc}_2\text{Man}_3$ entspricht. Im ESI-Massenspektrum fand sich wieder nur die verknüpfte Spezies. Bei der Reduktion der Fraktion verschwand die verknüpfte Spezies. Freies T13 war im Spektrum der reduzierten Fraktion nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.23).

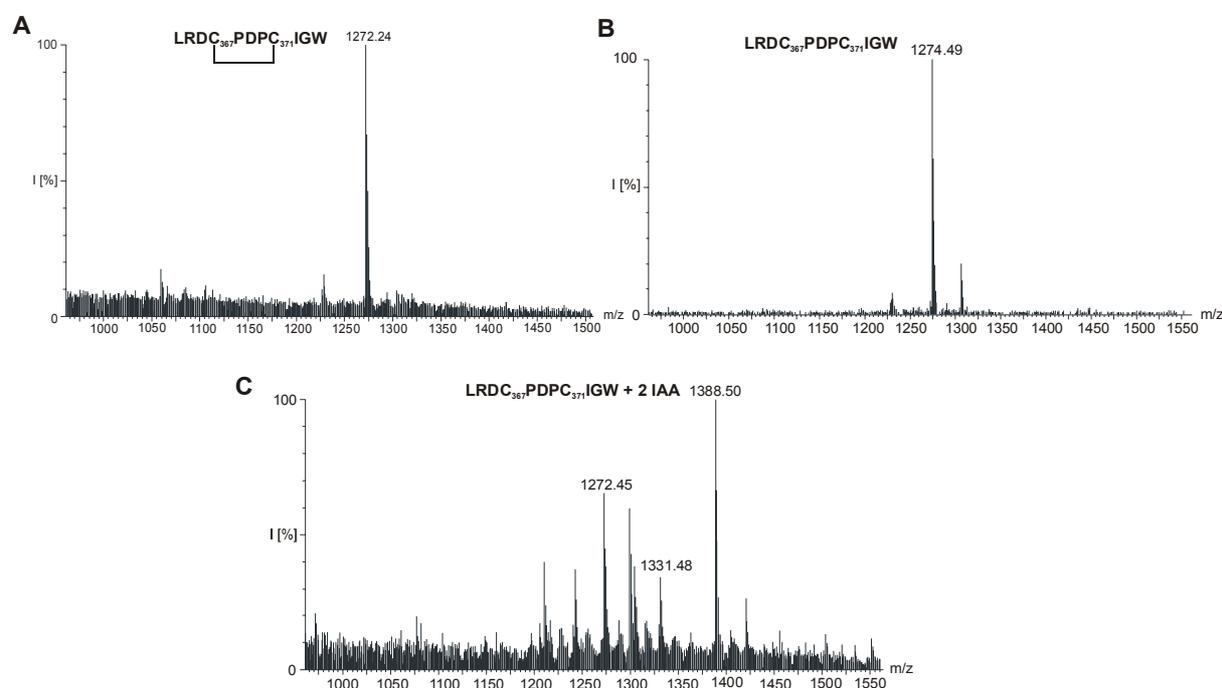


Peptid	T13+T26 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$	T13	T26 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$
$[\text{M}+\text{H}]^+$ theoretisch (Da)	4134,94	965,46	3171,48
$[\text{M}+\text{H}]^+$ exp. Bestimmt (Da)	4134,22/4135,82	965,73	3171,34/3172,52

Abb. 3.23: Massenspektren des isolierten disulfidverknüpften Peptids T13+T26. (A) ESI-TOF Massenspektrum der unbehandelten RP-Fraktion. (B) MALDI-MS der unbehandelten RP-Fraktion. (C) MALDI-TOF-Spektrum nach Reduktion mit TCEP.

3.5.2.3 Disulfidverknüpfung von C367 und C371

Die Verknüpfung der beiden Cysteinreste C367 und C371 in der Nähe des C-Terminus des Proteins wurde durch Analyse des chymotryptischen Verdau der sauren Ceramidase ermittelt. Das $[M+H]^+$ -Ion des chymotryptischen Peptids LRDCPDPCIGW hat in oxidierte Form mit intramolekularer Disulfidbrücke eine theoretische Masse von 1272,57 Da. Bei der MALDI-Massenspektrometrie wurde es als $[M+H]^+$ -Ion bei 1272,24 Da detektiert (Abb. 3.24, A). Reduktion erhöhte die Masse des $[M+H]^+$ -Ions auf 1274,49 Da (Abb. 3.24, B), Alkylierung beider Thiolgruppen mit Jodacetamid auf 1388,50 Da (Abb. 3.24, C). Daneben lässt sich im Spektrum des alkylierten Peptids auch die oxidierte Form mit intramolekularer Disulfidbrücke und das Peptid, in dem nur eine Thiolgruppe durch Jodacetamid alkyliert wurde, detektieren. Die Reaktion verlief nicht vollständig.



Peptid	LRDCPDPCIGW ox.	LRDCPDPCIGW red.	LRDCPDPCIGW + 2 IAA
$[M+H]^+$ theoretisch (Da)	1272,57	1274,57	1388,57
$[M+H]^+$ exp. Bestimmt (Da)	1272,24	1274,49	1388,50

Abb. 3.24: MALDI-Massenspektren des chymotryptischen Peptids LRDCPDPCIGW. (A) unbehandelt, (B) nach Reduktion mit TCEP, (C) nach Alkylierung mit Iodacetamid.

3.6 Untersuchungen zum aktiven Zentrum des Enzyms

3.6.1 Photoaffinitätsmarkierung der sauren Ceramidase

Durch Affinitätsmarkierung der sauren Ceramidase sollen Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms identifiziert werden. Bei der Photoaffinitätsmarkierung setzt man ein durch Licht aktivierbares Analogon des natürlichen Substrats ein. Photoaffinitätsligand und Enzym werden inkubiert, der Ligand als Substrat erkannt und gebunden. Bevor das Substrat gespalten wird und der Enzym-Substrat-Komplex zerfällt, wird das Reaktionsgemisch belichtet. Dadurch bildet die photolabile Gruppe ein hochreaktives Intermediat, welches im Enzym-Substrat-Komplex eine kovalente Bindung zwischen Substrat und einer Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms ausbildet. Diese Bindung ist kovalent und bleibt während der weiteren Aufarbeitung bestehen. Das Protein wird anschließend proteolytisch gespalten und die modifizierten Aminosäuren nach Isolation der entstandenen Peptide identifiziert.

Als photoaktivierbare Spezies wurde ein Substratanalogon mit Trifluormethylphenyldiaziriny-Gruppe eingesetzt. Unbelichtet ist diese Diazirin-Verbindung bei gedämpftem Tageslicht gut handhabbar und chemisch in mittelstarken Säuren und Basen stabil (Brunner et al., 1980). Durch Belichtung des Liganden mit UV-Strahlung der Wellenlänge 360 nm entsteht unter Stickstoff-Freisetzung ein sehr reaktives Carben, das innerhalb von Nanosekunden in benachbarte Bindungen inseriert. Ein weiterer Vorteil der Diazirin-Gruppe ist, dass die Amidbindungen innerhalb des Proteins nicht durch Licht der Wellenlänge 360 nm gespalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)propanoyl-sphinganin auf seine Eignung als Photoaffinitätsligand der sauren Ceramidase untersucht (Abb. 3.25). Zur besseren Detektierbarkeit der markierten Peptide wurde acyliertes [4,5-³H]-Sphinganin (500 Ci/mol) verwendet.

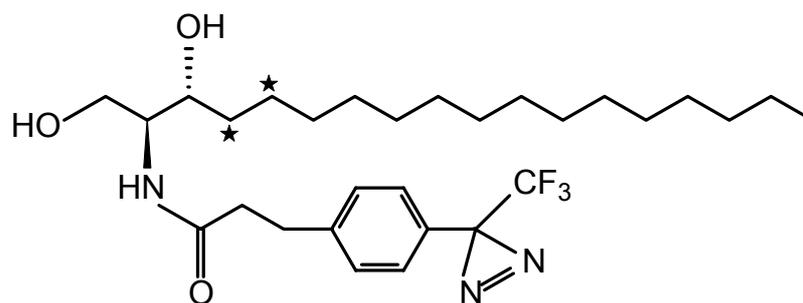


Abb. 3.25: Struktur des 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)propanoyl-sphinganins.

★ = Position der Tritium-Markierung

Von entscheidender Bedeutung für die Markierung eines Aminosäurerestes im aktiven Zentrum des Enzyms ist, ob die Verbindung tatsächlich als Ligand erkannt und in der Substratbindungsstelle gebunden wird. Zunächst wurde daher getestet, ob die saure

Ceramidase den Photoaffinitätsliganden als Substrat erkennt, die Amidbindung spaltet, und [^3H]-Sphingarin freisetzt. Dazu wurde 1 nmol Photosonde (gelöst in Ethanol) mit 0,1 nmol saure Ceramidase auf Eis und bei 37°C für 40 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch *reversed phase*-Chromatographie entsalzt. Die lipophilen Verbindungen binden an das Chromatographie-Material. Eluiert wurde zunächst mit Methanol, dann mit Methanol/Chloroform (1:1, v/v). Die Eluatfraktionen wurden auf Radioaktivität untersucht. Die methanolische Fraktion enthielt fast die gesamte aufgetragene Radioaktivität. In der Chloroform/Methanol-Fraktion, wurde keine Radioaktivität nachgewiesen. Die radioaktive Eluatfraktion wurden dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und autoradiographisch mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht. Dabei wurde ausschließlich ungespaltener Photoaffinitätsligand detektiert, [^3H]-Sphingarin, dass durch den Abbau des Photoaffinitätsliganden entstanden wäre, wurde nicht nachgewiesen (Abb. 3.26). Um Artefakte bei der Solubilisierung auszuschließen, wurde der Ligand zur Kontrolle auch, wie beim mizellaren Aktivitätstest beschrieben, in Detergenzien solubilisiert. Auch unter diesen Bedingungen wurde kein Sphingarin, sondern nur Photoaffinitätsligand detektiert.

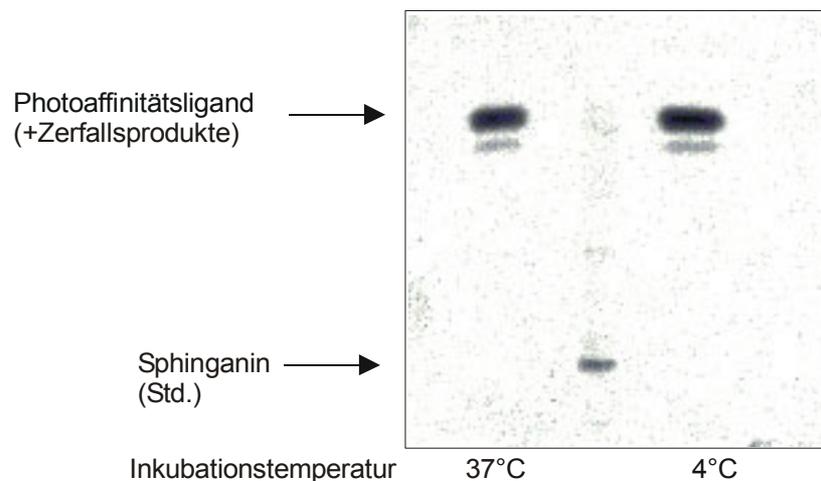


Abb. 3.26: Dünnschichtchromatographische Trennung der radioaktiven Fraktionen der *reversed phase*-Trennung nach Inkubation der sauren Ceramidase mit dem Photoaffinitätsliganden bei 37°C und bei 4°C. Nur die Methanol-Fraktionen enthielten Radioaktivität und sind hier aufgetragen, die Chloroform/Methanol-Fraktionen enthielten keine Radioaktivität. Std. = [^3H]-Sphingarin, 50 000 cpm/Bahn, Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2\text{N NH}_3$ 30:10:1 (v/v/v). Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Radioscanner bestimmt

Die Elutionseigenschaften des Sphingarins wurden durch ein Kontrollexperiment überprüft, in dem der Reaktionsmischung vor der *reversed phase*-Chromatographie [^3H]-Sphingarin zugesetzt wurde (Abb. 3.27).

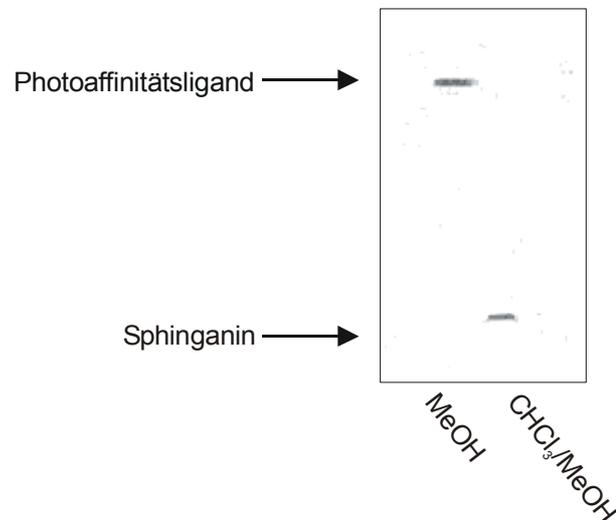


Abb. 3.27: Saure Ceramidase wird mit Photoaffinitätsligand inkubiert, der Reaktionsmischung wird [³H]-Sphingarin zugesetzt, einer Umkehrphasen-Chromatographie unterzogen und die Eluatfraktionen dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Photosonde befindet sich in der Methanol-Fraktion, [³H]-Sphingarin in der Chloroform/Methanol-Fraktion. 20 000 cpm/Bahn, Laufmittel CHCl₃/MeOH/2N NH₃ 30:10:1 (v/v/v). Die Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Radioscanner bestimmt.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass die Amidbindung im Photoaffinitätsliganden von der sauren Ceramidase nicht gespalten wird.

Da man dennoch nicht ausschließen kann, dass die Photosonde nicht doch an der Bindungsstelle des Enzyms gebunden wird, wurde gereinigte saure Ceramidase mit der zehnfachen molaren Menge des Photoaffinitätsliganden zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert und dann 10 Sekunden mit 400 W Leistung im UV-Bereich belichtet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Trypsin proteolytisch gespalten, die Peptide durch *reversed phase*-Chromatographie getrennt und die einzelnen Fraktionen auf Radioaktivität untersucht (Abb. 3.28).

Dabei zeigte sich, dass kein Peptid signifikant markiert wurde. In den Fraktionen, die den Hauptteil der Peptide enthielten, war nur eine geringe Menge an Radioaktivität detektierbar. Fast die gesamte Radioaktivität wurde in den späten Fraktionen eluiert. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass diese Fraktionen zahlreiche Spezies kleiner Masse, aber keine modifizierten Peptide, sondern das Wasserinsertionsprodukt des Photoaffinitätsliganden enthielten (Abb. 3.29). Das Wasserinsertionsprodukt wurde in den Fraktionen 25-30 eluiert.

