

Entwicklung eines kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays zur Untersuchung membranaktiver Proteine

Untersuchung der Funktionsweise des GM2- Aktivatorproteins und der Auswirkung des, zur Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine verwendeten, Hexahistidin-Restes auf die Aktivatorfunktion

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Susi Anheuser

aus

Neuwied

Bonn Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2006 bis Juli 2011 unter der Leitung von Professor Dr. Konrad Sandhoff am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt. In der Zeit von Mai 2004 bis Juni 2006 wurde, betreut durch Fr. Dr. Schepers, an einem Thema auf RNAi-Ebene gearbeitet, welches sich leider als nicht durchführbar erwies.

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

1. Referent: Professor Dr. Konrad Sandhoff
2. Referent: Professor Dr. Jörn Piel
3. Referent: Professor Dr. Ulrich Kubitscheck
4. Referent: Privatdozent Dr. Thomas Kolter

Tag der Promotion: 19.10.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Danksagung

Herrn Professor Dr. Konrad Sandhoff danke ich für die Ermöglichung, Förderung und freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Jörn Piel danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats

Herrn Privatdozent Dr. Thomas Kolter danke ich für die Durchsicht der Arbeit, sowie für zahlreiche anregende Diskussionen.

Frau Dr. Natascha Rimmel danke ich für die gründliche Durchsicht des Manuskriptes, die Einarbeitung in die Liposomendarstellung und die SPR, sowie für zahlreiche weiterführende Diskussionen.

Herrn Dr. Schwarzmann danke ich für die Synthese der fluoreszenten und radioaktiven Substrate, die Durchsicht der Arbeit und manches beratende Gespräch.

Herrn Dr. Hany Farwanah danke ich für die Einarbeitung in die FRET-Technik und die kooperative Unterstützung.

Bei Frau Dr. Breiden bedanke ich mich für die technische Einarbeitung in die Lipidanalysen, für die Überlassung einiger BioMag-Transfer-Assay Daten, die Durchsicht der Arbeit und manche anregende Diskussion.

Herrn Dr. Mathew Adebayo danke ich für die Einarbeitung in die BioMag®-Technik.

Bei Frau Dr. Michaela Wendeler bedanke ich mich für die Bereitstellung der Viren für das GM2-Aktivatorprotein.

Bei Herrn André Gerhard bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Insektenzellkultur und manch anregende Diskussion.

Frau Dr. Christina Schütte und Herrn Dr. Hichem Gallala danke ich für die Bereitstellung der β -Hexosaminidase A.

Herrn Dr. Stephan Hepbildikler danke ich für die Aufreinigung des GM2-Aktivatorproteins aus Gewebe.

Frau Dipl. Ing. Heike Hupfer, sowie Fr. Dr. Marianne Engeser und ihre Mitarbeiterinnen danke ich für die MALDI-Messungen.

Allen Laborkollegen und Mitarbeitern des Arbeitskreises sei für das angenehme Arbeitsklima, sowie die vielen Diskussion und manchen Ratschlag gedankt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
AE	Aktivatoreinheit
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BEVS	Baculovirus-Expressionsvektorsystem
BioMag [®]	Trennverfahren über Magnetismus
Biotin-PE	Biotin an Phosphatidyletanolamin gebunden
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Cer	Ceramid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
Chol	Cholesterol
Cit	Citrat
CoA	Coenzym A
Con A	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i> , gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
CV	Säulenvolumen
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DO-BMP	Dioleoylbis(monoacylglycero)phosphat
Em	Emmissionsspektrum
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktionsspektrum
F ^A	Fluoreszenz der Akzeptorvesikel
F ^{A+B}	Fluoreszenz der Akzeptorvesikel nach BioMag-Behandlung
F ^D	Fluoreszenz der Donorvesikel
F ^{D+A}	Fluoreszenz der Donorvesikel in Anwesenheit der Akzeptorvesikel
F ^{D+A+B}	Fluoreszenz der Donorvesikel und Akzeptorvesikel nach BioMag-Behandlung
F ^{D+A+P+B}	Fluoreszenz der Donorvesikel und Akzeptorvesikel nach Proteinzugabe und nach BioMag-Behandlung
F ^{D+B}	Fluoreszenz der Donorvesikel nach BioMag-Behandlung
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
Fuc	Fucose
GA2	Asialo-Gangliosid GA2 = GalNAcβ1→4Galβ1→4Glcβ1→1Cer
Gal	Galaktose
GalCer	Galaktosylceramid = Galβ1→1Cer
GalNAc	N-Acetyl-D-Galaktosamin
Glc	Glucose
GlcCer	Glucosylceramid = Glcβ1→1Cer
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GM1	Gangliosid GM1
GM2	Gangliosid GM2

GM2AP	GM2-Aktivatorprotein
GM3	Gangliosid GM3
GSL	Glykosphingolipid
HexA	β -Hexosaminidase A, 2-Acetamido-2-desoxy- β -D-hexosid-acetamido-desoxyhexohydrolase A
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
LacCer	Laktosylceramid
LLBP	Lysosomales Lipid Bindungs Protein
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
m/z	Masse pro Ladung
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte-Laser-Desorption-Ionisations/ Flugzeit-Massenspektrometrie
Man	Mannose
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MeOH	Methanol
mN/m	Millinewton pro Meter
MUG	4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
MUGS	4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid-6-sulfat
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NAc-	<i>N</i> -Acetyl
NaCit	Natriumcitrat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NBD-	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NBD-PE	N-NBD-Phosphatidylethanolamin
2-NBD-GM1	β -D-galactopyranosyl-(1,3)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranosyl-(1,4)-[α -D-neuraminyl-(2,3)]- β -D-galactopyranosyl-(1,4)- β -D-glucopyranosyl-(1,1)-(2S,3R, 4E)-2-[(2-N-(7-nitrobenz-1,3-diazol-2-oxa-4-yl)-amino)-octadecanamido]-4-octadecen-1,3-diol
2-NBD-GM1 ^{F 6/7}	6/7 der Fluoreszenz der äußeren Membranhälfte (Messwert dividiert durch 2) von Vesikeln mit 2 mol% 2-NBD-GM1
NiNTA	Nickel-Nitriloessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PM	Plasmamembran
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine
R ^A	Radioaktivität der Akzeptorvesikel
R ^{A+B}	Radioaktivität der Akzeptorvesikel nach BioMag-Behandlung
R ^D	Radioaktivität der Donorvesikel
R ^{D+A}	Radioaktivität der Donorvesikel zusammen mit den Akzeptorvesikeln
R ^{D+A+B}	Radioaktivität der Donorvesikel und der Akzeptorvesikel nach BioMag-Behandlung
R ^{D+B}	Radioaktivität der Donorvesikel nach BioMag-Behandlung
R ^{D+A+P+B}	Radioaktivität der Donorvesikel und Akzeptorvesikel nach Proteinzugabe und nach BioMag-Behandlung

rGM2AP-His6	rekombinantes GM2-Aktivatorprotein mit Hexahistidin-Rest
Rhodamin-PE	Phosphatidylethanolamin mit Rhodamin markiert
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
rSap-A	rekombinantes Saposin A
rSap-A-His6	rekombinantes Saposin A mit Hexahistidin-Rest
rSap-B-His4	Saposin B, rekombinant mit Tetrahistidin-Rest
RT	Raumtemperatur
RU	Response Units
SAP	Sphingolipidaktivatorprotein
Sap-A	Saposin A
Sap-B	Saposin B
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SL	Sphingolipide
SM	Sphingomyelin
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDC	Taurodeoxycholat
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
v/v, w/v	Volumen pro Volumen, Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	V
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
2.1 Glykosphingolipide	5
2.1.1 (Glyko)sphingolipid-Katabolismus in Säugern.....	7
2.1.2 Sphingolipid-Speicherkrankheiten.....	11
2.1.3 Abbauende lysosomale Enzyme und Sphingolipidaktivatorproteine am Beispiel der HexA und des GM2APs	13
2.1.4 Das GM2-Aktivatorprotein	15
2.2 Fusion von Membranen	17
2.3 Liposomen als Model	18
2.4 Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Membranfusion	19
2.4.1 Lipidmixing-Assays zur Untersuchung von Vesikelfusion.....	19
2.4.2 Contentmixing-Assay zur Untersuchung von Vesikelfusion	20
2.4.3 Dynamische Lichtstreuung.....	21
2.5 Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Lipidtransfer und Membraninteraktion	22
2.5.1 FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) zur Untersuchung von Lipidtransfer	22
2.5.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zur Untersuchung von Membraninteraktion	23
2.6 In der Abteilung verwendete Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays	25
2.6.1 Transfer-Assay mittels FRET (Schwarzmann et al., 2005).....	25
2.6.2 Transfer-Assay mittels magnetischer Trennung (nach Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007)	26
2.6.3 Fusions-Assay mittels magnetischer Trennung (nach Abdul-Hammed et al., 2010)	27
2.7 Zielsetzung	28
3. ERGEBNISSE	29
3.1 Darstellung und Charakterisierung des rGM2AP-His6 und des GM2APs	29
3.1.1 Expression und Charakterisierung des rGM2AP-His6.....	29
3.1.2 Charakterisierung des GM2AP aus Gewebe	31
3.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance)	32
3.2.1 Wechselwirkungen des rGM2AP-His6 mit immobilisierten Lipiddoppelschichten und Kontrolleexperimente	32
3.2.1.2 Grundlagen.....	32
3.2.1.3 Messungen ohne Ganglioside in den Liposomen	35
3.2.1.4 Messungen mit Gangliosid-haltigen Liposomen.....	38
3.2.2 Endogenes GM2AP aus Nierengewebe	41
3.3 Dynamische Lichtstreuung	43
3.4 Entwicklung eines kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays	44
3.4.1 Enzymaktivitäts-Assay mit 2-NBD-GM2	52
3.4.2 Auswertungs- und Abbildungsschema der Ergebnisse des kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays	53
3.4.2.1 FRET-Auswertung	54
3.4.2.2 Auswertung nach der magnetischen Separation mittels BioMag [®] -Magnetkügelchen:	54
3.4.2.3. Erklärung der Auswertungsgraphiken	56