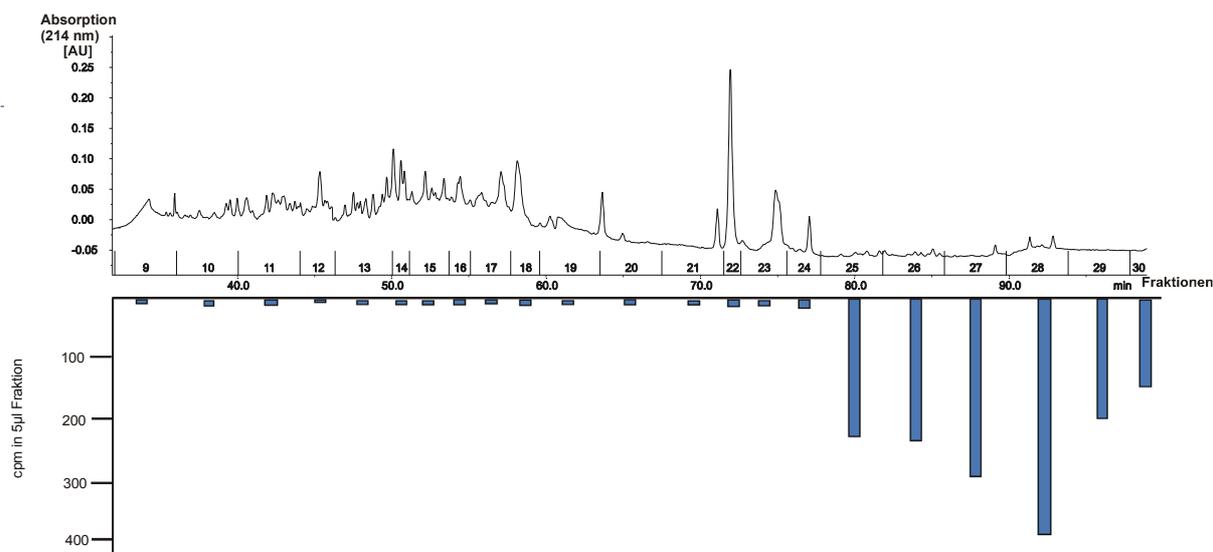
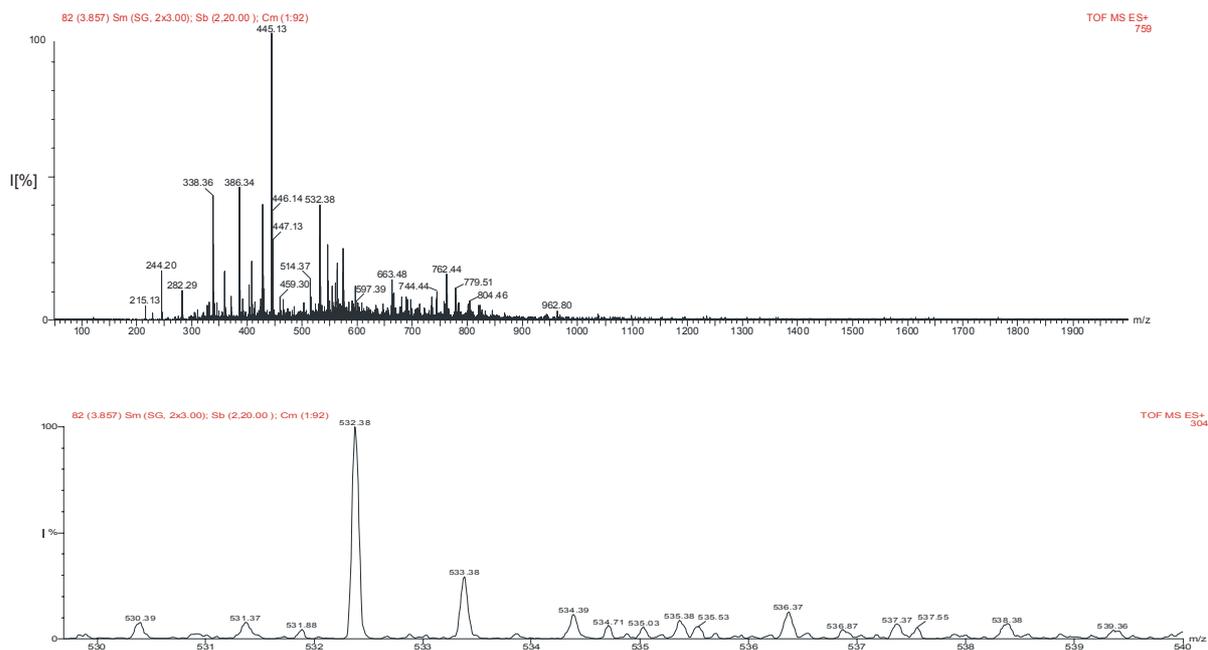


Abb. 3.28: Trennung der Peptide über RP-HPLC (Nucleosil RP18-Säule, Laufmittel A: 0,1% TFA in Wasser, Laufmittel B: 0,06% TFA in 70% Acetonitril, 30% Isopropanol). Eluiert wird mit einem linearen Gradienten von 5-100% B in A zwischen der 25. und der 100. Minute. Darunter ist das Radioaktivitätsprofil der HPLC-Fractionen aufgetragen.



Fragment	$[M+H]^+$	$[M+H]^+$ mit einem $[^3H]$ markiert	$[M+H]^+$ mit zwei $[^3H]$ markiert
Wasserinsertionsprodukt des 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl) propanoyl-sphingarin	theoret. 532,35	Theoret. 534,35	theoret. 536,35
	exp. bestimmt 532,38	exp. bestimmt 534,39	exp. bestimmt 536,37

Abb. 3.29: ESI-Massenspektrum der Fraktion 28 und Ausschnittvergrößerung. Darunter die Massen der Wasserinsertionsprodukte in Dalton.

3.6.2 Markierung der sauren Ceramidase mit N-Bromacetylsphingosin

N-Bromacetylsphingosin (BAS) (Abb. 3.30) wurde von Linke als kovalenter Inhibitor der sauren Ceramidase beschrieben (Linke, 2000). In einer Konzentration von 100 nM reduzierte BAS die Aktivität des Enzyms auf annähernd null. Die Enzymaktivität liess sich auch nach Entfernen des Inhibitors durch Dialyse nicht wiederherstellen (Linke, 2000). Allerdings wurde bei Inkubation der sauren Ceramidase mit BAS eine Freisetzung von Sphingosin beobachtet. Wurde im mizellaren Aktivitätstest der sauren Ceramidase das Substrat durch 50 μM BAS ersetzt, so wurden 34 nmol Sphingosin $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ freigesetzt. Im BAS hat das Bromatom einen elektronenziehenden Effekt, das benachbarte C-Atom trägt daher eine positive Teilladung und kann mit einem Nucleophil reagieren. Wenn BAS von der sauren Ceramidase als Substratanalogon erkannt und gebunden wird, so handelt es sich bei dem Nucleophil idealerweise um einen Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Enzyms. Bromacetylderivate wurden bereits eingesetzt, um das aktive Zentrum der Carboxypeptidase und der Isocitrat-Lyase zu markieren (Roche und McFadden, 1969; Hass und Neurath, 1971). Der Vorteil gegenüber anderen Markierungssubstanzen, wie z.B. Iodacetamid, besteht in der höheren Stabilität der Verbindung in wässriger Lösung und in einer vermeintlich größeren Spezifität (Wilchek und Givol, 1977). Inkubation der sauren Ceramidase mit BAS und anschliessende proteolytische Trennung der Peptide sollte Informationen über die modifizierten Aminosäurereste liefern. Zur besseren Identifizierung der modifizierten Aminosäurereste wurde BAS mit einer [^{14}C]-Markierung (37,5 Ci/mol) synthetisiert.

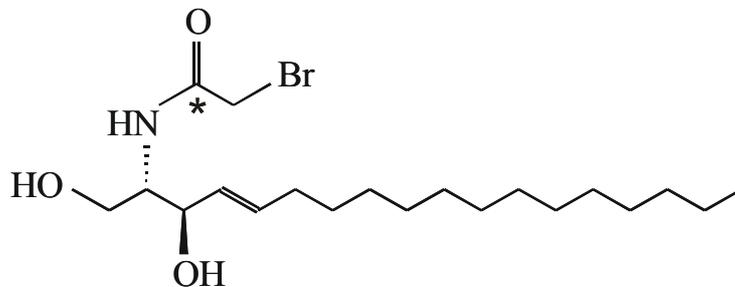


Abb. 3.30: Struktur von N-Bromacetylsphingosin (BAS). * = Position des [^{14}C]-Atoms.

Inkubiert man die saure Ceramidase mit [^{14}C]-BAS, so wurden beiden Untereinheiten der sauren Ceramidase radioaktiv markiert (Abb. 3.31) (siehe auch Linke, 2000).

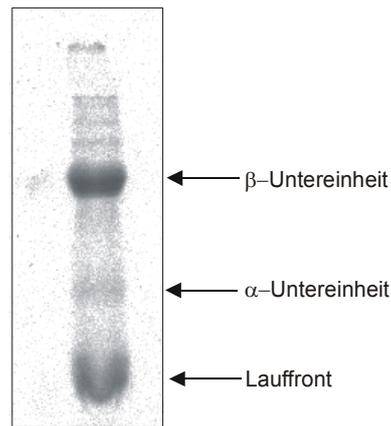


Abb. 3.31: [^{14}C]-BAS bindet an beide Untereinheiten der sauren Ceramidase.

5 μg saure Ceramidase wurden mit 0,2 μCi [^{14}C]-BAS bei pH 4 inkubiert und dann einer Acetonfällung unterzogen. Da dabei auch ein Teil des Affinitätsliganden mitgefällt wird, ist die Lauffront als radioaktive Bande erkennbar. Das Präzipitat wurde in reduzierendem Probenpuffer gelöst, einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen und die Radioaktivitätsverteilung mit dem Radioscanner bestimmt.

Proteolytische Spaltung des Proteins und Trennung der Peptide mittels HPLC (Abb. 3.32) zeigte, dass sich der grösste Teil der Radioaktivität im Säulendurchlauf (Fraktion 3) befand.

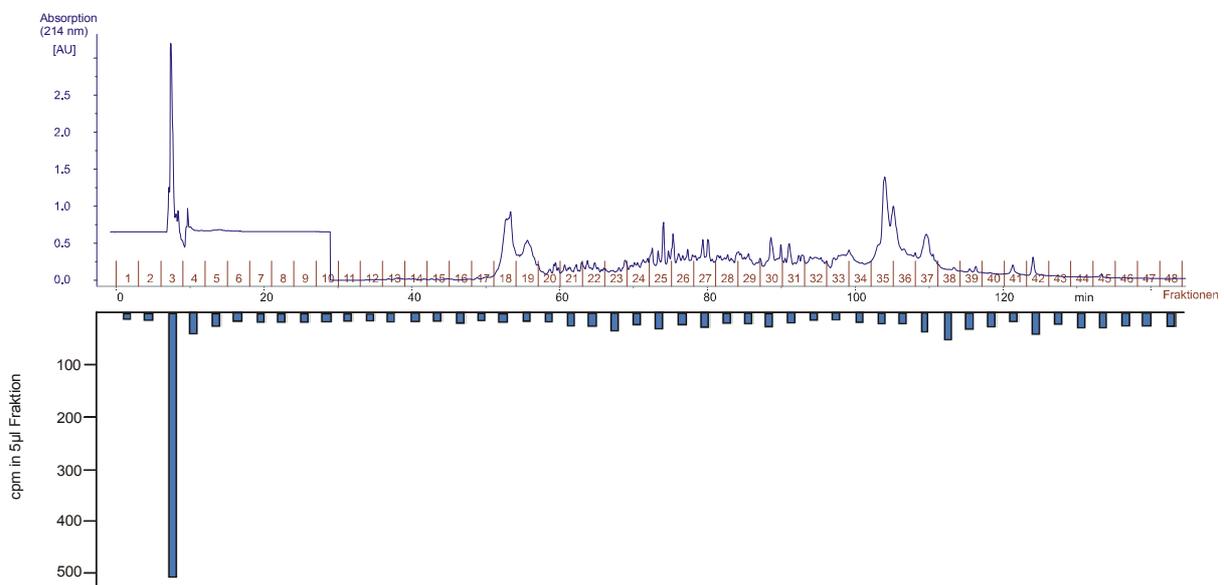


Abb. 3.32: Trennung der tryptischen Peptide der, zuvor mit [^{14}C]-BAS markierten sauren Ceramidase über *reversed phase* HPLC (Nucleosil RP18-Säule, Laufmittel A: 0,1% TFA in Wasser, Laufmittel B: 0,06% TFA in 70% Acetonitril, 30% Isopropanol, eluiert wird mit einem linearen Gradienten von 5-100% B in A zwischen der 40. und der 120. Minute, nach 30 min wurde die Absorption auf null gesetzt). Darunter ist das Radioaktivitätsprofil der HPLC-Fractionen aufgetragen.

Die restliche Radioaktivität wurde in späteren Fraktionen unspezifisch eluiert. Vermutlich enthält Fraktion 3 Zerfallsprodukte des Affinitätsliganden. Die Radioaktivität konnte keiner der in dieser Fraktion zahlreich vorkommenden kleineren Verbindungen zugeordnet werden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit BAS markierte Peptide auf der *reversed phase*-Säule verbleiben und nicht eluiert werden.

Die Markierung des Proteins war vom pH-Wert, bei dem Affinitätsligand und Protein miteinander inkubiert wurden, unabhängig (Abb. 3.33). Beide Untereinheiten der sauren Ceramidase wurden sowohl bei einem pH-Wert von 4 als auch bei einem pH-Wert von 7,8 markiert. Die Markierung des Enzyms war auch unabhängig von der Inkubationstemperatur. Das Enzym wurde bei einer Inkubationstemperatur von 4°C ebenso markiert, wie bei 37°C. Bei den hier gezeigten SDS-PAGE-Gelen wurde das Protein nach der Inkubation mit Aceton gefällt. Auch wenn das Pellet vor dem Auflösen in Probenpuffer gewaschen wurde, verblieb dabei ein erheblicher Anteil der Radioaktivität nicht kovalent gebunden am Protein. Dieser Teil der Radioaktivität war nach der elektrophoretischen Auftrennung in der Lauffront des Gels nachweisbar. Daher wurde das Protein, alternativ zur Acetonfällung, durch Tangentialflussfiltration vom Reaktionsgemisch abgetrennt. Diese Methode führte zum identischen Ergebnis, beide Untereinheiten der sauren Ceramidase waren radioaktiv markiert und in der Front war nicht-kovalent gebundenes BAS nachweisbar.

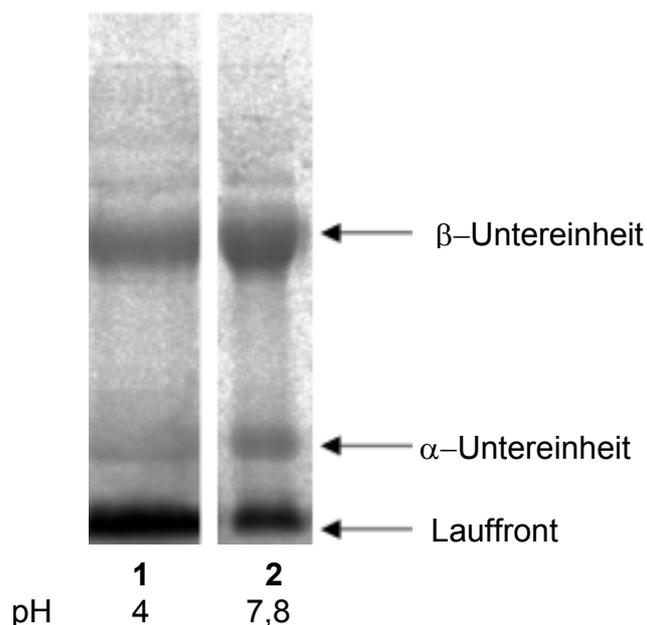


Abb. 3.33: Die Markierung der sauren Ceramidase mit BAS ist vom pH-Wert unabhängig.

Bahn 1: saure Ceramidase wurde bei pH 4 (250 mM Natriumacetat-Puffer) inkubiert.

Bahn 2: saure Ceramidase wurde bei pH 7,8 (25 mM Amoniumacetat-Puffer) inkubiert.

Das Protein wurde jeweils mit Aceton gefällt und nach Auflösen in Probenpuffer einer SDS-PAGE Analyse unter reduzierenden Bedingungen unterzogen. Die

Radioaktivitätsverteilung wurde mit dem Radioscanner bestimmt

Die bisher beschriebenen Markierungsexperimente fanden mit einer Inhibitorkonzentration von 50 μM statt, dh. unterhalb des K_m -Werts des Enzyms von 58 μM , der im mizellaren Assay bestimmt wurde. Die Versuche wurden auch bei einer höheren Inhibitorkonzentration (1,5 mM, bzw. einem 150 fachen molaren Überschuss) durchgeführt. Auch bei dieser hohen Konzentration wurden beide Untereinheiten des Enzyms durch BAS markiert.

Nach tryptischem Verdau wurden die Peptide wieder durch *reversed phase*-Chromatographie getrennt und in den einzelnen Fraktionen die Radioaktivität bestimmt (Abb. 3.34). Der Hauptteil der Radioaktivität befand sich wieder in Fraktion 3, dem Säulendurchlauf. Ein erheblicher Anteil der Radioaktivität wurde jedoch später eluiert. In den Fraktionen 27 bis 30 waren zwar Peptide vorhanden, die breite Verteilung der Radioaktivität legt jedoch nahe, dass die Markierung auch hier unspezifisch erfolgt ist, bzw., dass es sich um Zerfallsprodukte des Liganden handelt. Es konnten hier keine markierten Peptide isoliert werden. In den Fraktionen 31-40 wurden massenspektrometrisch keine Peptide nachgewiesen.

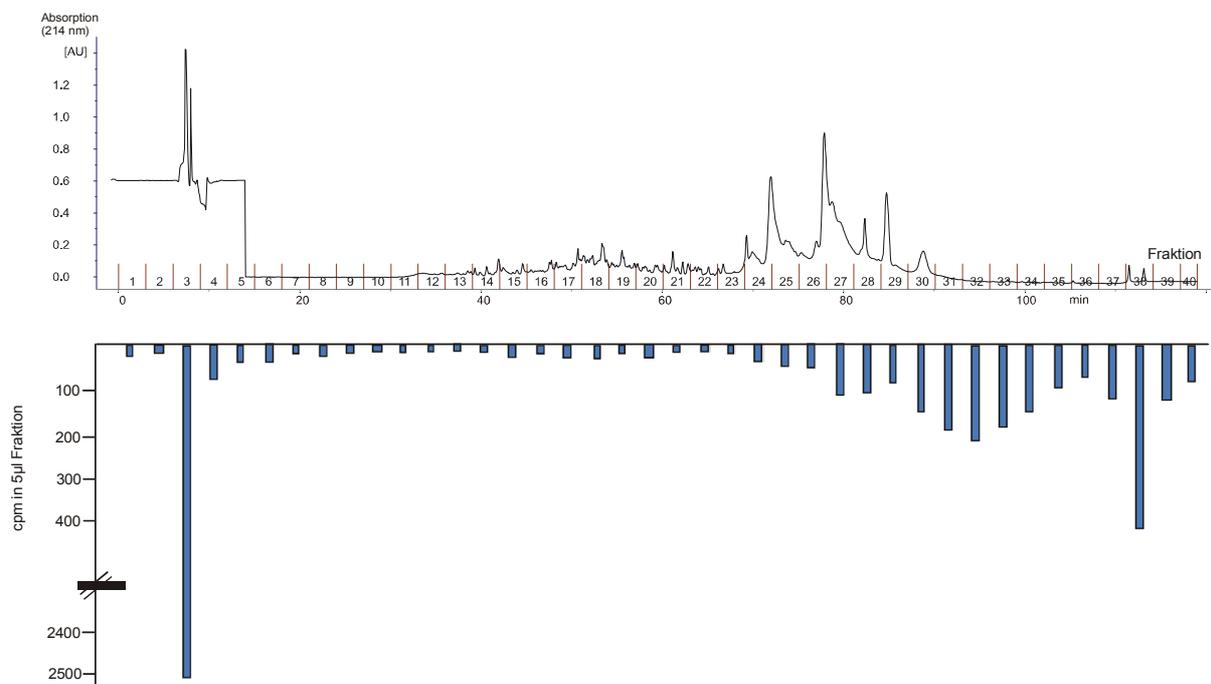


Abb. 3.34: Trennung der tryptischen Peptide der, zuvor mit 8,4 μCi [^{14}C]-BAS markierten, sauren Ceramidase über RP-HPLC (Nucleosil RP18-Säule, Laufmittel A: 0,1% TFA in Wasser, Laufmittel B: 0,06% TFA in 70% Acetonitril, 30% Isopropanol, eluiert wird mit einem linearen Gradienten von 5-100% B in A zwischen der 30. und der 100. Minute, nach 15 min wurde die Absorption auf null gesetzt). Darunter ist das Radioaktivitätsprofil der HPLC-Fraktionen aufgetragen.

Fraktion 38 enthält unzersetzten Liganden (Abb. 3.35, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 444,24 durch das charakteristische Isotopenmuster des ^{79}Br und ^{81}Br mit einem Peak annähernd gleicher

3 Ergebnisse

Intensität bei $m/z=446,24$). In keiner anderen Fraktion konnte die Radioaktivität einer bestimmten Spezies zugeordnet werden.

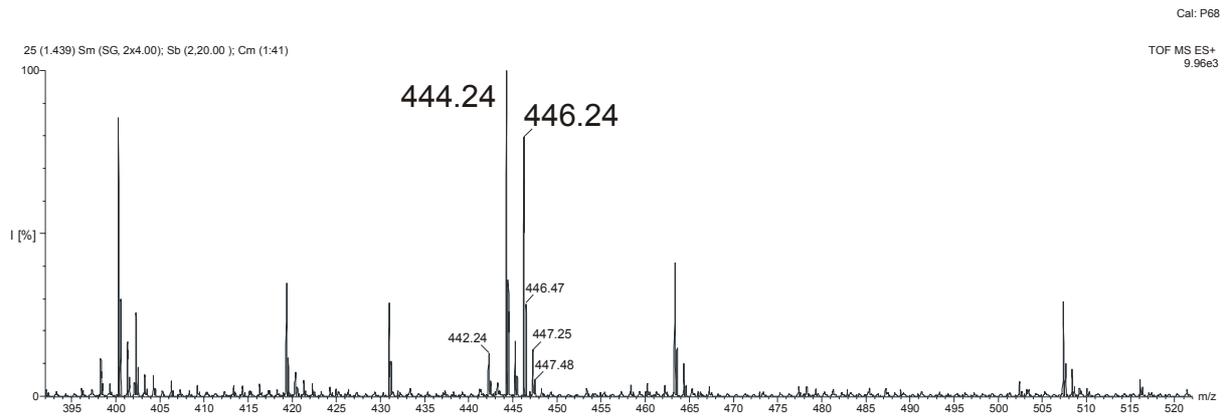


Abb. 3.35: ESI-Spektrum der Fraktion 38. Diese Fraktion enthält unzersetztes BAS.

4 Diskussion

Strukturuntersuchungen an Proteinen, wie z. B. Röntgenstruktorexperimente erfordern Protein-Präparate hoher Reinheit in relativ großen Mengen. In früheren Studien wurde die saure Ceramidase aus Urin von Peritonitis-Patienten und aus menschlicher Plazenta zur Homogenität gereinigt (Bernardo et al., 1995). Nachteile dieses Verfahrens sind, dass menschliches Gewebe nicht immer verfügbar und die Ausbeute gering ist. Ausserdem kann eine, die strukturellen Untersuchungen erschwerende Koaufrreinigung anderer Proteine nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem etabliert, mit dem homogene Präparationen des reifen Enzym in ausreichender Menge gewonnen werden können.

4.1 Expression humaner saurer Ceramidase in Insektenzellen, Prozessierung und Reinigung des reifen Enzyms

Die bestehende Expression der sauren Ceramidase in *Sf-21* Zellen mit Hilfe von Baculoviren zeigte, dass neben der reifen, prozessierten Form des Enzyms auch der Vorläufer in das Medium sezerniert wurde. Der Anteil des unprozessierten Enzyms betrug dabei bis zu 50% (Bartelsen, 1999). Da Vorläufer und prozessierte Form sehr ähnliche Eigenschaften haben, schlugen alle Versuche, die beiden Formen ohne Denaturierung der Proteine voneinander zu trennen, fehl. Die Kristallisation des Enzyms zur Röntgenstrukturanalyse erfordert aber ein homogenes Proteinpräparat. Daher wurde ein Expressionsverfahren mit anschliessender Prozessierung entwickelt, mit dem reines, prozessiertes Enzyms im mg-Maßstab gewonnen werden kann. Die Expression des Proteins erfolgte in Schüttelkolben in serumfreiem Zellkulturmedium. Die Expression der sauren Ceramidase wurde durch die Abwesenheit von Serumproteinen sehr erleichtert, da die Zellen nicht vor der Infektion an serumfreies Medium adaptiert werden mussten. Die Baculovirus-infizierten Insektenzellen sekretierten zunächst das Vorläufer-Protein in das Medium. Nach drei Tagen Expression ist nur die unprozessierte Form der sauren Ceramidase im Expressionsüberstand nachweisbar. Die Aufreinigung des reinen Vorläufer schlug allerdings fehl, da der Vorläufer während der Reinigung zum Teil prozessiert wurde. Nach fünf Tagen Expression sind im Überstand, sowohl Vorläufer, als auch prozessiertes Enzym nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Expression durch Entfernung der Zellen beendet und der zellfreie Expressionsüberstand auf einen lysosomalen pH-Wert von 4,2-4,3 angesäuert und bei 37°C inkubiert. Dabei erfolgte der Spaltung des Vorläuferproteins in die beiden Untereinheiten des reifen Proteins. Der Mechanismus der Spaltung zwischen den Aminosäureresten Isoleucin121 und Cystein122 ist unbekannt. Diskutiert wird eine autokatalytische Spaltung, aber auch ein Protease-katalysierter Mechanismus ist möglich. Die Anwesenheit von Proteasen im Zellkulturüberstand ist wahrscheinlich, da während der Expression ein Teil der Zellen lysiert

wurde. Die Proteasen können auch in das Medium sekretiert worden sein. Nach fünf Tagen Inkubation bei pH 4,2-4,3 ist im Expressionsüberstand durch Western Blot-Analyse und MALDI-Massenspektrometrie nur noch prozessierte Form nachweisbar.

Die anschließende Reinigung der rekombinanten sauren Ceramidase aus dem Expressionsmedium der Baculovirus-Expression verläuft sehr schnell und effizient in einem 3-Schritt-Verfahren. Durch Tangentialflussfiltration wurde das Protein konzentriert und der Puffer ausgetauscht. Glykoproteine wurden dann durch Affinitätschromatographie an Concanavalin A isoliert. Trotz der noch vorhandenen Optimierungsmöglichkeiten gelang es mit diesem Reinigungsverfahren, in kurzer Zeit ca. 1 mg Enzyms pro Liter Expressionsmedium zu erhalten. Die saure Ceramidase ist glykosyliert und enzymatisch aktiv, wenn ihre spezifische Aktivität mit $305 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ auch etwas geringer ist, als die für das plazentale Enzym mit $486 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ beschriebene (Linke, 2000).

4.2 Reinigung humaner saurer Ceramidase aus Plazenta

Parallel zur Expression der sauren Ceramidase mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems erfolgte die Reinigung der sauren Ceramidase aus humaner Plazenta in enger Anlehnung an das Protokoll von Linke (Linke et al., 2000). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Ausbeute. Das Enzym hatte mit $340 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, eine etwas geringere spezifische Aktivität als in der Literatur mit $486 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ beschrieben. Aus vier Plazenten wurden nur $550 \mu\text{g}$ saure Ceramidase isoliert. Diese geringe Menge war nicht ausreichend, um detailliert die Glykosylierung und die Disulfidverknüpfung zu untersuchen.

4.3. Posttranslationale Modifikationen der sauren Ceramidase

Sowohl für die Analyse der Disulfidverknüpfungen als auch für die Identifizierung der Zuckerstrukturen wurde eine Kombination aus proteinchemischen und massenspektrometrischen Methoden verwendet. Obwohl diese Methoden extrem empfindlich sind, so benötigen sie doch Proteinmengen im mg-Bereich, die ausschliesslich von dem rekombinanten Enzym zur Verfügung standen.

Deglykosylierungsstudien mit rekombinanter saurer Ceramidase und dem plazentalen Enzym, sowie der Vergleich mit den Literaturwerten zeigte, daß der Anteil der N-Glykosylierung an der Molekülmasse der β -Untereinheit beim rekombinanten Enzym ca. 6 kDa geringer ist als beim plazentalen Protein. Die Masse der N-Glykosylierung beträgt beim plazentalen Enzym ca. 12 kDa (Ferlinz et al., 2001), beim rekombinanten ca. 5,2 kDa. Die N-Glykosylierung der ersten (N152), der vierten (N265) und der fünften potentiellen N-Glykosylierungsstelle konnte identifiziert werden. Für N152 wurde im MALDI-

Massenspektrum sowohl das unglykosylierte tryptische Peptid nachgewiesen, als auch das Peptid mit der einheitlichen Glykosylierung vom Typ GlcNAc₂FucMan₃. Die Glykosylierung an N265 konnte indirekt, während der Bestimmung der Disulfidbrücken ermittelt werden. An dieser Position wurde im MALDI-Spektrum eine Struktur der Form GlcNAc₂FucMan₃ mit partieller Fucosylierung festgestellt. In den ESI-Spektren ist die Dominanz der unfucosylierten Spezies noch deutlicher. Es ist möglich, daß die Fucose bei der Elektrospray-Ionisation abgespalten wird. Die sechste potentielle N-Glykosylierungsstelle liegt im rekombinanten Enzym unglykosyliert vor. Dies entspricht früheren Untersuchungen mit COS-Zellen (Ferlinz et al., 2001). N174 und N238 liegen vermutlich auch glykosyliert vor, dies konnte mit dem rekombinanten Enzym allerdings nicht zweifelsfrei bewiesen werden.

Liegt am proximalen N-Acetylglucosamin-Rest der Core-Struktur eine Fucosylierung vor, wird das N-Glycan nur bei (α 1-6)-verknüpfter Fucose durch PNGaseF entfernt. N-Glykane mit (α 1-3)-verknüpfter Core-Fucose sind PNGaseF resistent (Tretter et al., 1991). Die hier beschriebenen fucosylierten Glykanstrukturen ließen sich durch PNGaseF abspalten, sind also (α 1-6)-verknüpft.

In der vorliegenden Arbeit gelang es zum ersten Mal, die Disulfidverknüpfungen innerhalb der sauren Ceramidase zu lokalisieren. α - und β -Untereinheit der sauren Ceramidase sind über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden. In der Sequenz der α -Untereinheit kommt nur ein Cystein-Rest (C10) vor. Bei einer proteolytischen Spaltung mit Trypsin befindet sich C10 auf dem N-terminalen Peptid T1 der sauren Ceramidase. Dieses Peptid beginnt mit einem Glutamin-Rest, der zum Pyroglutamyl-Rest zyklisiert ist und ist mit T36 verbunden, das C319 enthält.

Zur Aufklärung des Redox-Zustands der restlichen vier Cysteine wurden 2 nmol rekombinante saure Ceramidase mit [¹⁴C]-Jodacetamid mit einer spezifischen Aktivität von 58 Ci/mol inkubiert. Nach proteolytischer Spaltung und Trennung der Peptide wurde in fast jeder Fraktion der *reversed phase* Trennung Radioaktivität aus Nebenreaktionen nachgewiesen, besonders viel in den ersten Fraktionen, in denen die hydrophileren Peptide eluiert werden. Bei vollständiger Alkylierung einer Thiolgruppe sollte ein Peptid mit einer Thiolgruppe eine spezifische Radioaktivität von ca. 257000 cpm zeigen. Da keine Fraktion auch nur annähernd so viel Radioaktivität enthielt, wurde davon ausgegangen, dass die saure Ceramidase keine freien Cystein-Reste enthält. Massenspektrometrisch wurde nachgewiesen, dass C122, der N-terminale Aminosäurerest der β -Untereinheit, mit C271 verbunden ist. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die saure Ceramidase möglicherweise zur Familie der Ntn-Hydrolasen gehört. Ein gemeinsames Strukturmerkmal dieser Enzyme ist der nucleophile N-Terminus, der entweder ein Cystein-, Threonin- oder Serin-Rest ist. Bei der sauren Ceramidase besteht der N-Terminus der β -Untereinheit aus der Abfolge Cystein-Threonin-Serin. Es wurde daher vermutet, dass dieser Cystein-Rest ein Teil des katalytisch

aktiven Zentrums des Enzyms ist. Ein möglicher Mechanismus der Amidspaltung durch eine Ntn-Hydrolase ist in Abbildung 4.1 abgebildet.

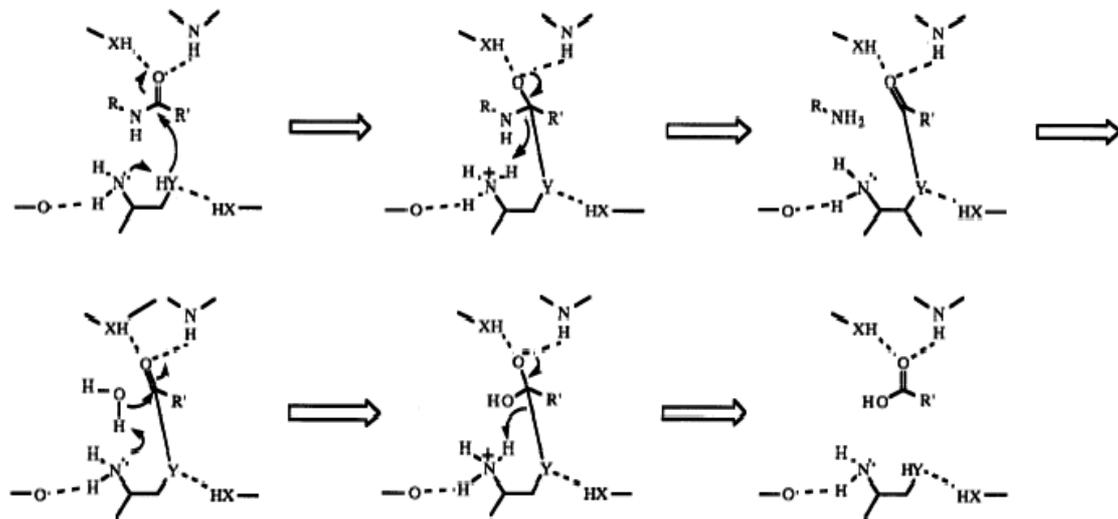


Abb. 4.1: Möglicher Katalysemechanismus der Ntn-Hydrolasen (aus Oinonen und Rouvinen, 2000). Y steht für Sauerstoff oder Schwefel. Zu Beginn der Reaktion gibt das Nucleophil sein Proton intramolekular an die N-terminale α -Aminogruppe ab und attackiert die Carbonylgruppe der Amidbindung des Substrats. Dabei bildet sich ein tetraedrisches Enzym-Substrat-Intermediat, das sich durch Verlust der Aminokomponente stabilisiert. Nachfolgend wird das kovalente Enzym-Substrat-Intermediat hydrolysiert.