3.4.3 Sowohl GM2AP als auch rGM2AP-His6 transferierte im Assay mit BMP- und Cholesterol-freien Vesikeln (Basisvesikel) 2-NBD-GM1 und vermittelte Vesikelfusion	58
3.4.4 Kontrolle mit Hexahistidin-Peptid (His6)	60
3.4.5 Zusatz von DO-BMP (20 mol%) zu der Präparation der Basisvesikel steigert den Transfer von 2-NBD-GM1 und verringert die Vesikelfusion durch beide Proteinpräparate	61
3.4.6 Im Vergleich zu Basisvesikeln wurde bei Vesikeln mit Cholesterol (20 mol%) bei beiden Präparaten der Transfer von 2-NBD-GM1 erhöht und die Vesikelfusion verringert	64
3.4.7 In Anwesenheit von DO-BMP senkte Cholesterol den Transfer von 2-NBD-GM1 durch GM2AP und rGM2AP-His6 und erhöht die Vesikelfusion	66
3.4.8 In Gegenwart von Cholesterol steigerte DO-BMP beim GM2AP die Vesikelfusion	68
3.4.9 Verringerung der Ionenstärke führte bei GM2AP zu einer Erhöhung der Vesikelfusion	72
3.4.10 Einfluss des pH-Wertes auf Lipidtransfer und Vesikelfusion durch GM2AP und rGM2AP-His6	74
3.4.11 Sphingomyelin verringerte bei beiden Präparaten die Fluoreszenzfreisetzung im FRET, sowie bei GM2AP den Transfer von 2-NBD-GM1	76
4. DISKUSSION	78
4.1 Expression und Charakterisierung des GM2AP.....	78
4.2 Biophysikalische Untersuchungen.....	80
4.2.1 SPR	80
4.2.2 DLS	87
4.2.3 Grundlagen und Entwicklung eines kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay mittels FRET und magnetischer Separation	89
4.2.4 Transfer und Fusions-eigenschaften vom GM2AP und rGM2APs	96
4.2.4.1 Messungen mit GM2AP aus Gewebe.....	96
4.2.4.1.1 Simulation der Gegebenheiten nahe der Zellmembran	96
4.2.4.1.1.1 Auswirkungen des hohen Cholesterolgehaltes und des Fehlen von BMP	96
4.2.4.1.1.2 Auswirkungen des Sphingomyelins	97
4.2.4.1.2 Simulation der Gegebenheiten in den Endosomen	98
4.2.4.1.3 Simulation der Gegebenheiten beim intralysosomalen Gangliosid-Abbau	99
4.2.4.1.4 pH-Abhängigkeit	100
4.2.4.1.5 Einfluss der Ionenstärke auf die Eigenschaften des GM2AP	101
4.2.4.1.6 Zusammenfassung der Beobachtungen am GM2AP aus Gewebe.....	101
4.2.4.2 Auswirkungen des Hexahistidin-Restes	102
4.2.4.2.2 Messungen mit rGM2AP-His6 unter Bedingungen, welche die Gegebenheiten der späten Endosomen simulierten	103
4.2.4.2.3 Messungen mit rGM2AP-His6 unter Bedingungen welche die Gegebenheiten an den intralysosomalen Membranen simulieren.....	104
4.2.4.2.4 pH-Abhängigkeit der durch rGM2AP-His6 vermittelten Vorgänge	104
4.2.4.2.5 Einfluss der Ionenstärke auf die Eigenschaften des rGM2AP-His6	104
4.2.4.2.6 Zusammenfassung der Auswirkungen des Hexahistidin-Restes	105
4.3 Ausblick	107
5. MATERIAL UND METHODEN	109
5.1 Material	109
5.1.1 Geräte	109
5.1.2 Verbrauchsmaterial	111
5.1.3 Chemikalien	112
5.1.4 Lipide und Substrate	113
5.1.5 Enzyme, Antikörper und Proteine.....	113
5.1.6 Lösungen, Medien und Puffer.....	113
5.1.7 Säulen und Säulenmaterialien	116
5.1.7.1 Fertigsäulen	116
5.1.7.2 Säulenmaterialien	116
5.1.8 Insektenzelllinien und Viren	116
5.1.8.1 Sf21-Zellen	116
5.1.8.2 Sf9-Zellen	117
5.1.8.3 Baculoviren	117

5.2.Methoden	117
5.2.1 Arbeiten mit Insektenzellen	117
5.2.1.1 Kultivierung von Insektenzellen	117
5.2.1.2 Virusamplifikation	118
5.2.1.3 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay	118
5.2.1.4 Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression	119
5.2.2 Arbeiten mit Proteinen	119
5.2.2.1 Reinigung des in Insektenzellen exprimierten rekombinanten GM2-Aktivatorproteins (rGM2AP-His6).....	119
5.2.2.2 Proteinchemische Methoden	120
5.2.2.2.1 Proteinquantifizierung mit Hilfe der Bicinchoninsäure-Methode	120
5.2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen.....	120
5.2.2.2.3 Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Silberfärbung	120
5.2.2.2.4 Immunochemischer Nachweis des GM2-Aktivatorproteins.....	121
5.2.2.2.5 Matrix-unterstützte Laser Desorption/ Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).....	121
5.2.2.2.6 Bestimmung der β -Hexosaminidase A (Hex A) Aktivität mittels fluorogenen synthetischen Substraten ..	122
5.2.2.2.7 <i>In vitro</i> -Aktivitätsmessung des GM2APs im liposomalen Testsystem	122
5.2.3 Arbeiten mit Lipiden / Liposomen	123
5.2.3.1 Darstellung von Liposomen (MacDonald et al., 1991)	123
5.2.3.2 Bestimmung des Lipidgehalts der Liposomen	123
5.2.4 Biophysikalische Methoden	123
5.2.4.1 Dynamische Lichtstreuung, DLS	123
5.2.4.2 Oberflächen-Plasmonresonanzspektroskopie, SPR	124
5.2.4.2.1 Interaktion des GM2APs mit immobilisierten Liposomen.....	124
5.2.4.3 Transfer- / Fusions-Assays	124
5.2.4.3.1 Transfer-Assay (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007)	124
5.2.4.3.2 Kombiniertes Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay	125
 LITERATUR	 126
 LEBENS LAUF	 137

1. Zusammenfassung

Glykosphingolipide, die aus der Plasmamembran stammen, erreichen nach ihrer Endozytose intraendosomale und intralysosomale Vesikel, auf deren Oberfläche sie von lysosomalen Exohydrolasen abgebaut werden (Übersichtsartikel: Sandhoff und Kolter, 1996). Die intralysosomalen Vesikel unterscheiden sich von der begrenzenden Membran durch das Fehlen einer schützenden Glykokalix und besitzen annähernd kein Cholesterol, dafür aber das lysosomale Markerlipid Bis(monoacylglycero)phosphat.

Zum effektiven Abbau von Lipiden mit nur wenigen Zuckerresten werden zudem wasserlösliche Hilfsproteine, die Sphingolipid-Aktivatorproteine benötigt, welche an der Phasengrenze die Interaktion zwischen membranständigem Substrat und wasserlöslichem Enzym vermitteln. Zu diesen Hilfsproteinen zählen die vier Saposine A-D, kleine, enzymatisch inaktive Glykoproteine, die trotz ihrer hohen Sequenzhomologie unterschiedliche Spezifitäten und Mechanismen aufweisen, und das GM2-Aktivatorprotein.

Das GM2-Aktivatorprotein vermittelt beim Abbau des Gangliosides GM2 die Reaktion mit der β -Hexosaminidase A (3.2.1.52, HexA). Die physiologische Relevanz dieses Proteins wird durch das Auftreten von genetisch bedingten GM2-Aktivatorprotein-Defizienzen (AB-Variante der GM2-Gangliosidosen) belegt, welche zur massiven lysosomalen Speicherung von GM2 und zum frühen Tod führen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion des GM2-Aktivatorproteins beim lysosomalen Abbau zu untersuchen. Von besonderem Interesse war die Frage, inwieweit verschiedene Membranlipide die Interaktion des GM2-Aktivatorproteins mit membran-gebundenem GM2 in einem detergentenfreien, liposomalen System beeinflussen und ob der zur Reinigung rekombinant exprimierter Proteine verwendete Hexahistidin-Rest die Funktion membranaktiver Proteine beeinflussen kann.

Ein bereits vorliegendes Präparat aus menschlichem Nierengewebe wurde bezüglich Homogenität und Aktivität untersucht. Zudem wurde ein rekombinantes GM2-Aktivatorprotein mit Hexahistidinrest mittels des Baculovirus-Expressionsvektor-Systems in Insektenzellen exprimiert, dem Präparat aus Gewebe entsprechend charakterisiert und mit diesem verglichen.

Die Wechselwirkung beider GM2-Aktivator-Präparate mit Lipiddoppelschichten wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance, SPR*) untersucht.

Hierbei wies das GM2-Aktivatorprotein aus Gewebe eine stark membrandestabilisierende Wirkung auf. Noch während der Überleitung des Proteins kam es zur Ablösung von Lipidmaterial von Chip. Das rekombinante Präparat mit Hexahistidin-Rest zeigte deutlich andere Eigenschaften. Hier konnte nur Anbindung an die Liposomen, aber keine membranauflösende Aktivität nachgewiesen werden.

Um das Verhalten der beiden Proteinpräparate gegenüber Membranen genauer untersuchen zu können, wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches den Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Assay (Schwarzmann et al., 2005) und den Fusions-Assay mittels magnetischer Separation (Abdul-Hammed et al., 2010) in einem Assay kombinierte. Der entwickelte Assay besteht somit aus zwei Teilen, wodurch es ermöglicht wird zwischen Lipidtransfer und Membranfusion zu unterscheiden, sowie Einblick in die Kinetik der Reaktion zu gewinnen. Anhand dieses kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays sollten die Eigenschaften des GM2-Aktivatorproteins aus menschlichem Nierengewebe und des rekombinant gewonnenen Präparates mit Hexahistidin-Rest untersucht werden.

Das aus Gewebe gewonnene GM2-Aktivatorprotein vermittelte sowohl Vesikelfusion als auch Transfer von 2-NDB-GM1 zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln. Beide Eigenschaften waren abhängig von pH, Ionenstärke und der Lipidzusammensetzung der Modelmembranen. Anionische Lipide, wie das lysosomale BMP, steigerten den Transfer von 2-NBD-GM1 deutlich. Dieses bestätigte vorhergegangene Messungen, welche zeigten, dass für den membrangebundenen Abbau von GM2 beide Komponenten, das GM2-Aktivatorprotein und anionische, lysosomale Phospholipide, benötigt wurden (Werth et al., 2001). Cholesterol, Sphingomyelin und hoher pH-Wert senkten den Lipidtransfer.

Wir konnten zeigen, dass das rekombinant erzeugte GM2-Aktivatorprotein mit Hexahistidin-Rest grundsätzlich stärkere Vesikelfusion vermittelt. Absenkung der Ionenstärke sowie Variation des Cholesterol- oder des BMP-Gehaltes hatten nur sehr geringen Einfluss auf diese fusogenen Eigenschaften. Der Grund dafür schien in der zusätzlichen elektrostatischen Interaktion der bei pH 4,2 negativ geladenen Vesikeloberfläche und dem sechsfach positiv geladenen Hexahistidin-Rest zu liegen. Die einzig signifikante Veränderung bezüglich der Vesikelfusion wurde bei rGM2AP-His6 durch pH-Variation erreicht: Erhöhung des pHs führt zu verringerter Vesikelfusion. Dieses sprach stark dafür, dass die Interaktion der Histidin-Reste mit der

Vesikeloberfläche die Vesikelfusion verstärkt, da die positive Ladung des Hexahistidin-Restes bei pH-Erhöhung abnahm.

Die vorliegende Arbeit stellt somit ein neues System vor, welches es in einem Assay ermöglicht die Wechselwirkung von Proteinen mit Lipidvesikeln hinsichtlich ihrer Lipidtransfer- und Vesikelfusionseigenschaften zu untersuchen und zeigt, dass der Hexahistidin-Rest bei der Untersuchung von Lysosomalen Lipid Bindungs Proteinen und anderen membranaktiven Proteinen berücksichtigt werden muss.

2. Einleitung

2.1 Glykosphingolipide

Neben Cholesterol und Glycerophospholipiden handelt es sich bei den Glykosphingolipiden (GSL) um essentielle, ubiquitäre Bestandteile der Plasmamembran eukaryontischer Zellen (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999, Wiegandt, 1995). Mit ihrem Ceramidrest mit *N*-acylierter Sphingosingruppe sind sie in der äußeren Hälfte der Lipiddoppelschicht verankert (Gahmberg und Hakomori, 1973). Des Weiteren besitzen sie hydrophile Oligosaccharidkopfgruppen, welche in den Extrazellulärraum ragen und dort zusammen mit den membranständigen Glykolipiden und Proteoglykanen die Glykokalix der Zelloberfläche bilden (Thompson und Tillack, 1985).

An die primäre Hydroxylgruppe der Sphingosingruppe ist über β -glykosidische Bindung entweder Glucose oder Galaktose gebunden, wodurch Glucosylceramid oder Galaktosylceramid entstehen, welches die einfachsten GSL sind. Im Anschluss wird durch Verknüpfung mit einer Phosphorylcholin-Einheit Sphingomyelin, ein sehr häufig in den Plasmamembranen vorkommendes Membranlipid, gebildet. Weitere Verknüpfung der Ceramide mit Zuckerresten und Sulfatgruppen führt zu einer breiten Auswahl an komplexen GSL. Durch die hohe strukturelle Vielfalt und Komplexität, welche aus unterschiedlichen Verknüpfungen einer geringen Zahl an Zuckerresten entsteht (Laine, 1994), erweisen sich Glykokonjugate als vielfältiger Speicher struktureller Information und wirken als selektive Kontaktstrukturen und Vermittler spezifischer biologischer Interaktion an der Zelloberfläche. GSL können die Eigenschaften von Membranen (z.B. Fluidität) und deren Organisation beeinflussen. Ihre Kopfgruppen interagieren zudem mit exogenen Bindungspartnern und dienen so als Erkennungsstelle für Toxine (Holmgren et al., 1975, Kitamura et al., 1980), Viren (Markwell et al., 1981, Smith A.E., 2003, Tsai B., 2003) und Bakterien (Hanada, 2005, Karlsson, 1989), vermitteln Zell-Zell-Kontakte ((Hakomori, 2004, Phillips et al., 1990, Varki, 1993, Walz et al., 1990), Abb.1) und sind für die Entwicklung multizellulärer Organismen unverzichtbar (Übersichtsartikel: Kolter et al., 2000).

So modulieren GSL membrangebundene Rezeptoren und Enzyme (Bremer et al., 1986, Hanai et al., 1988, Miljan et al., 2002, Yates und Rampersaud, 1998). Sie sind auf unterschiedliche Weise an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Lipophile Intermediate ihres Stoffwechsels, wie zum Beispiel Ceramid, Sphingosin und ihre Phosphate - Ceramid-1-Phosphat,

Sphingosin-1-Phosphat (Chalfant und Spiegel, 2005) - dienen als Signalmoleküle bei Apoptose, Proliferation, Differenzierung, Entzündungsprozessen, Transformation und Onkogenese (Birkelè et al., 2003, Hakomori, 1981, Yu, 1994), Übersichtsartikel: Maceyka et al., 2005, Posse de Chaves, 2006, Taha et al., 2006).

GSL, welche sich von der Ganglioreihe ableiten und zudem *N*-Acetylneuraminsäure beinhalten, werden als Ganglioside bezeichnet. Diese komplexen GSL werden vor allem auf Zellen des Zentralen Nervensystems gefunden (Ledeen et al., 1998, Svennerholm, 1963).

Fehlt der Kohlenhydratanteil, wie bei Sphingomyelin oder Ceramid, spricht man von Sphingolipiden (SL). Auch der Fettsäureanteil und die Sphingoidbase der GSL sind variabel bezüglich Länge, Sättigungsgrad und Derivatisierung.

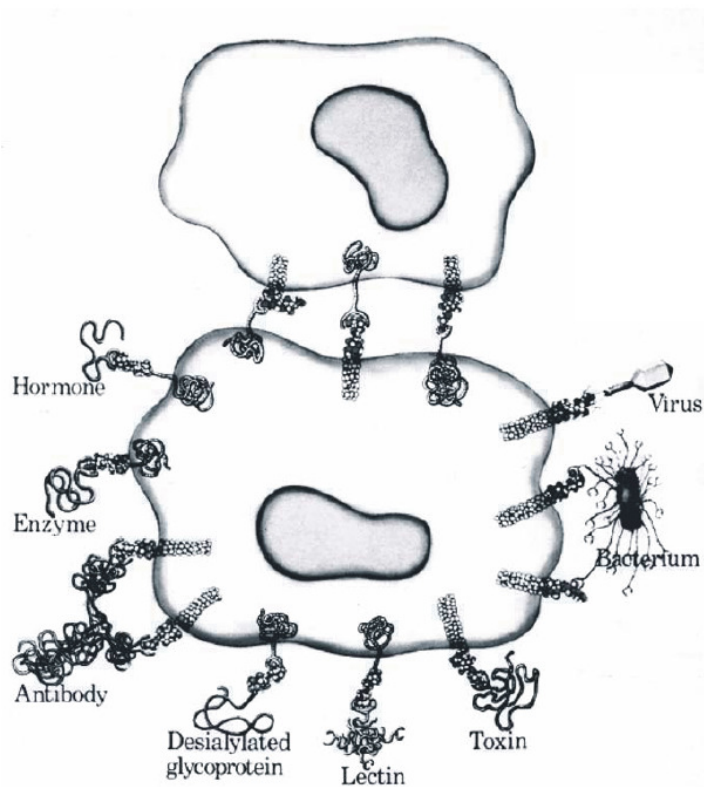


Abbildung 1: Mögliche Funktionen der Glykosphingolipide

GSL und Glykoproteine fungieren als Bindungspartner für eine Vielzahl von verschiedenen Biomolekülen und Organismen (nach BioCarb).

2.1.1 (Glyko)sphingolipid-Katabolismus in Säugern

Die Zelloberfläche ist einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen. Die für den Abbau bestimmten GSL der Plasmamembran werden internalisiert, ihr erfolgt dann schrittweise in den Endosomen und Lysosomen. Der Vorgang startet an der Zellmembran mit der Abschnürung von Caveolae (Möbius et al., 1999). Die GSL erreichen das lysosomale Kompartiment der Zelle (Maxfield und McGraw, 2004) als Komponenten intraendosomaler oder intralysosomaler Membranen (Burkhardt et al., 1997, Fürst und Sandhoff, 1992, Möbius et al., 1999). Auf deren Oberfläche werden sie sequentiell durch saure Exohydrolasen bis zum Ceramid abgebaut. Dieses wird von der sauren Ceramidase zu Sphingosin und einer Fettsäure deacyliert. Erst die Grundbausteine – Monosaccharide, Sialinsäure, Fettsäuren und Sphingosin – sind in der Lage, das Lysosom zu verlassen, und werden dann dem weiteren Abbau zugeführt oder in anabolen Stoffwechselprozessen erneut eingesetzt.

Die katabolischen Glykosidasen sind im Gegensatz zu den Biosyntheseenzymen nicht membrangebunden, ihre Substrate sind jedoch in den innerlysosomalen Membranen eingebettet. Daher sind Lipide mit kurzen Kohlenhydratketten den Hydrolasen sterisch nicht mehr zugänglich, so dass GSLs mit weniger als vier Kohlenhydratresten spezifische wasserlösliche, nicht-enzymatische Sphingolipid-Aktivatorproteine (SAPs) benötigen, welche die Glykosidasen bei der Wechselwirkung mit ihren Substraten unterstützen (Jatzkewitz, 1978, Sandhoff et al., 1995). Bisher sind fünf solcher Proteine bekannt: Saposin A, B, C, D (Fürst et al., 1988, Nakano et al., 1989, O'Brien et al., 1988) und das GM2-Aktivatorprotein (Conzelmann und Sandhoff, 1979, Doering et al., 1999a, Kolter et al., 2005, Wendeler et al., 2006). Die Saposine A-D entstehen durch proteolytische Prozessierung aus ihrem Vorläufer Prosaposin (pSap), welcher von einem Gen auf Chromosom 10 kodiert wird (Fürst et al., 1988, O'Brien et al., 1988).

Zudem spielen die Aktivatorproteine auch eine Rolle im Immunsystem bei der Erkennung von Lipidantigenen (Winau et al., 2004, Yuan et al., 2007, Zhou et al., 2004) und bei der Ausbildung der Permeabilitätsbarriere der Haut (Doering et al., 1999a).

Optimale pH-Bedingungen für die am Abbau beteiligten Hydrolasen werden durch die fortschreitende Azidifizierung der endozytotischen Organellen hergestellt ((Maxfield und Yamashiro, 1987, Sun-Wada et al., 2003), Abb. 2). Ferner wird der Abbau durch negativ geladene lysosomale Lipide wie Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP, Abb. 3) unterstützt (Wilkening et al., 2000). Erbliche Defekte im GSL-Abbau gehen mit verschiedenen Erbkrankheiten einher (Übersichtsartikel: Chang et al., 2000, Kolter und Sandhoff, 1998).