In dieser Arbeit wurde aber gezeigt, dass dieser Cystein-Rest in einer Disulfid-Brücke verbunden ist, und damit für den katalytischen Mechanismus nicht zur Verfügung steht. Ausgehend von den angewendeten Methoden lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob dies für die gesamte Proteinpräparation gilt, oder ob nicht doch kein kleiner Teil des Enzyms ohne diese Brücke vorliegt. Sollte ein Promill der Proteinpräparation ohne diese Disulfidbrücke vorliegen, so lägen unter den gewählten Reaktionsbedingungen 2 pmol Peptid mit freiem C122 vor. Das verwendete [^{14}C]-Jodacetamid könnte diese 2 pmol Peptid mit einer radioaktiven Markierung von 257 cpm versehen. Die Radioaktivität in der entsprechenden *reversed phase*-Fraktion wäre also maximal um 257 cpm erhöht. Dies wäre, da die Radioaktivität in fast jeder Fraktion erhöht ist, nicht nachweisbar.

Die Theorie, dass nur ein Teil der Proteinpräparation enzymatisch aktiv ist, würde auch die geringere spezifische Aktivität der sauren Ceramidase erklären. Die aus humaner Plazenta gereinigte saure Sphingomyelinase hat eine spezifische Aktivität von $1000 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Lansmann et al., 1996), die plazentale saure Ceramidase dagegen nur von ca. $0,5 \mu\text{mol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (Linke et al., 2000). Ausgehend von den Ergebnissen der Reinigung aus

humaner Plazenta, enthalten Lysosomen aber ca. 100 mal mehr saure Ceramidase als saure Sphingomyelinase (Lansmann et al., 1996; Linke et al., 2000).

Die Beobachtung, dass die Enzymaktivität der sauren Ceramidase durch Zugabe von TCEP, also durch Reduktion, steigt, spricht ebenfalls für einen Cystein-Rest als Teil des aktiven Zentrums. Diese Aktivierung durch Reduktion, wurde auch von Tsuboi für eine N-Acetylethanolamin-hydrolysierende saure Amidase beschrieben, einem Enzym mit großen Ähnlichkeiten zur sauren Ceramidase (Tsuboi et al., 2005).

Die letzte Disulfidbrücke befindet sich in der Nähe des C-Terminus des Peptids. Diese Brücke zwischen C367 und C371 wurde im chymotryptischen Verdau der sauren Ceramidase identifiziert. Zwischen den Cysteinen befinden sich nur drei Aminosäurereste, von denen zwei Prolin-Reste sind, was vermuten läßt, dass sie gemeinsam mit der Disulfidbrücke diesen Bereich des Proteins in einer starren Konformation fixieren.

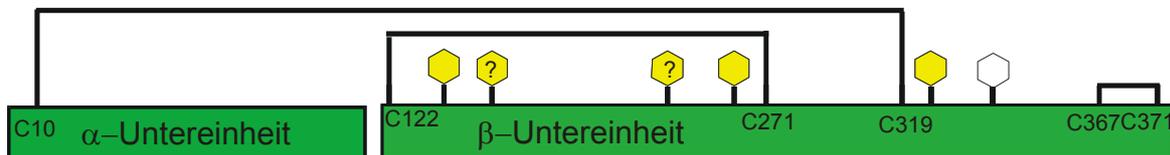


Abb. 4.2: Disulfidbrückenstruktur und Glykosylierung der sauren Ceramidase. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind als Sechsecke dargestellt. Das weiße Sechseck entspricht der nicht genutzten N-Glykosylierungsstelle, Die gelben den genutzten. Unklare sind mit einem Fragezeichen versehen.

4.4 Untersuchungen zum aktiven Zentrum des Enzyms

4.4.1 Photoaffinitätsmarkierung

Es wurde gezeigt, dass 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl) propionyl-sphingarin nicht als Photoaffinitätsligand der sauren Ceramidase geeignet ist. Die Verbindung wurde unter Sättigung der Doppelbindung aus dem Sphingosin-Derivat durch katalytische Tritierung gewonnen. Substratstudien haben gezeigt, dass Dihydroceramid-Derivate weitaus schlechter als Substrat erkannt werden als die entsprechenden Ceramid-Derivate (Tabelle 3). Außerdem spielt die Länge der Fettsäurekette eine große Rolle. Den höchsten Umsatz erzielt man mit N-Lauroylsphingosin; das deswegen auch als Substrat beim Aktivitätstest eingesetzt wird. Ceramid mit einer kürzeren Fettsäurekette, wie z.B. N-Octanoylsphingosin, dass von der Kettenlänge mit der Trifluormethylphenyldiaziriny-Gruppe des Photoaffinitätsliganden vergleichbar ist, werden langsamer umgesetzt.

Substrat	hydrolysiertes Ceramid nmol/(mg x h) (gemessen im mizellaren Assay)
N-Octanoylsphingosin	186
N-Octanoylsphingarin	37
N-Lauroylsphingosin	1235

Tabelle 3: Substratabhängigkeit der sauren Ceramidase (Linke, 2000).

Vermutlich wird das Sphingarin-Derivat nicht als Substratanalogon erkannt und daher nicht an der Substratbindungsstelle gebunden. Bei Belichtung reagiert der Photoaffinitätsligand daher hauptsächlich mit Wasser und auch mit verschiedenen, sich zufällig in der Nähe befindlichen Aminosäureresten des Proteins. Kein Aminosäurerest und keine Proteinregion reagiert bevorzugt mit dem Photoaffinitätsliganden. Aus diesem Grund lässt sich massenspektrometrisch ausschliesslich das Wasserinsertionsprodukt nachweisen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass das bei der Bestrahlung gebildete Carben mit einer Amidbindung zu einem Imidat reagiert, das unter den Bedingungen der *reversed phase*-HPLC-Trennung zerfällt (Abb. 4.3) (Knoll et al., 2000). Die Hydrolyse dieser Imidate führt zu einer Fragmentierung oder Regenerierung des Proteins (Chaturvedi und Schmir, 1968)

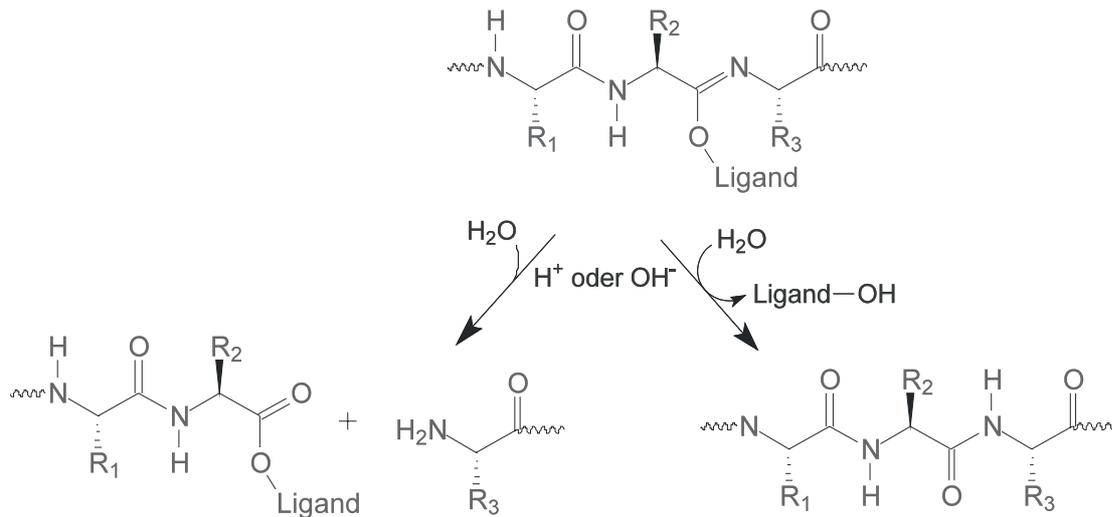


Abb. 4.3: Mechanismus der Hydrolyse von Imidaten (Chaturvedi und Schmir, 1968).

4.4.2 Markierung der sauren Ceramidase mit N-Bromacetylspingosin

N-Bromacetylspingosin wurde als Inhibitor der sauren Ceramidase beschrieben. Bereits in niedrigen Konzentrationen reduzierte er irreversibel die Aktivität des Enzyms auf annähernd null (Linke, 2000). Dieses und die Tatsache, dass Bromacetylderivate bereits erfolgreich zur Markierung aktiver Zentren von Enzymen eingesetzt wurden (Roche und McFadden, 1969; Hass und Neurath, 1971) schien eine Markierung des katalytisch aktiven Zentrums der sauren Ceramidase zu ermöglichen. Der Inhibitor erwies sich allerdings als unspezifisch. Inkubation der sauren Ceramidase mit radioaktiv markiertem BAS und anschließender SDS-PAGE-Analyse führt zur Markierung beider Untereinheiten. Ob die Bindung von BAS an das Enzym kovalent war oder es sich um eine sehr stabile nicht-kovalente Wechselwirkung handelt, ist unklar. Die Markierung des Enzyms war pH-Wert und Temperatur unabhängig, was auf eine geringe Spezifität des Inhibitor hindeutet. Dennoch wurde die durch [^{14}C]-BAS markierte saure Ceramidase tryptisch verdaut und die Peptide mittels *reversed phase*-HPLC getrennt. Das Radioaktivitätsprofil der einzelnen Fraktionen dieser Trennung unterschied sich dabei je nach Konzentration an [^{14}C]-BAS. Inkubiert man die saure Ceramidase mit 50 μM Inhibitor, also unterhalb des K_M -Wertes des Enzyms von 58 μM , so erhält man lediglich im Säulendurchlauf der HPLC eine signifikant erhöhte Radioaktivitätsmenge. Peptide konnten in den ersten Fraktion der *reversed phase* HPLC nicht nachgewiesen werden. Diese Fraktionen enthielten möglicherweise radioaktive Bromessigsäure, die durch Spaltung des Bromacetylspingosins entstanden war. Auch wenn Bromacetylspingosin in nanomolarer Konzentration die enzymatische Aktivität der sauren Ceramidase inhibierte, so führte die Inkubation des Enzyms mit höheren Konzentrationen an Bromacetylspingosin doch zu einer Freisetzung von Spingosin und damit auch von Bromessigsäure. Die

Bromessigsäure selbst könnte mit freien Cysteinen reagieren und so zu einem Aktivitätsverlust der sauren Ceramidase führen. Es läßt sich also keine Aussage darüber treffen, ob die Inhibierung und Markierung des Enzyms auf einer Reaktion mit Bromessigsäure oder mit Bromacetylsphingosin beruhte.

Inkubiert man die saure Ceramidase mit 1,5 mM [¹⁴C]-BAS, erhält man, neben der stark erhöhten Radioaktivität im Durchlauf, auch einen Anstieg der Radioaktivität in den späten Fraktionen der Trennung, wobei nur eine Fraktion herausstach. In dieser Fraktion wurde unzersetzter Ligand massenspektrometrisch nachgewiesen. In keiner der späten Fraktionen konnte ein spezifisch markiertes Peptid nachgewiesen werden. BAS scheint nicht sehr spezifisch mit der sauren Ceramidase zu reagieren. Es besteht, wie bei dem Photoaffinitätsliganden, die Möglichkeit, dass BAS mit einer Amidbindung im Protein zu einem Imidat reagiert, dass bei der HPLC gespalten wird.

5. Zusammenfassung

Die humane saure Ceramidase katalysiert den letzten Schritt des lysosomalen Sphingolipid-Abbaus, die Hydrolyse von Ceramid zu Sphingosin und Fettsäure. Mutationen im Gen der sauren Ceramidase führen zur Farberschen Krankheit. Die saure Ceramidase ist ein heterodimeres Glykoprotein, das nach Abspaltung einer Signalsequenz aus einem monomeren Vorläufer-Protein durch Spaltung zwischen Isoleucin121 und Cystein122 hervorgeht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, ausschliesslich prozessiertes, aktives Enzym im Milligramm-Maßstab herzustellen. Infektion von *Sf-9* Zellen mit rekombinantem Baculovirus, der die cDNA des Vorläufers der humanen sauren Ceramidase enthält, führte zu einem Gemisch von Vorläufer und prozessierter saurer Ceramidase im Expressionsüberstand. Der Vorläufer wurde durch Ansäuern des Expressionsüberstands prozessiert und die reife saure Ceramidase in einem 3-Schritt-Verfahren bis annähernd zur Homogenität gereinigt.

Durch massenspektrometrische Analyse der tryptischen Glykopeptide konnte die N-Glykosylierung an 4 der 6 potentiellen N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden. An N152 wurde eine fucosylierte Core-Struktur $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})\text{Man}_3$ identifiziert. N174 und N238 liegen wahrscheinlich auch glykosyliert vor, da Hinweise auf die entsprechenden deglykosylierten Peptide gefunden wurden. Die glykosylierte Spezies wurden nicht identifiziert. N265 wurde im MALDI-Massenspektrum sowohl unglykosyliert, als auch mit $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ nachgewiesen. An N321 liegt eine heterogene Glykosylierung aus $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})\text{Man}_3$ und $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$ vor. N327 ist nicht glykosyliert.

Die Disulfidverknüpfung der insgesamt 6 Cystein-Reste der sauren Ceramidase konnte in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden. Durch proteolytische Spaltung und massenspektrometrische Analyse der durch *reversed phase*-HPLC getrennten Peptide wurden Disulfidbrücken zwischen C10 und C319, zwischen C122 und C271 und zwischen C367 und C371 nachgewiesen.

Die Verknüpfung von C122 widerspricht der Vermutung, dass es sich bei C122 um ein freies Cystein im katalytisch aktiven Zentrum des Enzyms handelt. Ob C122 in der gesamten Proteinpräparation als Teil einer Disulfid-Brücke vorliegt, oder ob ein kleiner Teil der Proteinpräparation über ein freies C122 verfügt, konnte mit den angewendeten Methoden nicht festgestellt werden.

Tritium-markiertes 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)propanoyl-sphinganin wurde auf seine Eignung, als Photoaffinitätsligand kovalent an Aminosäurereste im aktiven Zentrum der sauren Ceramidase zu binden, untersucht. Das Sphinganin-Derivat wurde jedoch von der sauren Ceramidase nicht als Substrat erkannt, was ein Voraussetzung für die Markierung

des aktiven Zentrums ist. Es konnte lediglich das Wasserinsertionsprodukt des Photoaffinitätsliganden nachgewiesen werden.