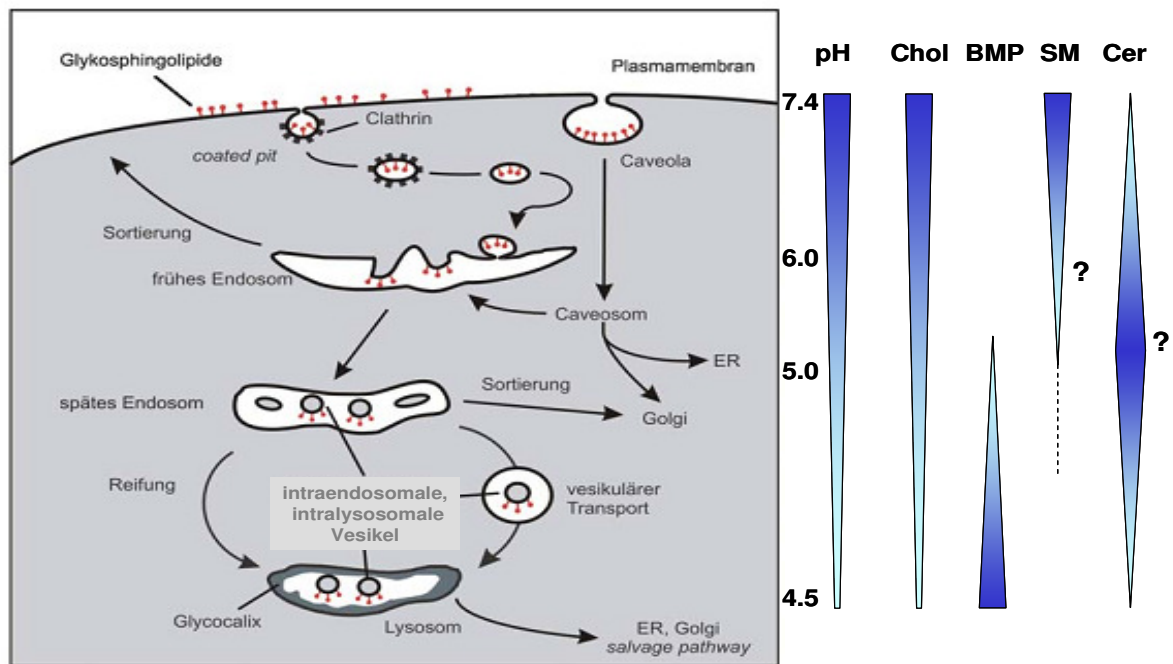


Abbildung 2: Topologie des lysosomalen GSL-Abbaus, modifiziert nach (Kolter und Sandhoff, 2005). Von der Plasmamembran ausgehend über die intraendosomalen und intralysosomalen Vesikel, steigt der Gehalt an BMP, der von Cholesterol sinkt. Parallel dazu werden die Organellen azidifiziert, die pH-Werte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

Die lysosomale Membran selbst wird durch eine Glykocalix aus hoch glykosylierten Membranproteinen vor dem Abbau geschützt (Conzelmann und Sandhoff, 1987, Eskelinen et al., 2003, Kolter und Sandhoff, 2006). Die intralysosomalen Vesikel hingegen werden durch die aus ihrer starken Krümmung resultierende Erniedrigung des Lateraldruckes destabilisiert. Der Durchmesser wurde mit 50-100 nm bestimmt (Bradová et al., 1993, Giehl et al., 1999). Im Vergleich zu den intraendosomalen Vesikeln besitzen intralysosomale Vesikel kaum noch Cholesterol, zudem kommt es zu einer Anreicherung des anionischen Lipids BMP (Kobayashi et al., 1998, Möbius et al., 2003). BMP (Abb. 3), ist in der limitierenden Perimetermembran nicht vorhanden. Es entsteht vermutlich beim Abbau von mitochondrialem Cardiolipin und Phosphatidylglycerol (Amidon et al., 1996, Brotherus und Renkonen, 1977). In Anwesenheit lysosomaler Phospholipasen besitzt es durch seine ungewöhnliche Stereochemie eine hohe Lebensdauer (Matsuzawa und Hostetler, 1979). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass lysosomale, anionische Lipide wie BMP den Abbau von GSL fördern (Hepbildikler et al., 2002, Linke et al., 2001a, Linke et al., 2001b, Locatelli-Hoops et al., 2006, Salvioli et al., 2000, Werth et al., 2001, Wilkening et al., 1998, Wilkening et al., 2000).

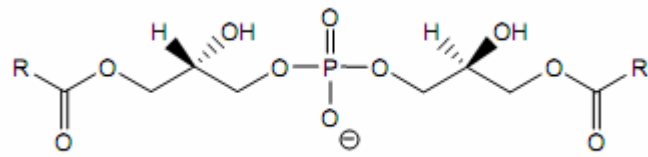


Abbildung 3: Struktur des sn1,sn1'-Bis(monoacylglycero)phosphats (BMP), R = Alkyl

BMP besitzt in seiner natürlichen Struktur eine sn-1-Anordnung. Die chiralen Kohlenstoffatome (an Position 2) verfügen beide über eine S-Konfiguration.

Wegen dieser speziellen Membranzusammensetzung, in Kombination mit dem pH-Wert, der Membrankrümmung, dem Lateraldruck und der Anwesenheit der Aktivatoren, findet der Sphingolipid-Katabolismus nur innerhalb des Lysosoms an den intralysosomalenen Vesikeln statt. So wird die Integrität der Zelle und ihrer Kompartimente nicht gefährdet.

Der strenger Regulation unterworfenen Sphingomyelinabbau in der Plasmamembran stellt eine Ausnahme dar. Der Abbau erfolgt hier durch die streng regulierte neutrale Sphingomyelinase und dient hauptsächlich der stressinduzierten Freisetzung von Ceramid als Signalmolekül (Clarke et al., 2006, Riboni et al., 1997).

Der Sphingolipidabbau kann auf fast jeder Stufe durch monogenetische Erbkrankheiten gestört werden (Abb.4, (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999, Kolter und Sandhoff, 2006)). Diese so genannten Sphingolipidosen zählen zu den lysosomalenen Speicherkrankheiten, von denen bisher ca. 40 Varianten bekannt sind (Vellodi, 2005).

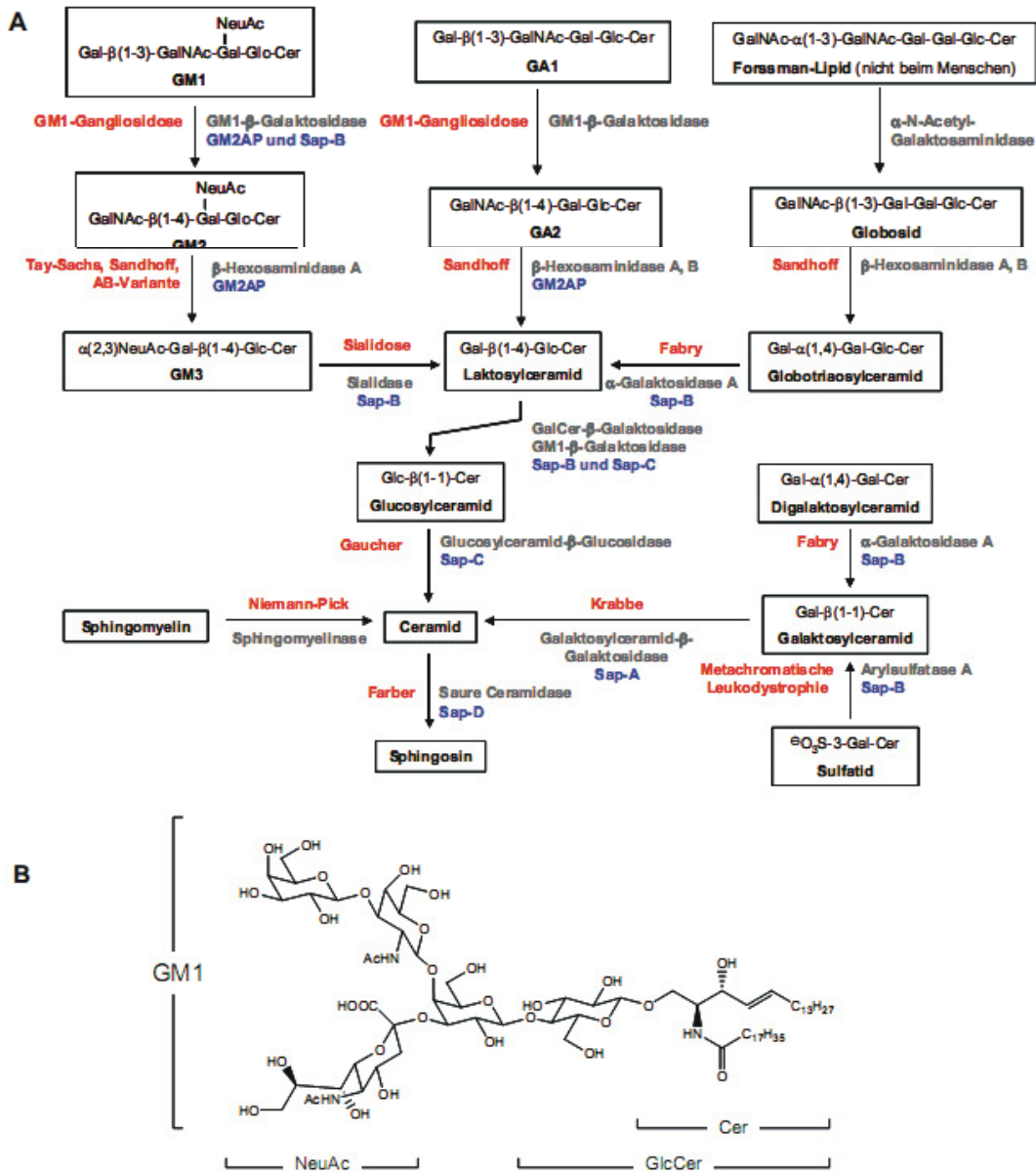


Abbildung 4: (A) Lysosomaler Lipidkatabolismus, Enzyme/Aktivorproteine und auftretende Krankheiten

Rot hervorgehoben sind die bei einer Blockade des entsprechenden Abbauschritt auftretenden Krankheiten. Daneben sind das Enzym und, falls notwendig, das Aktivatorprotein angegeben (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999).

(B) Struktur und Bestandteile des Gangliosides GM1 NeuAc: N-Acetylneuraminsäure, GlcCer: Glucosylceramid, Cer: Ceramid (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999).

2.1.2 Sphingolipid-Speicherkrankheiten

Der lysosomale Abbau von Sphingolipiden ist mit dem Auftreten verschiedener Erbkrankheiten verbunden (Übersichtsartikel: Gieselmann, 1995, Sandhoff, 2001). Die erbliche Störung eines oder mehrerer Abbauschritte führt zur Akkumulation von Sphingolipiden, und somit zum Auftreten lysosomaler Speicherkrankheiten (Sphingolipidosen). Ursache hierfür kann der Defekt eines Enzyms oder einer Gruppe ähnlicher Enzyme, aber auch eines Transport- oder Aktivatorproteins sein. Zum Beispiel fehlt bei der I-cell disease die Funktion des, für den Transport vieler lysosomaler Enzyme notwendigen, Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (Varki et al., 1981). Bei wirkstoffinduzierten Lipidosen vermutet man, dass die korrekt exprimierte saure Sphingomyelinase durch veränderte Membranzusammensetzung gehemmt und vorzeitig abgebaut wird. Es konnte gezeigt werden, dass kationische Amphiphile den Abbau des Sphingomyelins durch die saure Sphingomyelinase verhindern (Kölzer et al., 2004).

Die Erste bekannt gewordene und eingehend charakterisierte Sphingolipidose ist die Tay-Sachs Krankheit. Diese wurde erstmals 1881 von *Warren Tay* als „infantile amaurotische Idiotie“ beschrieben, die sich durch Blindheit (kirschröter Fleck hinter der Retina), verlangsamtes Wachstum, motorische Störungen und einen vergrößerten Kopf äußert, und im Alter von 3-5 Jahren zum Tod des Patienten führt.

Der Neurologe *Bernard Sachs* bemerkte das aufgeblähte Zytoplasma in den Neuronen solcher Patienten und erkannte außerdem die relativ weite Verbreitung der Krankheit in der jüdischen Bevölkerung. Später gelang es verschiedenen Wissenschaftlern, das Anschwellen der Neuronen auf eine Speicherung des Gangliosids GM2 zurückzuführen (Svennerholm, 1962). Abhängig von den verschiedenen Gendefekten, die eine Speicherung von GM2 zur Folge haben, sind mehrere Subtypen bzw. Varianten der Tay-Sachs Krankheit bekannt. Eine spezielle Form der GM2-Gangliosidose stellt die AB-Variante von Tay-Sachs dar (Conzelmann und Sandhoff, 1978, Übersichtsartikel: Gravel et al., 1995, Sandhoff et al., 1995). Hier ist nicht das abbauende Enzym, sondern das GM2-Aktivatorprotein betroffen. Durch dessen Defekt kann das GM2 der HexA nicht mehr zum Abbau präsentiert werden (Conzelmann und Sandhoff, 1978). Diese Form der GM2-Gangliosidose tritt ausgesprochen selten auf. Im Vergleich zu Tay-Sachs und der Sandhoff Krankheit, bei denen eine Vielzahl von Mutationen dokumentiert wurde, treten hier zudem nur wenige Mutationen auf. Diese sind autosomal rezessiv, was bedeutet, dass beide Allele des Gens betroffen sein müssen um die Krankheit auszulösen. Wird ein Fall der Aktivator-Defizienz beschrieben, so ist es sehr

wahrscheinlich, dass es sich bei den Eltern um Personen mit nahem Verwandtschaftsgrad oder um genetisch isoliert lebende Menschenpopulationen handelt.

Es sind jedoch auch juvenile und adulte Formen der Tay-Sachs Krankheit bekannt, die molekulare Ursache ist jedoch bei allen drei Verlaufsformen ein Defekt der β -Hexosaminidase A. Das Rest-Enzymaktivitäts Modell gibt eine für die meisten Sphingolipidosen passende Erklärung hierfür (Leinekugel et al., 1992). Es basiert darauf, dass das mutierte katabole Enzym seine katalytischen Fähigkeiten nicht ganz eingebüßt hat, sondern Aufgrund der Mutation veränderte kinetische Daten wie K_m und V_{max} aufweist. Zu einer Speicherung von (Glyko)Sphingolipiden im Lysosom kommt es nur dann, wenn die Geschwindigkeit des Einstroms von Substrat in das Lysosom höher ist, als die Geschwindigkeit des Abbaus (V_{max}) durch das betreffende Enzym (Conzelmann und Sandhoff, 1983).

Das Merkmal all dieser Speicherkrankheiten ist eine massive Akkumulation von GM2 und verwandter Glykolipide in neuronalen Lysosomen (Sandhoff und Quintern, 1988), wodurch es zu einer fortschreitenden Neurodegeneration kommt. Der Schweregrad der Krankheit wird im Wesentlichen von der Restaktivität des betroffenen Enzyms bestimmt (Leinekugel et al., 1992). In den juvenilen und adulten Formen der Sphingolipidosen ist soviel Rest-Enzymaktivität vorhanden, dass die Speicherung von Sphingolipiden in den Lysosomen sehr langsam vor sich geht. Dieses Modell erklärt auch, warum sich die lysosomale Speicherung von Sphingolipiden nur in solchen Organen der Patienten nachweisen lässt, in denen das jeweilige Sphingolipid besonders stark exprimiert oder abgebaut wird.

Niedrige Restaktivitäten führen zu tödlichen Krankheitsverläufen im frühen Kindesalter. Abhängig von dem Defekt und seinen Auswirkungen können auch andere Gewebe betroffen sein (Übersichtsartikel: Gravel et al., 1995, von Figura et al., 1984). So gelang es z.B. bei einem Tiermodell für die Tay-Sachs Krankheit mit Hilfe von Knochenmarkzellen, bei denen durch retrovirale Vektoren die α -Untereinheit der HexA eingefügt worden war, die GM2-Speicherung aufzuheben (Martino et al., 2002).

Man kennt heute fast für jeden lysosomalen Abbauschritt eine erblich bedingte Speicherkrankheit. Für einige Krankheiten sind die defekten Gene identifiziert und kloniert worden, so dass Maus Modelle, die diesen verschiedenen Krankheiten entsprechen, zur Verfügung stehen (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1998). Die im Vergleich zu anderen Stoffwechselwegen auffällige Häufung von erblich bedingten Erkrankungen ist wahrscheinlich in dem streng sequentiellen Abbau der Glykosphingolipide und dem Fehlen

von alternativen Stoffwechselwegen begründet (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 1999).

Obwohl der genetische und biochemische Defekt für die meisten der ca. 40 bekannten lysosomalen Speicherkrankheiten bekannt ist, ist in den meisten Fällen der Zusammenhang zwischen der Lipidspeicherung und der zellulären Dysfunktion nicht vollständig aufgeklärt (Sillence und Platt, 2003). Im Falle der GM1- und GM2-Gangliosidosen wurden im Mausmodell eine Beeinflussung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, sowie eine Entzündung des zentralen Nervensystems, nachgewiesen (Jeyakumar et al., 2003).

Es gibt bereits experimentelle Ansätze einer „*substrate deprivation therapy*“ (Lui et al., 1999, Platt und Butters, 2004, Vunnam und Radin, 1980) mit dem Ziel, durch Inhibitoren der Glykosphingolipid-Biosynthese, wie z.B. *N*-Butyldesoxynojirimycin (NBDNJ) 4,*D*-*threo*-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinyl-propan-1-ol (*D*-*threo* PDMP), oder das im Arbeitskreis *Giannis* hergestellte 1-Methylsulfanyldihydroceramid (MSDH-Cer) (Sandhoff et al., 1992) eine Verbesserung der Krankheitssymptome von Sphingolipidose-Patienten mit nennenswerter Rest Enzymaktivität zu erreichen (Doering et al., 1999b).

Eine wirkungsvolle Therapie ist bisher nur für die adulten Verlaufsformen der Gauscher'schen Erkrankung und die Fabry'sche Erkrankung gefunden worden. Hier kann, in Fällen bei denen das zentrale Nervensystem noch nicht betroffen ist, im Zuge der „Enzymersatztherapie“, durch intravenöse Gabe des rekombinant hergestellten Enzyms die Abbaureaktion in den Lysosomen erhöht werden (Brady, 2003, Neufeld, 2004).

Im Mausmodell gelang 2006 durch Enzymersatztherapie die Kompensation der Sandhoffkrankheit (Cachon-Gonzalez et al., 2006). Ca. 20 Wochen alte β -Hexosaminidase defiziente Mäuse, welche deutliche Symptome der Sandhoffkrankheit zeigten, wurden mit viralen rekombinanten Adenovektoren, welche das β -Hexosaminidase-Gen enthielten, behandelt. Das Enzym wurde in den Mäusen in großer Menge gebildet, die typische Entzündung der Nerven wurde reduziert und die Mäuse überlebten länger als ein Jahr.

2.1.3 Abbauende lysosomale Enzyme und Sphingolipidaktivatorproteine am Beispiel der HexA und des GM2APs

Die HexA katalysiert den lysosomalen Abbau des Gangliosides GM2 zum GM3, wobei GM2AP als Hilfsprotein benötigt wird (Meier et al., 1991). Die humane HexA spaltet von einer großen Zahl von Glykokonjugaten am terminalen Zuckerrest die β -glykosidisch gebundenen *N*-Acetylglucosamine und *N*-Acetylgalaktosamine ab. Bei diesen Glykokonjugaten handelt es sich um Glykoproteine, Oligosaccharide und GSL wie z.B. GM2,

dessen Asialo-Derivat GA2 und Globosid (Sandhoff und Christomanou, 1979). Es wurden drei verschiedene Isoenzyme der Hexosaminidasen identifiziert, welche aus verschiedenen Kombinationen von zwei nicht kovalent verbundenen, strukturell verwandten Untereinheiten, α und β bestehen (Geiger et al., 1977, Liessem et al., 1995, Mahuran und Lowden, 1980, Sandhoff et al., 1971). Die α -Untereinheit ($M_r = \sim 60.000$) besteht aus zwei, die β -Untereinheit ($M_r = \sim 63.000$) aus drei über Disulfidbrücken verknüpften Polypeptidketten. Das β -Homodimer wird als β -Hexosaminidase B, das α -Homodimer als β -Hexosaminidase S und das α , β -Heterodimer als β -Hexosaminidase A bezeichnet. Trotz der funktionalen Ähnlichkeit der Untereinheiten haben die drei Isoenzyme verschiedene Substratspezifitäten. Während die α -Untereinheit auch negativ geladene Oligosaccharide spaltet, zeigt die β -Untereinheit eine höhere Hydrolyseaktivität gegenüber ungeladenen Substraten (Kytzia und Sandhoff, 1985). Ausschließlich die HexA ist in der Lage, GM2 in der Gegenwart des GM2-Aktivatorproteins (GM2AP) in größeren Mengen abzubauen (Sandhoff, 1977). Der labilen β -Hexosaminidase S wurde lange Zeit keine Bedeutung zugeschrieben. Erst in den letzten Jahren wurden mögliche physiologische Substrate der β -Hexosaminidase S zugeordnet, z.B. das sulfatierte GSL SM2 oder amphiphile Glykokonjugate wie auch das Gangliosid GM2 (Hepbildikler et al., 2002).

Mutationen und Defekte in den Genen der beiden Untereinheiten oder des GM2AP führen zu verschiedenen Formen der GM2-Gangliosidose. Die Variante B, deren infantile Form als Tay-Sachs-Krankheit bezeichnet wird, beruht auf einem Defekt der α -Untereinheit, die Variante O, auch Sandhoff-Krankheit genannt, auf einem Defekt der β -Untereinheit. Bei der Variante AB liegt ein Ausfall des GM2-Aktivatorproteins vor (Übersichtsartikel: Gravel et al., 1995).

Der Aktivator bindet an das Glykosphingolipid in einem 1:1-Komplex und ermöglicht der wasserlöslichen Exohydrolase die Abspaltung des Zuckers (Conzelmann und Sandhoff, 1979). Ob er dabei das Glykosphingolipid nur anhebt, also als „Liftase“ wirkt, oder aus der Membran löst, ist Teil der aktuellen Forschung. Nach Abspaltung des Zuckerrestes dissoziiert der Komplex wieder aufgrund der geringeren Affinität zum gebildeten Produkt GM3 (Abb. 5). Neben dem Gangliosid GM2 könnten andere sulfatierte und sialylierte GSL der HexA als Substrate dienen (Hepbildikler et al., 2002, Hepbildikler et al., 2003).

Es sind fünf verschiedene Mutationen bekannt, welche zur autosomal rezessiv vererbten Defizienz des GM2APs führen. Bei der AB-Variante (Conzelmann und Sandhoff, 1978, Fürst und Sandhoff, 1992) führt die massive neuronale Speicherung von GM2 und GA2 vor Erreichen des vierten Lebensjahres zum Tod.