N-Bromacetylsphingosin wurde als kovalenter Inhibitor der sauren Ceramidase beschrieben (Linke, 2000). Allerdings erfolgt die Reaktion mit dem Enzym unspezifisch. Es konnte daher keine Proteinregion isoliert werden, die bevorzugt mit dem Liganden reagiert.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Geräte

Gerät / Typ	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Analytische HPLC LC-10AT	Shimadzu	Duisburg
Autosampler AS-10	BioRad	München
Bedampfungsanlage BAL-TEC MED 020	Boeckeler Instruments	Tucson, USA
Blotapparatur Mini-Transblot	BioRad	München
ESI-TOF Massenspektrometer Q-TOF2	Micromass	Manchester, GB
Floureszenz-Detektor RF-10A _{XL}	Shimadzu	Duisburg
Gelapparatur Mini-Protean II	BioRad	München
Geltrockner Maxidry D64	Biometra	Göttingen
LiposoFast low pressure homogenizer	Avestin	Ottawa, CAN
MALDI-TOF Massenspektrometer TOFSpec E	Micromass	Manchester, GB
Mixer Waring-blender	Bender & Hobein	Zürich, CH
Narrow bore HPLC SMART-System	Pharmacia Biosystems	Freiburg
pH-Meter pH 537	WTW	Weilheim
Photometer Multiscan Ascent	Labsystems	Helsinki, FIN
Pipettenzieher	Narishige	Tokyo, JP
Präparative HPLC, BioCAD [®] Sprint	PE Biosystems	Freiburg
Pumpe Masterflex mit easy load Kopf	Novodirect	Kehl
Radioscanner Fuji BAS 1000 Imaging Analyzer	Fuji Photo Film Co	Tokyo, JP
Reinstwasseranlage Easypure UV/UF	Barnsted/Werner	Leverkusen
Schüttelinkubator Multitron HT	Infors	Einsbach
Schüttelwasserbad 1083	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Spannungsquelle Modell 250/2,5	BioRad	München
SpeedVac AES 1000	Savant Instruments	Farmingdale, USA
Szintillationszähler TRI-CARB 1900 CA	Canberra Packard	San Francisco, USA
Ultra Turrax TP 1810	Janke & Kunkel	Staufen
Ultramed 200 W-Strahler	Osram	München
Ultraschallgerät Cup Horn	Branson	Branson, USA
Zentrifugen: Tischzentrifuge 5414	Eppendorf	Hamburg
RC-5B (Rotor JA-10)	Sorvall	Bad Homburg
5414 C	Eppendorf	Hamburg

6.1.2 Säulenmaterialien

Material	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Concanavalin A-Sepharose	Sigma	Taufkirchen
Fractogel EMD DMAE-650 (M)	Merck	Darmstadt
Matrex Gel Red A	Millipore	Molsheim, F
Octylsepharose 4B	Sigma	Taufkirchen

6.1.3 Chromatographie-Säulen

HPLC-Säulen	Hersteller / Vertreiber	Sitz
LiChroCART 125-4 Nucleosil 5 C18	Merck	Darmstadt
Nucleosil-120 C18, 2x250 mm	Knauer	Berlin
BioCad-Leeräulen	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Omnifit Glassäulen (ID = 10mm und 25 mm)	msscintific	Berlin

6.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Reagenz	Hersteller / Vertreiber	Sitz
Acetonitril LiChrosolv®	Merck	Darmstadt
Acrylamidmix 29:1, 30%	BioRad	München
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Merck	Darmstadt
Bicinchoninsäure-Lösung (BCA)	Sigma	Taufkirchen
Bismonoacylglycerophosphat (BMP)	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
Borosilicatglas-Kapillaren mit Filament (Länge 1060 mm, Da= 1,00 mm, Di=0,8 mm, Wandstärke=0,1 mm)	Hilgenberg	Malsfeld
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
Carbograph Ultra-clean Graphitsäule	Alltech	Unterhaching
Cholesterol	Sigma	Taufkirchen
Coomassie Blue R250	Serva	Heidelberg
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	Sigma	Taufkirchen
3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS)	Sigma	Taufkirchen
3,5-Dimethoxy-4-hydroxymizsäure (Sinapinsäure)	Sigma	Taufkirchen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma	Taufkirchen
Essigsäure	Merck	Darmstadt

Formaldehyd (37 %ige Lösung)	Merck	Darmstadt
GEloader Tips	Eppendorf	Hamburg
Goat anti-rabbit IgG (H&L) antibody conjugated to horseradish peroxidase	Cell Signaling	Danvers, USA
Hefeextrakt Yeastolaste Ultrafiltrate	GibcoBRL	Karlsruhe
IPL 41 Pulvermedium	GibcoBRL	Karlsruhe
Isopropanol LiChrosolv	Merck	Darmstadt
Jodacetamid (IAA)	Sigma	Taufkirchen
Kaliumphosphat	Merck	Darmstadt
Kupfersulfat	Merck	Darmstadt
<i>N</i> -Lauroyl-sphingosin (C12)	Avanti Polar Lipids	Danvers, USA
Lipidmix (1000x)	Sigma	Taufkirchen
Magermilchpulver	BioRad	München
β -Mercaptoethanol	Sigma	Taufkirchen
Methanol	Acros	Geel, B
Methyl- α -D-glucopyranosid	Sigma	Taufkirchen
Methyl- α -D-mannopyranosid	Fluka	Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma	Taufkirchen
Natriumthiosulfat	Merck	Darmstadt
Neutralrot	Fluka	Neu-Ulm
Nonidet P 40	Fluka	Neu-Ulm
Penicillin-Streptomycin-Mix	GibcoBRL	Karlsruhe
Peptid-N-Glykanase F (PNGase F)	New England Biolabs	Frankfurt a. M.
Phosphatidylcholin	Avanti Polar Lipids	Alabaster, USA
<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd-Lösung (OPA)	Sigma	Taufkirchen
Pluronic F 68	GibcoBRL	Karlsruhe
Proteingrößenstandard Broad Range (für SDS-Gele)	New England Biolabs	Frankfurt a.M
PVDF-Membran Porablot	Macherey-Nagel	Düren
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka	Neu-Ulm
Silbernitrat	Merck	Darmstadt
Spodoptera frugiperda <i>Sf</i> -9-Zellen	Pharmingen/BD Biosciences	Heidelberg
Spodoptera frugiperda <i>Sf</i> -21-Zellen	Pharmingen/BD Biosciences	Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold	Packard	Frankfurt a. M.
Szintillationsgefäße PE (20 ml / 5 ml)	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
Tangentialflussfilter Vivaflow 200	Sartorius	Göttingen
Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP)	Pierce	Rockford, USA
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylen-ethylendiamin (TEMED)	BioRad	München
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma	Taufkirchen

Tris Ultra pure	ICN	Meckenheim
Trypsin, modified, sequencing grade	Promega	Mannheim
Tween 20	Sigma	Taufkirchen
Ultrafiltrationskonzentratoren (Vivaspin 4 ml/500µl, PES)	Vivascience/Sartorius	Göttingen
Wasser, HPLC grade	Baker	Deventer, NL
Western Lightning Western-Blot-Detection Kit	Perkin Elmer	Rodgau-Jügesheim
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner	Nürtingen

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster erhältlicher Reinheit. Die rekombinanten Baculoviren, die den vollständigen Leserahmen der sauren Ceramidase-cDNA enthalten (PP-AcMNPV-haCerase) wurden von Herrn Dr. Oliver Bartelsen hergestellt und zur Verfügung gestellt (Bartelsen, 1999). Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen rekombinante, in *E.coli* exprimierte humane saure Ceramidase, war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Plazenten wurden von der Frauenklinik der Universität Bonn bezogen. Der Photoaffinitätsligand 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyloxy)phenyl)propanoyl-sphinganol wurde von Herrn Dr. Günther Schwarzmann synthetisiert und freundlicherweise überlassen. Sap-D wurde von Frau Natascha Remmel zur Verfügung gestellt.

6.2 Methoden

6.2.1 Expression rekombinanter saurer Ceramidase in Insektenzellen

6.2.1.1 Medium für die Insektenzellkultur

Das serumfreie Medium für die Insektenzellkultur wird auf der Basis des Pulvermediums IPL 41 hergestellt. Für die Herstellung von 10 l Medium werden 398,6 g IPL41 in 9 l Wasser gelöst und mit 2 % (v/v) Hefeextrakt Yeastolaste Ultrafiltrate (50 x), 3,5 g NaHCO₃ und 6,6 g CaCl₂ x 2H₂O versetzt. 10 ml Lipidmix und 100 ml Pluronic F 68 werden auf 37°C erwärmt und unter Schütteln miteinander gemischt. Nach Zugabe dieser Mischung wird der pH-Wert des Mediums mit 5 M KOH auf 6,2 eingestellt und das Medium mit Wasser auf 10 l Endvolumen aufgefüllt. Die Osmolarität des Medium wird durch Zugabe von 28 g NaCl erhöht. Abschließend werden 100 ml Penicillin-Streptomycin-Mix (10 000 units/ml Penicillin G-Natriumsalz und 10 000 µg/ml Streptomycinsulfat in 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung) zugegeben. Das Medium wird durch einen 0,2 µm Filter in sterilisierte Flaschen filtriert.

6.2.1.2 Kultivierung von Insektenzellen

Zellen der Zelllinie *Spodoptera frugiperda*-9 (*Sf*-9) werden in serumfreiem Medium in Suspensionskultur bei 27,8°C und 135 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zelldichte sollte dabei 0,7 x 10⁶ Zellen/ml nicht unter- und 3 x 10⁶ Zellen/ml nicht überschreiten. Als

Kulturgefäße werden Erlenmeyer-Glaskolben verwendet, deren Schraubdeckel im Inkubator nicht fest geschlossen, sondern zum besseren Gasaustausch nur locker aufgelegt werden. Da der Gasaustausch ein entscheidender Faktor für das Wachstum der Zellen ist, werden die Schüttelkolben nur maximal bis zur Hälfte ihres Volumens mit Zellsuspension gefüllt. Aufgrund der Kultur in serumfreiem Medium müssen die Zellen vor der Infektion nicht an dieses Medium adaptiert werden. Die durchgehend in serumfreiem Medium kultivierten Zellen zeigen innerhalb von 40 Passagen keine Veränderung hinsichtlich Wachstum und Infizierbarkeit. Nach ca. 40 Passagen werden die Zellen gegen frisch aufgetaute Zellen niedrigerer Passagen ausgetauscht.

6.2.1.3 Bestimmung des Virustiters durch *Plaque assay*

Literatur: O'Reilly, 1992

In einer 6-well-Zellkulturschale werden pro Vertiefung 1×10^6 Sf-9 Zellen in 1 ml serumfreiem Medium ausgesät und 1 h bei 27°C inkubiert, bis die Zellen adhären. Die Viruslösung wird stark verdünnt ($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$). Nach Entfernung des Mediums werden die Zellen mit je 0,5 ml der verdünnten Viruslösung infiziert. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln wird das Virus Inoculum entfernt. Die Zellen werden mit 2,5 ml 40°C warmer 0,5 % (w/v) Agarose in Insektenzellmedium überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis die Agarose ausgehärtet ist. Der Plaque assay wird 5 Tage bei 27°C inkubiert, bevor die lebenden Zellen mit Neutralrot angefärbt werden. Dazu wird 0,5 % (w/v) Agarose in Medium auf 40°C erwärmt und mit 50 µg / ml Neutralrot versetzt. 2,5 ml dieser Lösung werden in jede Vertiefung der Zellkulturschale gegeben. Nach dem Aushärten wird der Plaque assay über Nacht bei 27°C inkubiert. Die Plaques der infizierten und mittlerweile lysierten Zellen erscheinen als helle Löcher im roten Zellrasen. Der Titer der Viruslösung wird aus der Anzahl der Plaques und der Verdünnung der Viruslösung ermittelt.

Verdünnung der Viruslösung x Anzahl der Plaques x 2 (die Multiplikation mit 2 erfolgt, weil mit 0,5 ml Viruslösung infiziert wurde) = **Titer der Viruslösung** (Einheit: *plaque forming units* (pfu))

6.2.1.4 Amplifikation der Viren

Sf-9 Zellen werden bei einer Zelldichte von $2,3 \times 10^6$ Zellen/ml mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,16 pfu/Zelle infiziert und bis zur Zelllyse 7 Tagen inkubiert. Die lysierten Zellen werden abzentrifugiert (10 000 g, 15 min, 4°C, Sorvall RC-5B, Rotor JA-10). Der Überstand wird bei 4°C im Dunklen gelagert. Da die Passage von Virusüberständen nicht beliebig oft möglich ist, wird von jeder Virusamplifikation zunächst eine Testinfektion durchgeführt. Bei höheren Passagen wird die Bildung von Baculoviren mit Deletionen im

Genom immer wahrscheinlicher. Die deletierten Viren werden zwar ebenfalls repliziert, führen aber u.U. nicht zur Expression von saurer Ceramidase.

6.2.1.5 Proteinexpression und Prozessierung des Proteins

Die Expression der sauren Ceramidase erfolgt in 2 l-Schüttelkolben, die mit 800-1000 ml Zellsuspension gefüllt sind. Bei einer Dichte von $2,3 \times 10^6$ Zellen/ml werden die Zellen durch Zugabe von Viruslösung mit einer MOI von 5 pfu/Zelle infiziert. Die Expression der sauren Ceramidase wird nach 5 Tagen durch Abzentrifugieren (10 000 g, 15 min, Sorvall RC-5B, Rotor JA-10) der Zellen gestoppt.

Der Expressionsüberstand wird unter sterilen Bedingungen durch Zugabe von 10 % iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,2-4,3 eingestellt. Der angesäuerte Expressionsüberstand wird 5 Tage bei 37°C inkubiert.

6.2.2 Reinigung rekombinanter humaner saurer Ceramidase aus dem Expressionsüberstand

6.2.2.1 Tangentialflussfiltration

Mit Hilfe des Tangentialflussfilters Vivaflow 200 (30 kDa Ausschlussvolumen, Polyethylensulfonmembran) wird der Expressionsüberstand auf ca. $\frac{1}{5}$ des Ausgangsvolumens reduziert und das Medium gegen Con A-Waschpuffer REK (30 mM Tris/HCl, pH 7,2, 200 mM NaCl, Puffer mit der Endung REK werden bei der Reinigung des rekombinanten Enzyms verwendet; Puffer mit der Endung PL bei der Reinigung der plazentalen sauren Ceramidase) ausgetauscht. Die Leistung der Pumpe wird dabei so gewählt, dass 1 l Medium innerhalb von zwei Stunden auf 200 ml reduziert und der Puffer vollständig ausgetauscht wird.

6.2.2.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose (Con A)

Con A-Waschpuffer REK: 30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 200 mM NaCl

Con A-Elutionspuffer REK: 30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 200 mM NaCl, 15 % (w/v)
Methyl- α -D-mannopyranosid

Con A-Regenerationspuffer REK: 30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2

Beide Chromatographie-Schritte der Reinigung der rekombinanten sauren Ceramidase werden mit dem BioCAD Sprint System durchgeführt. Der Verlauf der Chromatographie wird durch Messung der Absorption bei 220 und 280 nm verfolgt.

Eine mit Concanavalin A-Sepharose gefüllte Omnifit-Leersäule (2,5 x 5 cm) wird mit Con A-Waschpuffer REK äquilibriert. Das Retenat der Tangentialflussfiltration wird mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine werden durch Waschen mit 10 Säulenvolumina (CV) Con A-Waschpuffer REK bei gleicher Flussrate entfernt. Gebundene Glykoproteine werden mit einem linearen Gradienten von 0-15% Methyl- α -D-mannopyranosid eluiert. Anschliessend wird die Säule mit 10 CV Con A-Regenerationspuffer REK gespült.

6.2.2.3 Chromatographie an Octyl-Sepharose (OS)

OS-Waschpuffer REK: 30 mM Tris/HCl, pH 7, 100 mM NaCl

OS-Elutionspuffer REK. 30 mM Tris/HCl, pH 7, 100 mM NaCl, 1 % Octyl- β -D-glucopyranosid

Die vereinigten glykoproteinholdigen Fraktionen der Concanavalin A-Chromatographie werden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit OS-Waschpuffer äquilibrierte Octyl-Sepharose Säule (1 x 4 cm in einer Omnifit-Leersäule) geladen. Die Säule wird mit 10 CV OS-Waschpuffer REK mit einer Flussrate von 1 ml/min gespült. Gebundenes Protein wird mit OS-Elutionspuffer REK eluiert.

6.2.3 Reinigung saurer Ceramidase aus humaner Plazenta

Literatur: Linke et al., 2000

6.2.3.1 Homogenisation und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

1 kg menschliche Plazenta wird bei 4°C von Nabelschnur und Fettgewebe befreit, in Stücke geschnitten und mit 1 l Eiswasser in einem Haushaltsmischer zerkleinert. Nach Zugabe von 0,1 % (w/v) Nonidet P 40 wird das Gewebe im Ultra Turrax homogenisiert. Zelltrümmer werden 45 min bei 10 000 g abzentrifugiert (4°C, Sorvall RC-5B, Rotor JA-10). Zu dem Überstand der Zentrifugation wird bei 4°C unter Rühren fein gemörsertes festes Ammoniumsulfat gegeben, bis eine Sättigung von 30 % erreicht ist (176 g/l). Nach 2 h wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert (45 min, 10 000 g, 4°C, Sorvall RC-5B, Rotor JA-10). Das Pellet wird verworfen und der Überstand mit weiterem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60 % (196 g/l) versetzt. Nach 2 h Rühren bei 4°C wird die Suspension erneut zentrifugiert. Diesmal wird der Überstand verworfen und das Pellet in 400 ml Con A-Waschpuffer PL (30 mM Tris/HCl pH 7, 200 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Nonidet P 40) gelöst. Ungelöste Bestandteile werden durch Zentrifugation (45 min, 10 000 g, 4°C, Sorvall RC-5B, Rotor JA-10) entfernt.

6.2.3.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose

Con A-Waschpuffer PL:	30 mM Tris/HCl pH 7, 200 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Nonidet P 40
Con A-Elutionspuffer PL:	30 mM Tris/HCl pH 7, 200 mM NaCl, 15 % (w/v) Methyl- α -D-glucopyranosid, 0,1 % (w/v) Nonidet P 40
Con A-Regenerationspuffer PL	30 mM Tris/HCl pH 7, 1 M NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂

Alle Chromatographie-Schritte der Reinigung werden mit dem präparativen HPLC-System BioCAD Sprint durchgeführt. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der UV-Absorption bei 220 und 280 nm verfolgt. Das gelöste Pellet der Ammoniumsulfatfällung wird mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine in Con A-Waschpuffer PL äquilibrierte Concanavalin A-Sepharose Säule (2,5 x 5 cm in einer Omnifit-Leersäule) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 10 CV Con A-Waschpuffer PL entfernt. Die gebundenen Glykoproteine werden mit einem Gradienten von 0-15 % (w/v) Methyl- α -D-glucopyranosid in Gegenrichtung mit 1 ml/min eluiert und in Fraktionen von 12 ml gesammelt. Anschließend wird die Säule mit 10 CV Con A-Regenerationspuffer PL gespült.

6.2.3.3 Chromatographie an Octyl-Sepharose

OS-Waschpuffer PL:	30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 100 mM NaCl
OS-Elutionspuffer PL:	30 mM Tris/HCl pH 7,2 , 100 mM NaCl, 1 % (w/v) Nonidet P 40

Die glykoproteinreichen Eluat-Fraktionen der Concanavalin A-Chromatographie werden vereinigt und bei einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit OS-Waschpuffer PL äquilibrierte Octyl-Sepharose Säule (1 x 4 cm in einer Omnifit-Leersäule) geladen. Die Säule wird mit 10 CV OS-Waschpuffer PL gespült. Gebundenes Protein wird mit einem linearen Gradienten von 0-100 % OS-Elutionspuffer PL mit 1 ml/min eluiert.

6.2.3.4 Farbstoffligandenchromatographie an Matrex Gel Red A (MGR)

MGR-Waschpuffer 1:	30 mM Tris/HCl pH 7,2, 0,1 % Nonidet P 40
MGR-Waschpuffer 2:	30 mM Tris/HCl pH 7,2, 0,1 % β -D-Octylglucopyranosid

Die vereinigten Eluatfraktionen der Octyl-Sepharose Säule werden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine mit MGR-Waschpuffer 1 äquilibrierte MGR-Säule (1 x 4 cm in einer Omnifit-Leersäule) geladen. Die Säule wird zunächst mit 5 CV des Nonidet P 40-haltigen Waschpuffer bei gleicher Flussrate gespült. Für weitere Reinigungs- und Analyseschritte wird das Nonidet P 40 (kritische Mizellkonzentration $0,25 \times 10^{-3}$ mol/l) gegen das

dialysierbare und MALDI-verträgliche β -D-Octylglucopyranosid (kritische Mizellkonzentration 25×10^{-3} mol/l) ausgetauscht. Dazu wird die Säule mit 10 CV MGR-Waschpuffer 2 gespült und gebundenes Protein anschließend in umgekehrter Richtung bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 - 1,5 M NaCl in MGR-Waschpuffer 2 eluiert.

6.2.3.5 Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DMAE-650 (M)

Das Eluat der MGR-Chromatographie wird in einem Ultrafiltrationskonzentrator (Vivaspin 4 ml, 30 kDa Ausschlussvolumen, Polyethylensulfon-Membran) auf ca. 1/10 seines Anfangsvolumens reduziert und der NaCl-haltige MGR-Elutionspuffer gegen MGR-Waschpuffer 2 ausgetauscht.

Das konzentrierte Protein wird mit 1 ml/min auf eine mit MGR-Waschpuffer 2 äquilibrierte Fractogel EMD DEAE-650 (M) Säule (2 x 1 cm in einer Ominfit-Leersäule) geladen. Die Säule wird bei gleicher Flussrate mit MGR-Waschpuffer 2 gespült. Unter diesen Bedingungen befindet sich die saure Ceramidase in den ersten Fraktionen des Durchlaufs.

6.2.4 Proteinanalytik

6.2.4.1 Enzymaktivitätsmessungen

6.2.4.1.1 Messung der Aktivität der sauren Ceramidase im Mizellaren Testsystem

Literatur: Bernardo et al., 1995

Aktivitätsassay

Als Substrat der sauren Ceramidase wird (2S, 3R, 4E)-2-Dodecanoylamino-1,3-octadecen-4-diol ($C_{12/18}$ -Ceramid, *N*-Lauroyl-Sphingosin) verwendet, das durch Ultraschall (CupHorn, maximale Intensität, 3x30 sec) in einem Detergenzgemisch (0,5 % (w/w) Triton X-100, 0,2 % (w/w) Tween 20, 0,2 % (w/w) Nonidet P 40, 0,8 % (w/w) Natriumcholat in Wasser) solubilisiert wird.

Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 100 μ l. Das Reaktionsgemisch besteht aus 25 μ l Natriumacetat-Puffer (1 M, pH 4,0), 5 μ l EDTA-Lösung (5 mM in Wasser), 1,7 nmol *N*-Lauroyl-Sphingosin (solubilisiert in 10 μ l Detergenzgemisch) und 60 μ l Enzymprobe. Der Reaktionsansatz wird 40 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 800 μ l Chloroform/Methanol (2:1, v/v) gestoppt.

Extraktion

Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von 200 μ l 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und mit je 500 pmol C_{14} - und C_{16} -Sphinganine als interne Standards versetzt. Das Gemisch wird 10 min kräftig geschüttelt und 10 min bei 16 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. 600 μ l der Unterphase werden

abgenommen und in ein anderes Gefäß überführt. Die Oberphase wird mit 600 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) versetzt, erneut 15 min geschüttelt und zentrifugiert. Wieder werden 600 µl der Unterphase, die das freigesetzten C₁₈-Sphingosin und die internen Standards enthält, abgenommen. Die vereinigten organischen Phasen werden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingedampft.

HPLC-Analyse

OPA-Kupplungsreagenz: *ortho*-Phthaldialdehyd-Lösung, 0,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

HPLC-Puffer Acetonitril : 2 mM Kaliumphosphat in Wasser 9:1 (v/v)

Die eingedampften Proben werden in 50 µl Ethanol aufgenommen, mit 10 µl OPA-Kupplungsreagenz versetzt und 10 min geschüttelt. Danach werden die Proben mit HPLC-Puffer auf 1 ml aufgefüllt und mit einem AS-10 Autosampler auf eine, in HPLC-Puffer äquilibrierte, LiChroCART 125-4 Nucleosil 5 C18-Säule aufgetragen. Die Lipide werden isokratisch eluiert (Shimadzu LC-10 AT-Pumpe) und mit einem Shimadzu RF-10AX-Fluoreszenz Detektor vermessen (Anregungswellenlänge 355 nm, Emissionswellenlänge 435 nm). Ermittelt wird die Menge an freigesetztem C₁₈-Sphingosin. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der Class CR-10 Software von Shimadzu.

6.2.4.1.2 Messung der Aktivität der sauren Ceramidase im liposomalen Testsystem

Lit.: MacDonald et al., 1991

Herstellung der Liposomen

Lösungen von *N*-Lauroyl-Sphingosin, Cholesterol, Bismonoacylglycerophosphat (BMP) und Phosphatidylcholin werden im Stickstoffstrom eingedampft und in einer Konzentration von 2,5 mM in 2 mM Tris/HCl pH 7 aufgenommen. Dabei entstehen spontan multilamellare Vesikel unterschiedlicher Größe. Die Homogenität der Lipiddispersion wird durch zehnmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) und langsames Auftauen bei Raumtemperatur erhöht. Anschließend wird die Lipiddispersion 21-mal durch eine Polycarbonatmembran (Porengröße 100 nm) in einem *LiposoFast low pressure homogenizer* gepresst. Bei diesem Verfahren entstehen grosse unilamellare Liposomen, daneben aber auch bi- und trilamellare Vesikel (Schwarzmann et al., 2005). Auf diese Weise werden 5 verschiedene Arten von Liposomen hergestellt (PC / Cer12 / BMP / Chol 60-x:x:20:20 mol%). Die Konzentration von Cholesterol und BMP entspricht dabei in allen Liposomenarten 20 mol%, die Konzentration des Ceramids beträgt 2,5 , 5, 10, 20 und 40 mol %. Die

Konzentration des Phosphatidylcholins nimmt mit steigendem Ceramid-Gehalt ab. Sie beträgt 57,5 , 55, 50, 40, 20 mol %.

Aktivitätsassay

Der Reaktionsansatz besteht aus 25 µl Natriumacetat-Puffer (1 M, pH 4,0), 10 µl Enzymlösung (3 µg), 40 µl Liposomen und 10 µg rekombinantes unglykosyliertes Sap-D in einem finalen Volumen von 100 µl. Der Reaktionsansatz wird 40 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 800 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) gestoppt. Extraktion und HPLC-Analyse erfolgen, wie in 6.2.4.1.1 beschrieben.

6.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lit.: Laemmli, 1970, Bollag, 1996

Probenpuffer (5-fach):	60 mM Tris/HCl pH 6,8, 25 % Glycerol, 2 % SDS, 14,4 mM β-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer (4-fach):	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer (4-fach):	0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % SDS
Acrylamidmix 29:1	(30 % (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid im Verhältnis 29:1, entspricht 3,3 % (w/v) Cross-Linker)
APS-Lösung:	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Wasser
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH~8,3
Gelzusammensetzung (Alle Angaben beziehen sich auf 2 Gele der Größe 7 cm x 10 cm x 0,75 mm):	
Sammelgel (5 % Acrylamid):	0,67 ml Acrylamidmix 29:1, 2,3 ml H ₂ O, 1 ml Sammelgelpuffer (4-fach), 30 µl APS-Lösung, 5 µl TEMED
Trenngel (12 % Acrylamid) :	4 ml Acrylamidmix 29:1, 3,5 ml H ₂ O, 2,5 ml Trenngelpuffer (4-fach), 50 µl APS-Lösung, 5 µl TEMED

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Glycin-SDS-Gel. Das Trenngel (ca. 6 cm Laufstrecke) wird mit Sammelgel (ca. 1 cm Laufstrecke) überschichtet. Die Proteinproben werden mit Probenpuffer versetzt und 10 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die Proben auf das Gel aufgetragen. Bis zum Eintritt in das Trenngel wird eine Stromstärke von 30 mA angelegt. Danach werden die Proteine bei 50 mA elektrophoretisch getrennt, bis das Bromphenolblau noch ca. 3 mm von der unteren Gelkante entfernt ist.

6.2.4.3 Detektion von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen durch Coomassie-Färbung

Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie Blue R-250, 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Das SDS-PAGE-Gel wird 10 min in der Färbelösung leicht geschüttelt. Die Färbelösung wird verworfen und das Gel mit Wasser gepült, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Anschliessend wird das Gel durch Schütteln in Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbtintensität entfärbt (ca. 1 h) und vor dem Trocknen für mindestens 1 h in 3 % Glycerin in Wasser geschüttelt.

6.2.4.4 Detektion von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen durch Silber-Färbung

Lit.: Blum, 1987

Fixierlösung:	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 500 µl / l Formaldehyd (37 %)
Imprägnierlösung:	200 mg / l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in Wasser
Silberlösung:	0,2 % (w/v) Silbernitrat, 750 µl / l Formaldehyd (37 %)
Entwicklerlösung:	6 % (w/v) Na_2CO_3 , 4 mg / l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 500 µl/l Formaldehyd (37 %)
Stopplösung:	50 % Methanol, 12 % Essigsäure

Das SDS-PAGE-Gel wird mindestens 1 h in der Fixierlösung geschüttelt. Das fixierte Gel wird dreimal jeweils 20 min mit 50 % Ethanol in Wasser gewaschen und 1 min mit einer Natriumthiosulfatlösung imprägniert. Überschüssiges Thiosulfat wird durch dreimaliges Waschen (jeweils 20 s) mit Wasser entfernt und das Gel 20 min in der Silberlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser (jeweils 20 s) wird das Gel in der Entwicklerlösung geschüttelt, bis die Färbung der Proteinbanden die gewünschte Intensität erreicht hat (2-3 min). Das Gel wird kurz mit Wasser gewaschen und min. 10 min in Stopplösung geschüttelt. Vor dem Trocknen wird das Gel min. 1 h in 3 % Glycerin in Wasser gelagert.

6.2.4.5 Immunchemischer Nachweis der sauren Ceramidase (Western-Blotting)

Lit.: Matsudaira, 1987

Transferpuffer:	10 mM CAPS pH 11, 10 % (v/v) Methanol
Waschpuffer WB:	10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Tween 20
Blocklösung:	5 % (w/v) Magermilchpulver in Waschpuffer WB

Proteintransfer

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wird das SDS-PAGE-Gel 5 min in Wasser leicht geschüttelt und dann 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wird zunächst mit Methanol benetzt und dann ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Gel und PVDF-Membran werden luftblasenfrei aufeinander gelegt und zwischen mehrere Lagen mit Transferpuffer getränkten Filterpapieren in eine Mini-Transblot-Apparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgt bei einer Stromstärke von 300 mA innerhalb von 35 min.

Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wird die PVDF-Membran 1h mit Blocklösung inkubiert. Der primäre Antikörper (Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen rekombinante, in *E.coli* exprimierte humane saure Ceramidase) wird 1:800 mit Blocklösung verdünnt. Die PVDF-Membran wird mit der Antikörper-Lösung unter ständigem Umschwenken über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer WB wird die PVDF-Membran dann 1h bei Raumtemperatur mit dem in Blocklösung 1: 10 000 verdünnten, sekundären Antikörper (goat anti-rabbit IgG (H&L) antibody conjugated to horseradish peroxidase) inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min mit Waschpuffer WB gewaschen und die saure Ceramidase mit dem Western Lightning-Chemolumineszenzreagenz sichtbar gemacht. Diese Nachweismethode beruht darauf, dass die Meerrettich-Peroxidase in alkalischer Lösung und unter Reduktion von Wasserstoffperoxid das Luminol oxidiert. Das Luminol kehrt direkt nach seiner Oxidation aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurück und emittiert dabei Photonen, die mit einem fotografischen Film nachgewiesen werden können.

6.2.4.6 Proteinquantifizierung mit BCA-Reagenz

Lit.: Smith et al., 1985

BCA-Reagenz: BCA-Lösung : 4 % (v/w) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in Wasser 50:1

Die Messung erfolgt in einer 96-Well Mikrotiterplatte gegen eine Eichreihe von 0-5 µg BSA. 20 µl der Proteinlösung (max. 5 µg) werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und 20 min bei 60°C inkubiert. In Gegenwart von Proteinen werden Cu(II)-Ionen unter alkalischen Bedingungen zu Cu(I)-Ionen reduziert. Die Cu(I)-Ionen bilden einen violetten Cu(I)-Bicinchoninsäure-Chelat-Komplex, dessen Extinktion bei 595 nm gemessen wird. Die Messung erfolgt mit einem Multiscan Ascent Photometer.

6.2.4.7 Proteinspaltung

6.2.4.7.1 Tryptischer Verdau

Gereinigte saure Ceramidase wird in einem Ultrafiltrationskonzentrator Vivaspin 500 gegen 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung umgepuffert und auf 1 mg/ml aufkonzentriert. Lyophilisiertes modifiziertes Trypsin wird in einer Konzentration von 1 µg/µl in Wasser gelöst und im Verhältnis 1 zu 20 zu der sauren Ceramidase gegeben. Der Verdau wird 14 h bei 37°C inkubiert und danach durch Einfrieren (-20°C) gestoppt.

6.2.4.7.2 Alkylierung der sauren Ceramidase

Zur Markierung freier Cysteine wurde das Protein vor der proteolytischen Spaltung alkyliert. 100 µg gereinigte saure Ceramidase (1 mg/ml) in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung wurde mit 5 mM [¹⁴C]-Jodacetamid bei Raumtemperatur 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 5 µg Trypsin in 5 µl Wasser zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.2.4.7.3 Chymotryptischer Verdau

Der Chymotrypsin-Verdau erfolgt analog zum tryptischen Verdau (7.2.4.5.1), wobei dem Verdaupuffer (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) 10 mM CaCl₂ zugesetzt wurden.