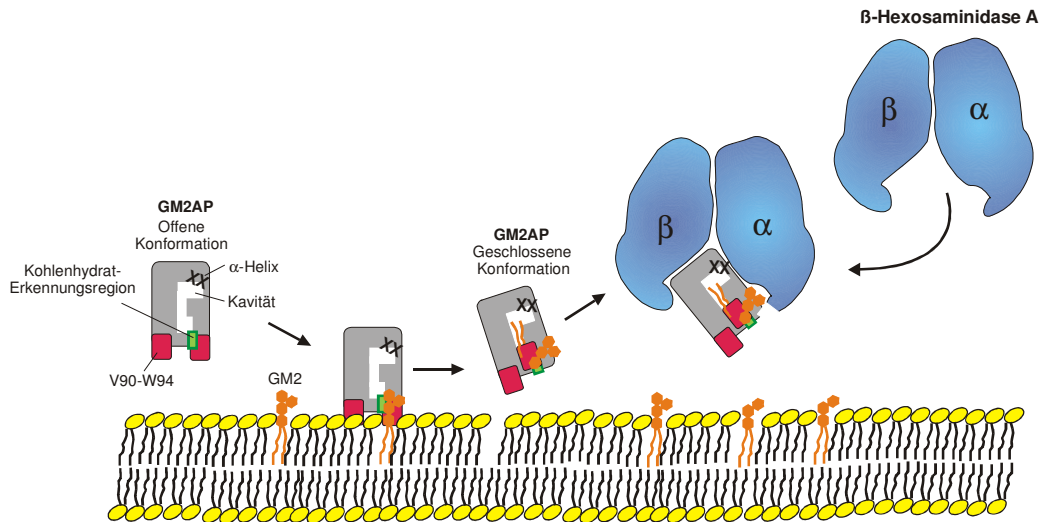


Abbildung 5: Model für den GM2-Abbau durch die β -Hexosaminidase A

Das GM2 wird durch das GM2AP soweit aus der Membran gehoben, dass ein sterisch ungehinderter Angriff der HexA am Zuckerrest möglich wird. Denkbar ist auch die vollständige Herauslösung aus der Membran. (modifiziert nach Fürst und Sandhoff, 1992).

2.1.4 Das GM2-Aktivatorprotein

Das GM2AP wird auf Chromosom 5 codiert und besteht aus 162 Aminosäuren. Durch die cDNA wird ein Präproprotein aus 193 Aminosäuren kodiert (Klima et al., 1993, Klima et al., 1991) (Abb. 6). Nach Erreichen des Endoplasmatischen Retikulums wird von diesem die Translokationssequenz bei H24 abgetrennt (Glombitza et al., 1997). Ins Lysosom gelangt das GM2AP über den Sortilin-Rezeptor (Lefrancois et al., 2003). Dort erfolgt die Abspaltung der Prosequenz, wodurch das reife Protein entsteht. Hier liegt bei 20% der N-Terminus bei S32, bei 80% bei F34 ((Fürst et al., 1990), Abb. 6). Die vier Disulfidbrücken konnten über MALDI-TOF Massenspektroskopie lokalisiert werden (Schütte et al., 1998).

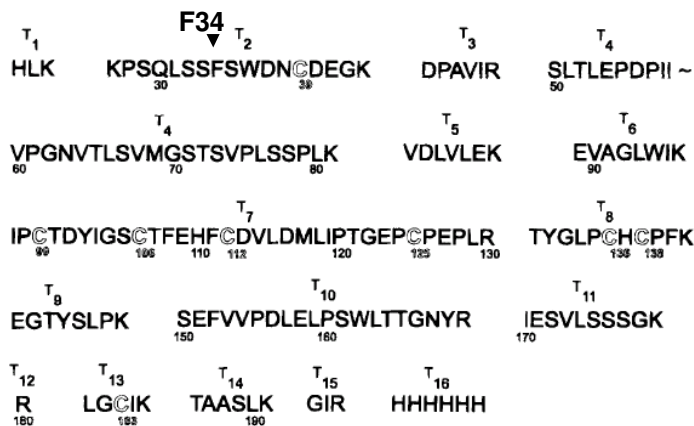


Abbildung 6: Aminosäuresequenz des GM2APs (Fürst et al., 1990)

Im Lysosom erfolgt die Abspaltung der Prosequenz, so dass das reife GM2AP bei F34 beginnt (Fürst et al., 1990).

In der Kristallstruktur des unglykosylierten, rekombinanten GM2APs aus *E.coli* (Wright et al., 2000) umgibt ein achtsträngiges β -Faltblatt eine zentrale Kavität (β -Cup). Dieser Hohlraum erscheint ausreichend groß, um Acylketten von 18 Kohlenstoffatomen, wie z.B. den Ceramidanker des GM2s, aufzunehmen. Zudem wurden einige Oberflächenloops und eine α -Helix (F111-I119) nachgewiesen. Der Loop V153-L163 kontrolliert offenbar den Zugang zu der zentralen Kavität: In einem der drei Monomere der kristallographischen asymmetrischen Einheit ist besagter Loop nach innen gefaltet und zeigt eine geschlossene Konformation, während die anderen beiden Monomere offene Konformationen darstellen bei denen der Loop nach außen gefaltet ist und so der Eingang zum Hohlraum erweitert wird (Wright et al., 2003).

Bei Kristallen, welche in Anwesenheit von GM2 gewonnen wurden, trat im Inneren der Kavität Elektronendichte auf. Diese wurde auf den Ceramidanker des GM2s zurückgeführt und ließ auf eine Positionierung des Ceramidankers an der Wand der Proteinhöhle schließen. Durch *Molecular Modeling* wurde der Zuckerkopfgruppe des GM2s eine Lage in Nähe der α -Helix zugeschrieben.

Das stimulatorische Maximum des GM2APs bei pH 4,2 für die Abbaureaktion (Bierfreund et al., 1999) deutet auf eine pH-induzierte Konformationsänderung hin. Somit wäre es möglich, dass die Strukturdaten des Proteins, welche in Lösungen bei pH 7,0, 7,5 und 5,5 gewonnen wurden, nicht die physiologische Konformation widerspiegeln.

Leider reicht die Strukturanalyse alleine nicht aus, um die Frage nach der Funktionsweise des GM2APs beim lysosomalen GM2-Abbau und den Einzelheiten dieser Reaktion an der Lipid-Wasser-Grenzfläche zu klären.

Das GM2AP wird als Liftase (Fürst und Sandhoff, 1992) beschrieben. Es bindet das Gangliosid GM2, löst es aus der Membran und präsentiert es in einem wasserlöslichen 1:1-Komplex der β -Hexosaminidase A (Übersichtsartikel: Conzelmann und Sandhoff, 1979, Conzelmann et al., 1982b). Aufgrund der oben beschriebenen Strukturaufklärung (Wright et al., 2000) und der Markierung des GM2AP mit Photoaffinitätsliganden (Wendeler et al., 2004) gibt es eine Theorie für den Ablauf der einzelnen Schritte.

Man geht davon aus, dass die offene Form des Aktivators über hydrophobe Loops, bevorzugt an Stellen mit negativer Ladung, in die Membran inseriert. Anschließend wird der Kohlenhydratanteil des Substrates über die Kohlenhydraterkennungsstelle gebunden, wobei der Ceramidteil in der hydrophoben Tasche fixiert wird. Beim Herauslösen des GM2s aus der Membran geht das Aktivatorprotein in die geschlossene, hydrophilere Form über. Der so

gebildete 1:1-Komplex ist das eigentliche Substrat der β -Hexosaminidase A (Meier et al., 1991, Wendeler et al., 2006, Zarghooni et al., 2004).

Das GA2 ist ein weiteres physiologisches Substrat des GM2APs (Bierfreund et al., 1999). Liegt ein erblicher Defekt des GM2APs vor (AB-Variante der GM2-Gangliosidose), so werden beide Ganglioside, GM2 und GA2, gespeichert (Conzelmann und Sandhoff, 1978).

Zusammen mit Sap-B ist das GM2AP auch am Abbau des Gangliosids GM1 durch β -GM1-Galaktosidase beteiligt. *In vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* können sich beide Aktivatorproteine bei diesem Abbauschritt gegenseitig ersetzen (Wilkening et al., 2000).

Neben den Gangliosiden GM1 und GM2 (Conzelmann et al., 1982, Übersichtsartikel: Conzelmann und Sandhoff, 1979), kann das GM2-Aktivatorprotein auch GM3, GD1a oder GA2 in 1:1-Komplexe binden und transferieren (Conzelmann et al., 1982). Seine Membranaktivität hängt entscheidend von Lateraldruck (<25 mN/m, Filmwaagemessung; (Giehl et al., 1999), starker Krümmung der Membran (Kolter und Sandhoff, 1998), der Anwesenheit anionischer Lipide (Werth et al., 2001) - vor allem des lysosomenspezifischen BMPs - und vom pH-Wert (Optimum bei 4,2, Bierfreund et al., 1999) ab.

2.2 Fusion von Membranen

Die Fusion von Membranen ist eine biophysikalische Reaktion, die nicht spontan von statten geht, sondern unterschiedliche Faktoren benötigt. Sie ist für verschiedene Vorgänge von fundamentaler Bedeutung. Hierzu zählen Befruchtung, Virusinfektion, Exocytose, intrazellulärer Membranfluss (Düzgünes und Bronner, 1988) und die Freisetzung von Neurotransmittern.

So unterschiedlich wie die unterstützten Vorgänge sind auch die auslösenden Faktoren. Zunächst kann Membranfusion durch verschiedene Proteine wie Hemagglutinin (Influenza, Abb. 7), gp 120 (HIV) und SNAREs (Abb. 8) ausgelöst werden. Des Weiteren spielt *in vivo* die Ca^{2+} gesteuerte Fusion eine entscheidende Rolle (Ellens et al., 1985). *In vitro* kann Vesikelfusion zudem noch über UV-Laser und Variation der Membranzusammensetzung ausgelöst werden.

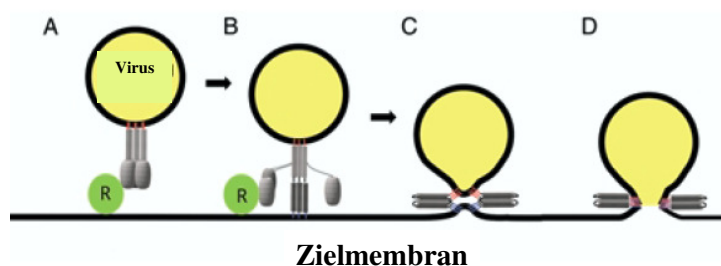


Abbildung 7: Durch Virus ausgelöste Membranfusion (nach (Fasshauer et al., 2001).

A) Hemagglutinin bindet bei neutralem pH an Rezeptor (R) in der Zielmembran. B) Nach der Endozytose bewirkt die pH-Änderung strukturelle Umlagerungen während denen die Rezeptorbindungsdomäne von der Fusionsdomäne entfernt wird. C)-D) Durch weitere Konformationsänderung werden das Fusionspeptid in der Zielmembran und die Transmembrandomäne der viralen Membran zusammengebracht und beide Membranen verschmelzen.