6.2.4.8 Trennung der Peptide

Laufmittel A:	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Wasser
Laufmittel B:	0,06 % (v/v) Trifluoressigsäure, 20 % (v/v) Isopropanol, 80 % (v/v) Acetonitril

Die Trennung der Peptide erfolgte durch Umkehrphasenchromatographie über eine Nucleosil-120 C18-Säule (2 x 250 mm) in einem SMART-HPLC-System. Die Peptide wurden auf die mit 5 % Laufmittel B in Laufmittel A äquilibrierte Säule aufgetragen. Nicht an das Säulenmaterial gebundene Stoffe, wie z.B. Salze; wurden mit dem gleichen Laufmittelgemisch und einer Flußrate von 100 µl/min von der Säule gespült. Die Peptide wurden durch einen linearen Gradienten von 5 – 100 % Laufmittel B in Laufmittel A mit der gleichen Flußrate innerhalb von 120 min eluiert. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Absorption bei 214, 254 und 280 nm verfolgt.

Wurde das Protein zuvor mit einer radioaktiven Substanz markiert, so wurde jeder Fraktion ein Aliquot entnommen und Radioaktivitätsmenge mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler TRI-CARB 1900 CA bestimmt. Als Szintillationsflüssigkeit diente dabei Ultima Gold.

6.2.4.9 Reduktion und Alkylierung der Peptide, Reduktion des Proteins

Jeder Eluatfraktion, die möglicherweise disulfidverknüpfte Peptide enthält, wird ein Aliquot (ca. 0,5 nmol Peptid) entnommen, das lyophilisiert wird. Nach Aufnahme in 25 mM NH_4HCO_3 (ca. 20 μM) wird das Aliquot mit 2 mM TCEP für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Reduktion werden die unverbrückten cysteinhaltige Peptide mit 5 mM IAA für 1 h bei RT im Dunkeln alkyliert.

Alternativ dazu wurde die saure Ceramidase und die Peptide auch mit DTT reduziert. Gereinigte saure Ceramidase (1 mg/ml in 25 mM NH_4HCO_3) oder der proteolytische Verdau des Enzyms in 25 mM NH_4HCO_3 wurden mit 5 mM DTT 15 min auf 95 °C erhitzt.

6.2.4.10 Deglykosylierung

Zu einer 20 μM Lösung der sauren Ceramidase in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung werden 100 Units / μg PNGaseF gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Einfrieren (-21°C) oder durch Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer beendet.

HPLC-Fractionen, die möglicherweise Glykopeptide enthalten, werden lyophilisiert, bevor sie in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung aufgenommen werden und wie oben beschrieben deglykosyliert werden.

6.2.4.11 Isolierung der Glykane der sauren Ceramidase

Lit.: Packer et al., 1998

Die Abtrennung der Glykane aus dem Deglykosylierungsgemisch (siehe 6.2.4.10) erfolgt durch Festphasenextraktion an Graphit-Säulchen. Eine Carboglyph Ultra-clean Graphitsäule wird mit 2 ml Acetonitril, 2 ml 80 % Acetonitril in 0,1 % TFA und 2 ml H_2O äquilibriert, bevor das Reaktionsgemisch aufgetragen wird. Salze und Detergenzien werden durch Waschen mit 2 ml H_2O entfernt und die Glykane mit 2 ml 25 % Acetonitril in 0,05 % TFA eluiert. Die eluierten Glykane wurden lyophilisiert, in 2 mM Ammoniumacetat in Wasser gelöst und mit dem ESI-Massenspektrometer vermessen.

6.2.5 Markierungsexperimente

6.2.5.1 Photoaffinitätsmarkierung

1 nmol des Photoaffinitätsliganden 2N-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)propanoyl-[^3H]-sphingarin (500 Ci/mol) wird in 1 μl Ethanol gelöst und 40 min mit 0,1 nmol saure Ceramidase, gelöst in 5,3 μl 250 mM Natriumacetatpuffer auf Eis, bzw. bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde die Photosonde zur Trockene eingedampft und in dem Detergenzgemisch aufgenommen, das für den mizellaren Aktivitätstest eingesetzt wird (siehe 6.2.4.1.1). Enzym und Ligand werden dann unter Zugabe von 5 mM EDTA wie oben beschrieben inkubiert.

Danach wird das Reaktionsgemisch durch RP-Chromatographie an 0,5 ml LiChroprep RP18/Methanol-Suspension (1:1, v/v) in einer Pasteur-Pipette entsalzt und das Protein abgetrennt. Das Reaktionsgemisch wird mit 150 μ l MeOH/H₂O 4:6 versetzt, auf die Säule aufgetragen und zunächst mit 6 Säulenvolumina Wasser gewaschen. Gebundene Substanzen werden mit 6 Säulenvolumina Methanol und anschließend mit 6 Säulenvolumina Chloroform/Methanol (1:1 v/v) eluiert. 10 μ l jeder Fraktion werden mit 5 ml Ultima Gold Szintillationsflüssigkeit versetzt und im TRI-CARB 1900 CA Szintillationszähler untersucht. Die radioaktiven Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (HPTLC-Platten, Flachbettkammer, Laufmittel CHCl₃/MeOH/2N NH₃) und die Radioaktivitätsverteilung mit Hilfe des Radioscanners Fuji BAS 1000 Imaging Analyzer sichtbar gemacht.

Für die Markierungsexperimente wurden 10 nmol Photoaffinitätsligand in Detergenzgemisch, wie in 6.2.4.1.1 beschrieben, solubilisiert. In einem Gesamtvolumen von 100 μ l wird der solubilierte Ligand dann mit 5 mM EDTA und 1 nmol saure Ceramidase in 250mM Natriumacetat-Puffer für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird in eine Quarzküvette (2 mm Durchmesser, 120 μ l Inhalt, angefertigt vom Glasbläser der chemischen Institute der Universität Bonn) überführt und auf Eis 10 sec mit einer 2000 W-Osram-Ultramed Lampe (ca. 400 W Leistung im UV-Bereich) belichtet. Die Belichtungsapparatur wurde von den Werkstätten der chemischen Institute der Universität Bonn angefertigt.

Nach der Photoaffinitätsmarkierung wird das Protein in einer Vivaspin 500 Zentrifugalfiltereinheit in 25 mM NH₄HCO₃-Puffer umgepuffert und überschüssiger Ligand entfernt. Diese Methode ist mit geringeren Ausbeuteverlusten verbunden, als Gelfiltration oder Dialyse. Danach wird das Protein, wie in 6.2.4.7.1 beschrieben tryptisch verdaut, die Peptide über reversed phase-Chromatographie getrennt und die Radioaktivität in den einzelnen Eluatfraktionen bestimmt.

6.2.5.2 Affinitätsmarkierung mit BAS

BAS und [¹⁴C]BAS werden wie bei Linke beschrieben synthetisiert (Linke, 2000).

0,2 μ Ci [¹⁴C]-BAS (5,3 nmol) werden wie beim micellaren Aktivitätstest beschrieben in Detergenzmischung solubilisiert. Der solubilierte Ligand wird mit 5 μ g (0,1 nmol) saure Ceramidase und 5 mM EDTA in 250 mM Natriumacetatpuffer in einem finalen Volumen von 100 μ l bei 37°C inkubiert. Nach 40 min wird das Protein durch Zugabe von 600 μ l eiskaltem Acteon gefällt. Das Protein wird 10 min bei 14000 Umdrehungen/min abzentrifugiert (5415C-Zentrifuge), in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und einer SDS-PAGE-Analyse unterzogen. Das Gel wird im Geltrockner getrocknet und die radioaktiven Banden durch Autoradiographie detektiert. Alternativ zu dieser Vorgehensweise wurde auch Ligand in einer

höheren Konzentration eingesetzt. Dazu wurden 50 µg saure Ceramidase mit 8,4 µCi [¹⁴C]-BAS unter den gleichen Bedingungen inkubiert und aufgearbeitet.

6.2.6 Massenspektrometrie

6.2.6.1 MALDI-MS

Matrixlösungen und Probenpräparation

α-Cyano-4-hydroxizimtsäure: 10 mg / ml in 50 % Acetonitril, 50 % 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser

Sinapinsäure: 10 mg / ml in 40% Acetonitril, 60% 0,1% Trifluoressigsäure in Wasser

Als Matrices wurden α-Cyano-4-hydroxizimtsäure und Sinapinsäure verwendet. Kleine Peptide (bis 4kDa) und HPLC-Fractionen wurden mit α-Cyano-4-hydroxizimtsäure analysiert. Bei proteolytischen Peptidgemischen, grossen Peptiden und Proteinen wurde, falls nicht anders angegeben, Sinapinsäure verwendet. Für die Proben wurde eine Konzentration von ca. 25 pmol/µl angestrebt. 1µl der Matrixlösung und 1µl der Probenlösung wurden auf den Probenträger pipettiert, vermischt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Messung

Die MALDI-Messungen wurden an einem TOFSpec E-Massenspektrometer von Micromass durchgeführt. Alle Messungen erfolgten im positiven Modus. Die Beschleunigungsspannung betrug 20kV, die Extraktionsspannung 19,5 kV und die Fokusspannung 15,5 kV. Die Pulsspannung betrug bei linearen Messungen 1200-1600 V, bei Reflektronmessungen 1800-2200 V. Das Gerät verfügt über einen Stickstofflaser, der Energie bei 337 nm emittiert. Es wurde die niedrigste Laserenergie, bei der noch ein Signal zu beobachten war, ausgewählt. Das Gerät wurde mit Peptiden bekannter Masse, oder bei Messungen mit dem *high mass* Detektor, mit BSA kalibriert. Sofern nicht anders angegeben, wurden jeweils Monoisotopenmassen bestimmt.

6.2.6.2 ESI-MS

Herstellung der ESI-Kapillaren

Borosilikatglas-Kapillaren werden in 10 cm lange Stücke gebrochen und nacheinander mit Wasser, Isopropanol/Wasser 1:1 (v/v), Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) und Methanol gewaschen. Die getrockneten Kapillaren werden in einen Mikropipetten-Ziehler (Einstellungen: Step 1= 57, Step 2= 61) eingespannt, in der Mitte erhitzt und beim Erhitzen

auseinander gezogen, so dass aus einem Stück Glasrohr 2 ESI-Kapillaren entstehen. Die Kapillaren werden in der Bedampfungsanlage im sputter-Verfahren mit Gold beschichtet. Dazu werden sie in 4 cm Abstand zur Goldfolie auf dem Probenträger positioniert und bei 5×10^{-2} mbar Argon für 90 s mit 70 mA Spannung bedampft.

Messung

Die Massenspektren wurden im positiven Modus an einem Q-TOF2 Massenspektrometer mit Nanospray-Quelle aufgenommen. Ca. 5 μ l der Probenlösung wurden mit GELoader Tips in die goldbeschichtete Glas-Kapillare gefüllt und bei einer Kapillarspannung von 900-1000 V ionisiert. Zur Eichung wurde eine Lösung von NaI (2 μ g/ μ l) und CsI (0,05 μ g/ μ l) in Acetonitril/Wasser 1:1 verwendet. Die MS/MS-Messungen wurden mit Argon als Kollisionsgas bei einer Kollisionsspannung von 25-35 eV durchgeführt.

7 Anhang

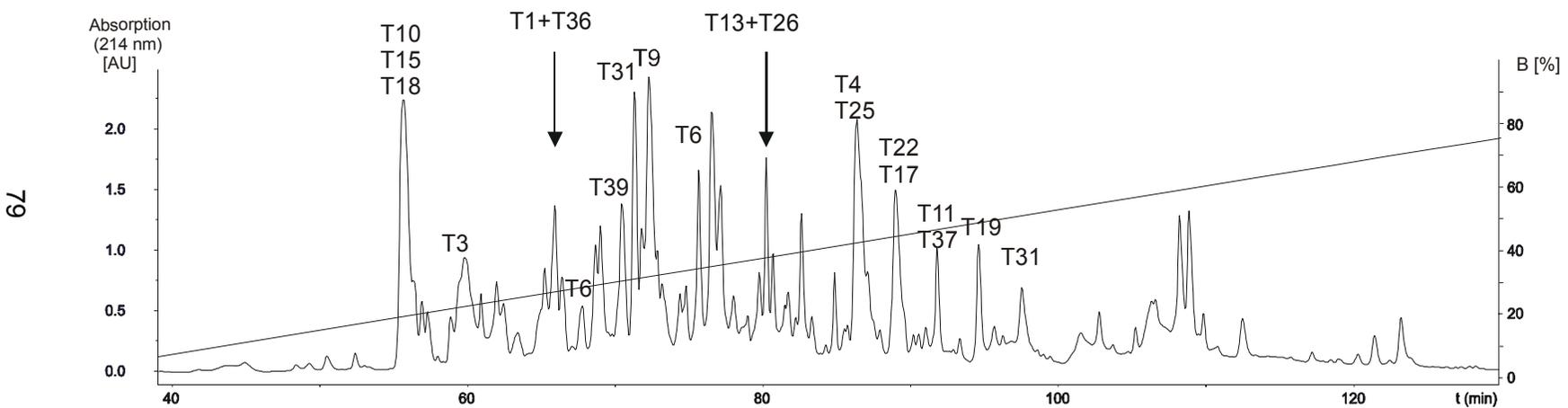
7.1 reversed phase Chromatogramm der Peptide tryptisch
verdauter rekombinanter saurer Ceramidase

Abb. 7.1: Trennung der Peptide eines tryptischen Verdaus der rekombinanten sauren Ceramidase. Die tryptischen Peptide sind den Peaks zugeordnet.

7.2 MALDI-MS eines tryptischen Verdaus der rekombinanten sauren Ceramidase

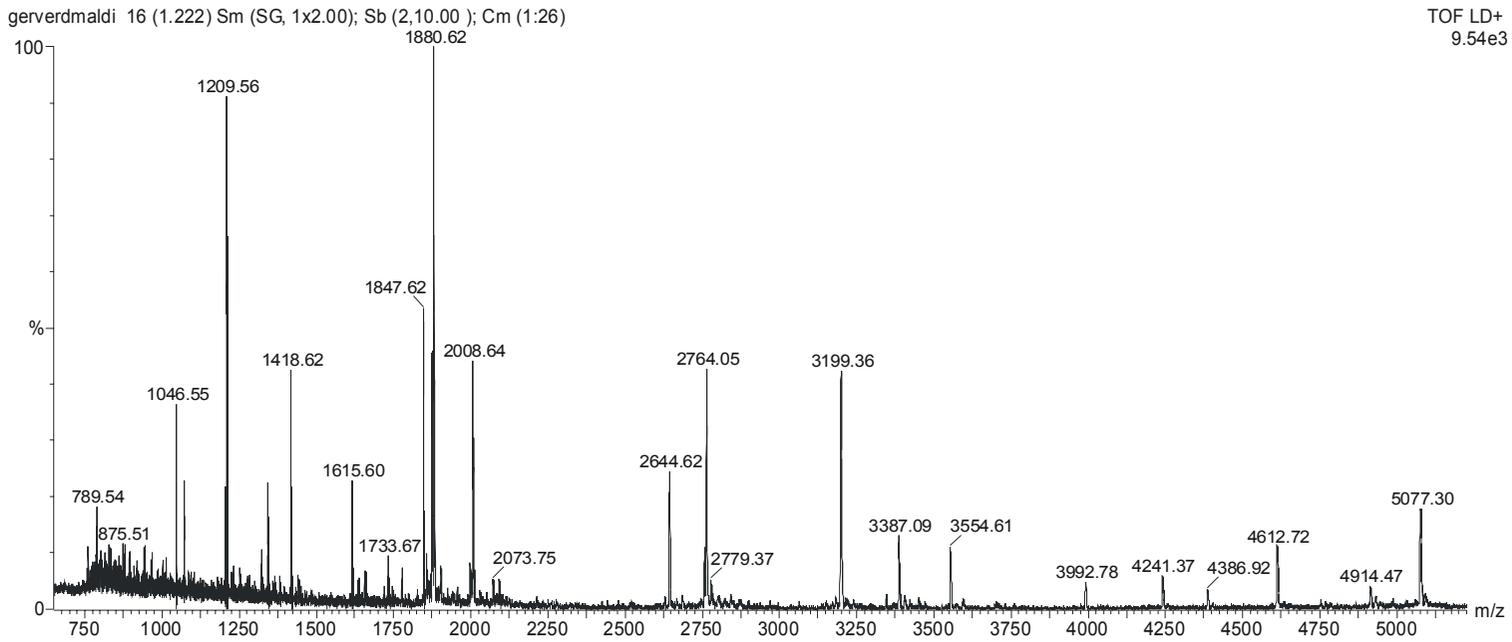


Abb. 7.2: MALDI-Massenspektrum eines tryptischen Verdaus der sauren Ceramidase

7.2 MALDI-MS eines chymotryptischen Verdaus der rekombinanten sauren Ceramidase

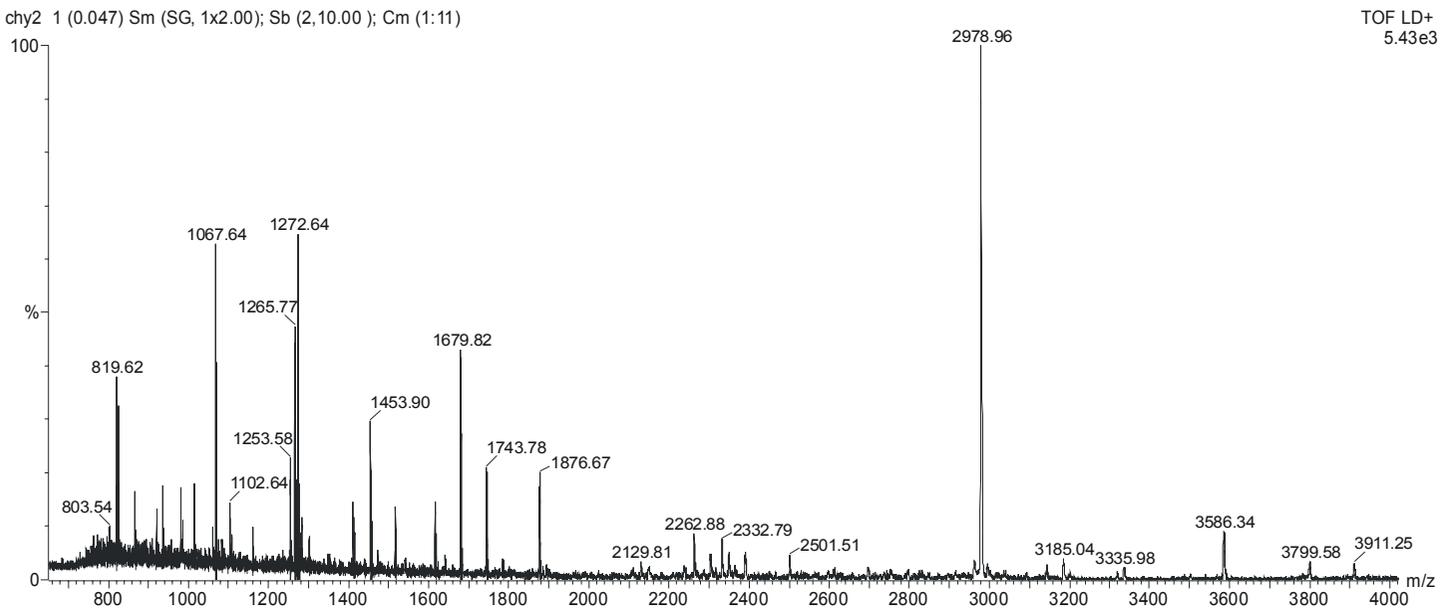


Abb. 7.3: MALDI-Massenspektrum eines chymotryptischen Verdaus der sauren Ceramidase

8. Literatur

- Altmann, F., E. Staudacher, et al. (1999). "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins." Glycoconj J **16**(2): 109-23.
- Anderson, R. G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Bär, J., T. Linke, et al. (2001). "Molecular analysis of acid ceramidase deficiency in patients with Farber disease." Hum Mutat **17**(3): 199-209.
- Bartelsen (1999). "Dissertation." Universität Bonn.
- Bartelsen, O., S. Lansmann, et al. (1998). "Expression of recombinant human acid sphingomyelinase in insect Sf21 cells: purification, processing and enzymatic characterization." J Biotechnol **63**(1): 29-40.
- Bejaoui, K., Y. Uchida, et al. (2002). "Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis." J Clin Invest **110**(9): 1301-8.
- Bektas, M. and S. Spiegel (2004). "Glycosphingolipids and cell death." Glycoconjugate Journal **20**(1): 39-47.
- Bernardo, K., R. Hurwitz, et al. (1995). "Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase." J Biol Chem **270**(19): 11098-102.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." Electrophoresis **8**(2): 93-99.
- Bollag, D. M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. (1996). Protein Methods, Wiley-Liss.
- Bouwstra, J. A., P. L. Honeywell-Nguyen, et al. (2003). "Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations." Prog Lipid Res **42**(1): 1-36.
- Bradova, V., F. Smid, et al. (1993). "Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease." Hum Genet **92**(2): 143-52.
- Brannigan, J. A., G. Dodson, et al. (1995). "A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation." Nature **378**(6555): 416-9.
- Bretscher, M. S. (1973). "Membrane structure: some general principles." Science **181**(100): 622-9.
- Brunner, J., H. Senn, et al. (1980). "3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents." J Biol Chem **255**(8): 3313-8.
- Chalfant, C. E. and S. Spiegel (2005). "Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4605-12.
- Chaturvedi, P. K. and G. L. Schmir (1968). "The Hydrolysis of N-Substituted Acetimidate Esters." J. Am. Chem. Soc. **90**(16): 4413-4420.

- Cuvillier, O., G. Pirianov, et al. (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." Nature **381**(6585): 800-3.
- Dressler, K. A. and R. N. Kolesnick (1990). "Ceramide 1-phosphate, a novel phospholipid in human leukemia (HL-60) cells. Synthesis via ceramide from sphingomyelin." J Biol Chem **265**(25): 14917-21.
- Dressler, K. A., S. Mathias, et al. (1992). "Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system." Science **255**(5052): 1715-8.
- Duggleby, H. J., S. P. Tolley, et al. (1995). "Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre." Nature **373**(6511): 264-8.
- El Bawab, S., P. Roddy, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase." J Biol Chem **275**(28): 21508-13.
- Eliyahu, E., J. H. Park, et al. (2007). "Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival." FASEB Journal **21**(7): 1403-9
- Farber, S. (1952). "A lipid metabolism disorder -disseminated "lipogranulomatosis" - a syndrome with similarity to, and important difference from Niemann-Pick and Hand-Schüller-Christian disease." American Journal of Diseases of Children, Chicago **84**: 499-500.
- Ferlinz, K., G. Kopal, et al. (2001). "Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting." J Biol Chem **276**(38): 35352-60.
- Frey, A., K. T. Giannasca, et al. (1996). "Role of the glycocalyx in regulating access of microparticles to apical plasma membranes of intestinal epithelial cells: implications for microbial attachment and oral vaccine targeting." J Exp Med **184**(3): 1045-59.
- Fürst, W. and K. Sandhoff (1992). "Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism." Biochim Biophys Acta **1126**(1): 1-16.
- Gatt, S. (1963). "Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramides." J Biol Chem **238**: 3131-3.
- Gillard, B. K., L. T. Thurmon, et al. (1993). "Variable subcellular localization of glycosphingolipids." Glycobiology **3**(1): 57-67.
- Guan, C., T. Cui, et al. (1996). "Activation of glycosylasparaginase. Formation of active N-terminal threonine by intramolecular autoproteolysis." J Biol Chem **271**(3): 1732-7.
- Hannun, Y. A. (1996). "Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress." Science **274**(5294): 1855-9.
- Hass, G. M. and H. Neurath (1971). "Affinity labeling of bovine carboxypeptidase A Leu by N-bromoacetyl-N-methyl-L-phenylalanine. II. Sites of modification." Biochemistry **10**(19): 3541-6.
- Holmgren, J., H. Elwing, et al. (1980). "Gangliosides as receptors for bacterial toxins and Sendai virus." Adv Exp Med Biol **125**: 453-70.

- Hulkova, H., M. Cervenкова, et al. (2001). "A novel mutation in the coding region of the prosaposin gene leads to a complete deficiency of prosaposin and saposins, and is associated with a complex sphingolipidosis dominated by lactosylceramide accumulation." Hum Mol Genet **10**(9): 927-40.
- Hwang, Y. H., M. Tani, et al. (2005). "Subcellular localization of human neutral ceramidase expressed in HEK293 cells." Biochem Biophys Res Commun **331**(1): 37-42.
- Karas, M., D. Bachmann, et al. (1987). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non volatile compounds." Int. J. of Mass Spectrom. Ion Proc. **78**: 53-68.
- Karlsson, K. A. (1989). "Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria." Annu Rev Biochem **58**: 309-50.
- Kenworthy, A. K., N. Petranova, et al. (2000). "High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes." Mol Biol Cell **11**(5): 1645-55.
- Klein, A., M. Henseler, et al. (1994). "Sphingolipid activator protein D (sap-D) stimulates the lysosomal degradation of ceramide in vivo." Biochem Biophys Res Commun **200**(3): 1440-8.
- Knoll, F., T. Kolter, et al. (2000). "Sphingolipid photoaffinity labels." Methods Enzymol **311**: 568-600.
- Koch, J., S. Gartner, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification Of the first molecular lesion causing Farber disease." J Biol Chem **271**(51): 33110-5.
- Kolesnick, R. N. and M. R. Hemer (1990). "Characterization of a ceramide kinase activity from human leukemia (HL-60) cells. Separation from diacylglycerol kinase activity." J Biol Chem **265**(31): 18803-8.
- Kolesnick, R. N. and M. Kronke (1998). "Regulation of ceramide production and apoptosis." Annu Rev Physiol **60**: 643-65.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (1998). "Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses." Brain Pathol **8**(1): 79-100.
- Kolter, T. and K. Sandhoff (2005). "Principles of Lysosomal Membrane Digestion-Stimulation of Sphingolipid Degradation by Sphingolipid Activator Proteins and Anionic Lysosomal Lipids." Annu Rev Cell Dev Biol.
- Krishnamurthy, K., G. Wang, et al. (2007). "Ceramide regulates atypical PKC ζ /lambda-mediated cell polarity in primitive ectoderm cells. A novel function of sphingolipids in morphogenesis." J Biol Chem **282**(5): 3379-90.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

- Lansmann, S., K. Ferlinz, et al. (1996). "Purification of acid sphingomyelinase from human placenta: characterization and N-terminal sequence." FEBS Lett **399**(3): 227-31.
- Li, C. M., J. H. Park, et al. (1999). "The human acid ceramidase gene (ASAH): structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression." Genomics **62**(2): 223-31.
- Li, C. M., J. H. Park, et al. (2002). "Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes." Genomics **79**(2): 218-24.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). "Determination of enzyme dissociation constant." J. Am. Chem. Soc. **56**: 658.
- Linke, T. (2000). "Dissertation." Universität Bonn.
- Linke, T. (2000). "Purification, enzymatic characterization and interfacial activity of human acid ceramidase." Ph. D Thesis, University of Bonn.
- Linke, T., S. Lansmann, et al. (2000). "Purification of acid ceramidase from human placenta." Methods Enzymol **311**: 201-7.
- Lottspeich, F. Z., H. (1998). Bioanalytik, Spektrum Verlag.
- MacDonald, R. C., R. I. MacDonald, et al. (1991). "Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles." Biochim Biophys Acta **1061**(2): 297-303.
- Mandon, E. C., I. Ehses, et al. (1992). "Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver." J Biol Chem **267**(16): 11144-8.
- Markwell, M. A., L. Svennerholm, et al. (1981). "Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5406-10.
- Matsuda, J., M. Kido, et al. (2004). "Mutation in saposin D domain of sphingolipid activator protein gene causes urinary system defects and cerebellar Purkinje cell degeneration with accumulation of hydroxy fatty acid-containing ceramide in mouse." Hum. Mol. Genet. **13**: 2709-23.
- Matsudaira, P. (1987). "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes." J Biol Chem **262**(21): 10035-8.
- Michel, C., G. van Echten-Deckert, et al. (1997). "Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide." J Biol Chem **272**(36): 22432-7.
- Moser, H., W., T. Linke, et al. (2001). "Ceramidase Deficiency: Farber Lipogranulomatosis." The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Mc-Graw Hill, New York, 8th Edition: 2589-2599.
- Müller, G., M. Ayoub, et al. (1995). "PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid." Embo J **14**(9): 1961-9.

- Murase, K., T. Fujiwara, et al. (2004). "Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques." *Biophys J* **86**(6): 4075-93.
- O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow (1992). *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. New York.
- Oinonen, C. and J. Rouvinen (2000). "Structural comparison of Ntn-hydrolases." *Protein Sci* **9**(12): 2329-37.
- Okino, N., X. He, et al. (2003). "The Reverse Activity of Human Acid Ceramidase." *J Biol Chem* **278**(22): 29948-53.
- Olivera, A. and S. Spiegel (1993). "Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens." *Nature* **365**(6446): 557-60.
- Packer, N. H., M. A. Lawson, et al. (1998). "A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins." *Glycoconj J* **15**(8): 737-47.
- Pewzner-Jung, Y., S. Ben-Dor, et al. (2006). "When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)?: Insights into the regulation of ceramide synthesis." *J Biol Chem* **281**(35): 25001-5.
- Roche, T. E. and B. A. McFadden (1969). "Active site modification of isocitrate lyase." *Biochem Biophys Res Commun* **37**(2): 239-46.
- Roepstorff, P. and J. Fohlman (1984). "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides." *Biomed Mass Spectrom* **11**(11): 601.
- Rother, J., G. van Echten, et al. (1992). "Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells." *Biochem Biophys Res Commun* **189**(1): 14-20.
- Sandhoff, K. and T. Kolter (2003). "Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1433): 847-61.
- Schnabel, D., M. Schroder, et al. (1992). "Simultaneous deficiency of sphingolipid activator proteins 1 and 2 is caused by a mutation in the initiation codon of their common gene." *J Biol Chem* **267**(5): 3312-5.
- Schütz, G. J., G. Kada, et al. (2000). "Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy." *Embo J* **19**(5): 892-901.
- Schwarzmann, G. and K. Sandhoff (1990). "Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids." *Biochemistry* **29**(49): 10865-71.
- Schwarzmann, G., M. Wendeler, et al. (2005). "Synthesis of novel NBD-GM1 and NBD-GM2 for the transfer activity of GM2-activator protein by a FRET-based assay system." *Glycobiology* **15**(12): 1302-11.
- Seemüller, E., A. Lupas, et al. (1996). "Autocatalytic processing of the 20S proteasome." *Nature* **382**(6590): 468-71.

- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Simpson, M. A., H. Cross, et al. (2004). "Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase.[see comment]." Nature Genetics **36**(11): 1225-9.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Suresh, C. G., A. V. Pundle, et al. (1999). "Penicillin V acylase crystal structure reveals new Ntn-hydrolase family members." Nat Struct Biol **6**(5): 414-6.
- Tani, M., Y. Igarashi, et al. (2005). "Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu." J Biol Chem **280**(44): 36592-600.
- Tani, M., N. Okino, et al. (2000). "Molecular cloning of the full-length cDNA encoding mouse neutral ceramidase. A novel but highly conserved gene family of neutral/alkaline ceramidases." J Biol Chem **275**(15): 11229-34.
- Tikkanen, R., A. Riikonen, et al. (1996). "Functional analyses of active site residues of human lysosomal aspartylglucosaminidase: implications for catalytic mechanism and autocatalytic activation." Embo J **15**(12): 2954-60.
- Tohyama, J., Y. Oya, et al. (1999). "Ceramide accumulation is associated with increased apoptotic cell death in cultured fibroblasts of sphingolipid activator protein-deficient mouse but not in fibroblasts of patients with Farber disease." J Inherit Metab Dis **22**(5): 649-62.
- Tretter, V., F. Altmann, et al. (1991). "Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1---3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue." Eur J Biochem **199**(3): 647-52.
- Tsuboi, K., Y. X. Sun, et al. (2005). "Molecular characterization of N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase." J Biol Chem **280**(12): 11082-92.
- van Blitterswijk, W. J., A. H. van der Luit, et al. (2003). "Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics?" Biochem J **369**(Pt 2): 199-211.
- Voet, D., Voet, J. G. (1990). Biochemie, Wiley.
- Wendeler, M., H. Reilaender, et al. (2003). "Recombinant ganglioside GM2 synthase--expression in insect cells and enzyme assay." Methods Enzymol **363**: 476-89.
- Wilchek, M. and D. Givol (1977). "Haloacetyl derivatives." Methods Enzymol **46**: 153-7.

Zeller, C. B. and R. B. Marchase (1992). "Gangliosides as modulators of cell function." Am J Physiol **262**(6 Pt 1): C1341-55