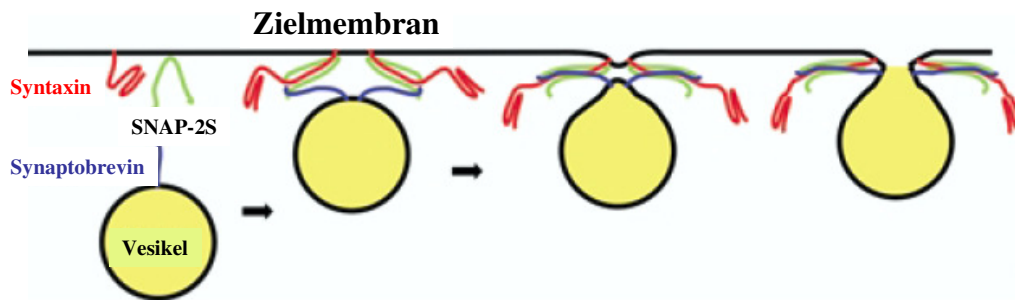


Abbildung 8: Model der durch SNAREs vermittelten Membranfusion (nach (Fasshauer et al., 2001).

Die SNARE-Proteine der beiden Membranen formen einen Komplex zwischen Vesikel und Zielmembran.

Weitere Zusammenlagerung der helikalen SNARE-Komplexe führt dann zur Membranfusion.

2.3 Liposomen als Model

Beim Abbau von Glucosylceramid mit Hilfe der Glucocerebrosidase konnte gezeigt werden, dass *in vitro* zum Erreichen der vollen Enzymaktivität negativ geladene Detergenzien oder Phospholipide benötigt werden (Ho und Light, 1973, Morimoto et al., 1990, Sarmientos et al., 1986, Vaccaro et al., 1997). Negativ geladene Phospholipide wie Dolicholphosphat (DoP) oder BMP, welche Membrankomponenten der späten Endosomen und Lysosomen sind, stimulieren den Abbau von Glucosylceramid durch die Glucocerebrosidase und Sap-C in einem detergentenfreien, liposomalen System bis zum 35-fachen (Wilkening et al., 1998).

Den Hauptbestandteil der Zellmembranen stellen Phospholipide dar. Sie sind in wässriger Lösung unlöslich, lassen sich aber durch Ultraschallung oder Extrusion als Liposomen suspendieren. Die Membranstruktur hängt stark von der Art der verwendeten Phospholipide ab. Einfluss nehmen hierbei Art und Länge der Fettsäure, einfache oder zweifache Veresterung des Glycerins oder auch die unterschiedlichen hydrophilen Phosphorsäureester-Kopfgruppen.

BMP ist ein anionisches Phospholipid, welches speziell in intravesikulären Strukturen von späten Endosomen (Kobayashi et al., 2002, Kobayashi et al., 1998) und Lysosomen (Bleistein et al., 1980, Möbius et al., 2003, Stremmel und Debuch, 1976, Wherrett und Huterer, 1972) auftritt. Es wurde erstmalig 1967 beschrieben (Body und Gray, 1967). In natürlichem BMP findet man statt einer sn-3- eine sn-1-Konfiguration am Glycerol-Phosphat-Ester (Abb. 3).

Diese untypische Konfiguration wird wahrscheinlich bei der Biosynthese erzeugt, die jedoch noch nicht aufgeklärt ist. Man geht davon aus, dass BMP als Zwischenprodukt beim lysosomalen Abbau von Phosphatidylglycerol und Cardiolipin entsteht (Amidon et al., 1996). Eine mögliche Erklärung für den Einfluss des BMPs auf die Enzymaktivität der abbauenden Enzyme wäre, dass BMP auch bei dem in den Lysosomen vorliegendem niedrigen pH-Wert den intralysosomalen Vesikeln eine negative Mehrfachladung verleiht, so dass die positiv geladenen Enzyme und Aktivatorproteine anbinden können. Zudem reduziert BMP den Lateraldruck von Membranen und erleichtert es so z.B. dem GM2AP in die Membranen zu inserieren. Physikochemische Messungen mit Lipid-Monoschichten zeigten die membranaktiven Fähigkeiten des GM2AP. Der Aktivator kann in Membranen aus Dimyristoylphosphatidylcholin und Dimyristoylphosphatidylglycerol (1:1 mol/mol bzw. 6:1 mol/mol) bis zu einem Lateraldruck von 25 mN/m inserieren. In einem Gemisch aus Dimyristoylphosphatidylcholin und GM2 (6:1 mol/mol) wird nur ein Druck von 15 mN/m erreicht. Auch wenn angenommen wird, dass der Lateraldruck von biologischen Membranen deutlich höher ist (40 mN/m) (Giehl et al., 1999) ist zugleich denkbar, dass in intralysosomalen und intraendosomalen Vesikeln unter anderem auf Grund des hohen Gehaltes an BMP mit Eigenschaften eines Lysolipides und der höheren Oberflächenkrümmung ein Lateraldruck von weniger als 25 mN/m auftritt.

2.4 Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Membranfusion

2.4.1. Lipidmixing-Assays zur Untersuchung von Vesikelfusion

Ein häufig verwendeter Lipidmixing-Assay ist der NBD-Rhodamin Resonance Energie Transfer Assay (Abb. 9). Dieser Assay basiert auf zwei Liposomentypen, von welchen einer nur aus unmarkierten Lipiden besteht. Der zweite Liposomentyp beinhaltet in der Membran NBD-markierte Lipide und Rhodamin-markierte Lipide. Die Fluoreszenz der NBD-Gruppe wird durch das Rhodamin gequench, solange beide Gruppen sich nahe genug beieinander befinden. Wird die Vesikeloberfläche durch Fusion vergrößert, so nimmt der Abstand der beiden Substanzen zueinander zu. Die Fluoreszenz der NBD-Gruppe wird mit wachsendem Abstand immer unvollständiger durch die Rhodamin-Gruppe adsorbiert und wird somit messbar ((Struck et al., 1981), für nähere Informationen zum Resonanz Energie Transfer siehe 2.5.1))

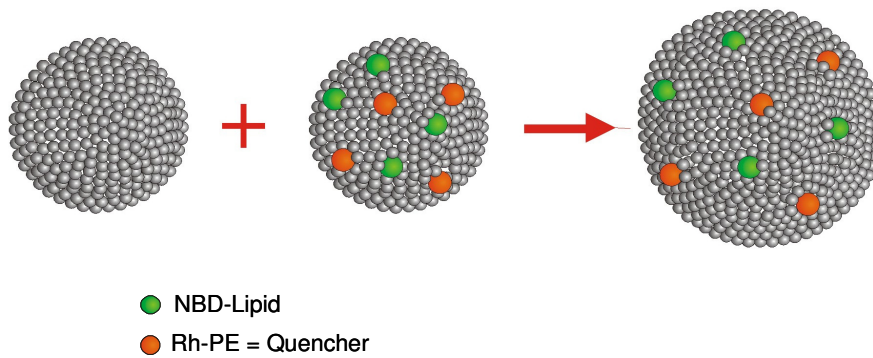


Abbildung 9: Lipidmixing-Assay am Beispiel von Rhodamin- und NBD-markierten Lipiden (Modifiziert nach Struck et al., 1981)

Liegen das NDB-markierte Lipid und der Quencher in einem Liposom nahe beieinander, so wird die Fluoreszenz der NBD-Gruppe absorbiert. Es kann keine NBD-Fluoreszenz detektiert werden. Kommt es zur Vesikelfusion, so rücken in der vergrößerten Membranoberfläche NBD-Gruppe und Quencher weiter auseinander. Es tritt ein Dequench durch Verdünnung auf und die NBD-Fluoreszenz wird messbar.

2.4.2 Contentmixing-Assay zur Untersuchung von Vesikelfusion

Die Contentmixing-Assays basieren auf zwei Liposomensorten, welche jeweils mit einer unterschiedlichen Substanz gefüllt sind. z.B. eine Vesikelsorte mit ANTS, einer fluoreszierenden Substanz und die zweite Vesikelsorte mit DPX, einer Substanz, die die ausgesendete Fluoreszenz von ANTS quenchen kann (Abb. 10). Bleiben beide Vesikel getrennt, so ist die volle Fluoreszenz von ANTS detektierbar. Kommt es durch Vesikelfusion zur Vermischung beider Substanzen, wird die ANTS-Fluoreszenz vom DPX absorbiert und die messbare Fluoreszenz sinkt. Dieser Assay kann auch bei niedrigem pH durchgeführt werden. Jedoch werden hier hohe Konzentrationen benötigt und es tritt kein Quench auf, wenn der Farbstoff aus den Vesikeln austritt (Düzgünes, 2003).

Ein weiterer häufig verwendeter Assay ist der Terbium–Dipicolinsäure Assay (Düzgünes, 2003). Dieser basiert auf dem gleichen Prinzip wie der ANTS-DPX-Assay, jedoch wird hier durch die Vermischung beider Substanzen bei Fusion ein fluoreszenter Komplex gebildet und dessen Fluoreszenz detektiert. Dieser Assay ist allerdings nicht für Untersuchungen im sauren Milieu geeignet.

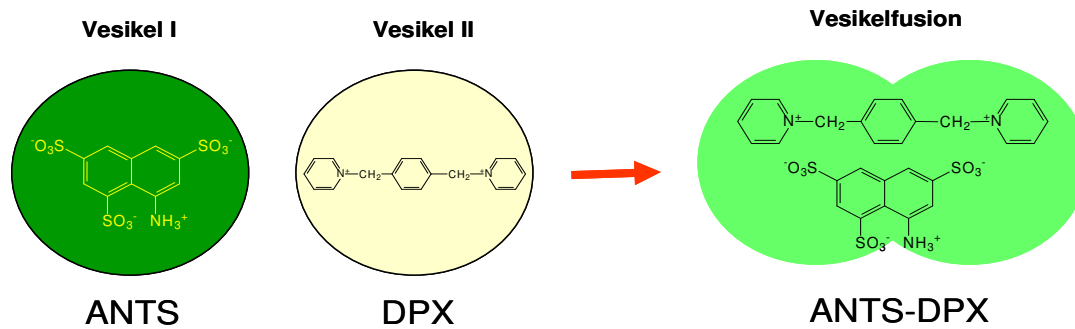


Abbildung 10: Contentmixing-Assay am Beispiel ANTS – DPX

Liegen beide Substanzen in getrennten Vesikeln vor, so kann hohe Fluoreszenz gemessen werden. Tritt Fusion auf, so mischen sich die beiden Substanzen und die Fluoreszenz sinkt stark ab.

2.4.3 Dynamische Lichtstreuung

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

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

Werden mehrere Teilchen mit monochromatischem, kohärentem Licht bestrahlt, so interferiert ihr Streulicht und die detektierte Intensität hängt neben der Anzahl und Größe der Teilchen von ihrer relativen Position ab.

In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um die Größe von Liposomen, und die Veränderung der Liposomen nach der Zugabe des GM2APs zu charakterisieren.

2.5 Biophysikalische Methoden zur Untersuchung von Lipidtransfer und Membraninteraktion

2.5.1 FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) zur Untersuchung von Lipidtransfer

Beim Förster-Resonanzenergietransfer, oft als Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer bezeichnet, handelt sich um einen physikalischen Prozess der Energieübertragung. Die Energie eines angeregten Farbstoffes (Donor) wird hierbei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen zweiten Farbstoff (Akzeptor) übertragen. Die auf den Akzeptorfarbstoff übertragene Energie kann von diesem, z.B. in Form von Strahlung, wieder abgegeben werden. Dem Donorfarbstoff hingegen steht die transferierte Energie nicht mehr für eine direkte Strahlungsabgabe zur Verfügung.

Die Voraussetzung für den oben beschriebenen Energietransfer ist, dass die zu transferierende Energiemenge, welche der Energiedifferenz aus angeregtem Zustand und Grundzustand entspricht, im Bereich der möglichen Energieaufnahme des Akzeptorfarbstoffes liegt. Hierzu müssen das Emissionsspektrum des Donorfarbstoffes und das Absorptionsspektrum des Akzeptorfarbstoffes überlappen ((Wu und Brand, 1994), Abb. 11).

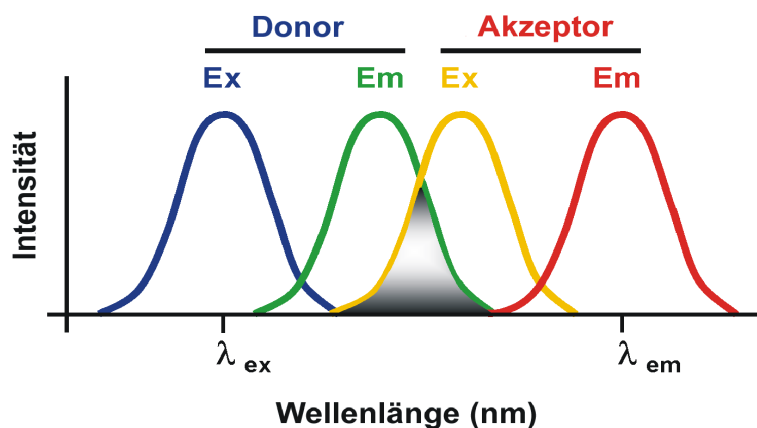


Abbildung 11: Voraussetzung für FRET

Überlappung der Spektren von Donoremission und Akzeptorabsorption

Im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden, erlaubt die Messung von FRET eine Beobachtung von Protein-Lipid-Interaktionen in Echtzeit (Schwarzmann et al., 2005). Auf diesen Grundlagen basieren der von unserer Abteilung genutzte FRET-Transfer-Assay (vgl. 2.6.1) und der Fusions-Assay über magnetische Separation (vgl. 2.6.3).

2.5.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie zur Untersuchung von Membraninteraktion

Diese Methode kann zur Untersuchung der Wechselwirkungen von membranaktiven Proteinen mit Membranen in Echtzeit genutzt werden (Schuck, 1997) und bietet die Vorteile, nur kleinste Mengen zu verbrauchen, unabhängig von der chemischen Natur der Substanzen zu sein und keine Modifikationen, z.B. Label, einführen zu müssen (für eine Beschreibung der Methode und Technologie s. (Salamon et al., 1999, Salamon et al., 1997) und die Homepage des Geräteherstellers (<http://www.biacore.com>)).

Sie basiert auf einem optischen Phänomen, bei dem elektromagnetische Vektoren des einfallenden Lichtes mit den freien Elektronenzuständen, den so genannten Oberflächenplasmonen, von dünnen, elektrisch leitenden Filmen wechselwirken. Dieses wurde erstmals von Wood beobachtet (Wood, 1912), und die theoretischen Grundlagen wurden 1957 aufgestellt (Ritchie, 1957). Zwei Jahre später wurden die Überlegungen experimentell bestätigt (Powell und Swan, 1959) und 1960 der Name Oberflächenplasmon eingeführt (Stern und Farell, 1960).

Beim Übergang in ein optisch weniger dichtes Medium wird das einfallende Licht gebrochen (Abb. 12 A). Ab einem bestimmten Winkel θ_c kommt es jedoch zur Reflektion des Lichtes (Abb. 12 B), welche als „Totale interne Reflexion“ bezeichnet wird (Hirschfeld, 1967). Während dessen dringt das elektrische Feld der Photonen ca. $\frac{1}{4}$ der Wellenlänge λ über die reflektierende Oberfläche hinaus (evaneszierende Welle) in einen dünnen elektrischen Leiter ein, der auf der Oberfläche aufgebracht ist (meist Gold). Hierbei tritt das elektrische Feld der Photonen mit den Plasmonen der Goldoberfläche in Wechselwirkung.

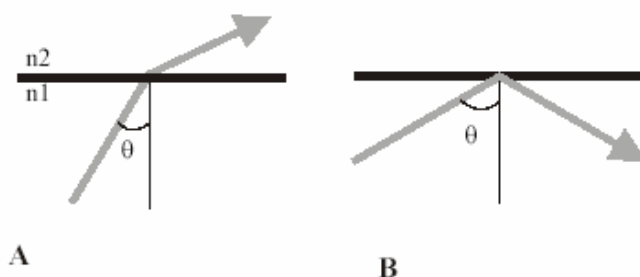


Abbildung 12: Lichtbrechung und „Totale interne Reflexion“

Übertritt von Licht in ein optisch weniger dichtes Medium: A) Lichtbrechung; B) Totale interne Reflexion
 n = Brechungsindex des entsprechenden Mediums, es gilt $n_1 > n_2$.

Beschreibt man Photon und Plasmon als Welle, so lassen sich diese mathematisch in zwei Vektoren zerlegen, einen senkrecht und einen parallel zur Oberfläche. Interessant ist in

diesem Fall der parallele Vektor, da das Plasmon auf die Oberfläche begrenzt ist. Wird der Winkel des einfallenden Lichtes variiert, so erhält man unterschiedliche Größen der beiden Vektoren. Bei einem bestimmten Winkel stimmt der Vektor des einfallenden Photons mit dem Vektor des Plasmons überein und es kommt zur Resonanz, d.h. das Photon wird absorbiert und das Licht nicht länger reflektiert (Abb. 13).

Das Plasmon selbst besitzt ebenfalls ein elektrisches Feld, welches 200 nm aus dem Goldfilm heraus reicht. Dieses wird vom Brechungsindex des durchdrungenen Mediums beeinflusst, was den Vektor des Plasmons und damit auch den Winkel der Resonanz verändert. Der Brechungswinkel wiederum ist abhängig von der Konzentration des Stoffes / Mediums. Somit lässt sich durch die Messung des Resonanzwinkels die Stoffmenge in der Nähe der Oberfläche bestimmen. Die Gerätesoftware übersetzt den Winkel in eine Größe (Response Units, RU), die proportional zur Stoffmenge steht. Bei dem in diesem Fall verwendeten Gerät der Firma BIACORE® entspricht eine Response Units (RU) etwa 1 pg Protein/mm² (Jönsson et al., 1991) bzw. 0,9 pg Lipid/mm² (Cooper et al., 1998).

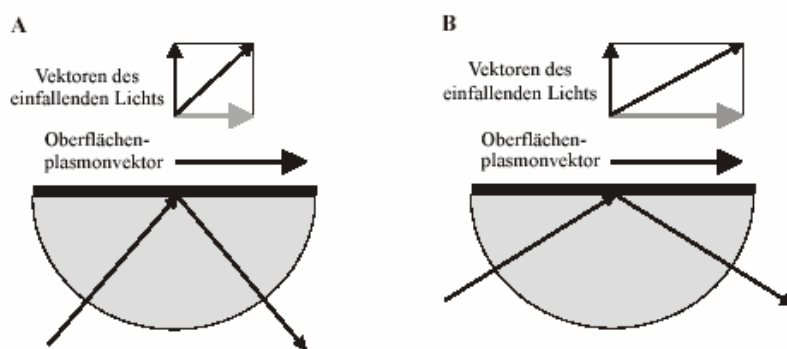


Abbildung 13: Das Phänomen der Resonanz

Der Obere Teil der Abbildungen zeigt das Licht in seine Vektoren zerlegt. Darunter ist der relevante Vektor des Plasmons dargestellt. Dieser tritt mit dem parallelen Vektor des Lichtes (hellgrau) in Wechselwirkung. A) Der zur Oberfläche parallele Vektor des Lichtes stimmt nicht mit der Größe des Plasmonvektors überein, daher kommt es nicht zur Resonanz und das Licht wird komplett reflektiert. B) Sind die Vektoren des Lichtes und des Plasmons identisch, so tritt Resonanz auf. Ein Teil des Lichtes wird absorbiert, der kleinere Teil reflektiert.

Die Messdaten erlauben Analyse von Spezifität, Affinität und kinetischen Parametern der zu untersuchenden Protein-Lipid-Wechselwirkungen. Die Sensorchips des von uns eingesetzten Biacore-Systems bestehen aus Glasplättchen mit einer dünnen Goldschicht, welche funktionelle Gruppen zur Anbindung von Liganden trägt.

Für die Untersuchung membrangebundener Prozesse wurden Chips entwickelt, auf denen Membranen modelliert werden können. Zum einen können über die Insertion von Alkylketten (C8-C12) intakte Liposomen auf dem Chip reversibel gebunden werden (Sensor Chip L1,

Abb. 14), zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Chipoberfläche selbst eine Hälfte der Lipiddoppelschicht ersetzt, wodurch man planare Hybrid-Membranen erhält. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Verankerung planarer Doppelschichten über bewegliche „Abstandshalter“ (Cooper, 2004).

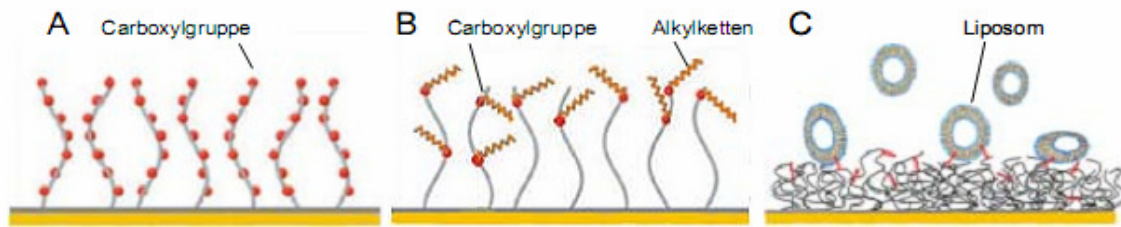


Abbildung 14: Biacore-Sensor-Chips. Auf der Goldoberfläche befindet sich gebundenes Dextran das mit Carboxylgruppen (Chip CM5, A) und Alkylketten (Chip L1, B, C) derivatisiert ist. Die Alkylketten inserieren reversibel in Doppelmembranen und immobilisieren auf diese Weise intakte Liposomen (C). (Abb. modifiziert nach www.biacore.com.)

2.6 In der Abteilung verwendete Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays

2.6.1 Transfer-Assay mittels FRET (Schwarzmann et al., 2005)

Im FRET-Transfer-Assay ist es möglich die Interaktion von Proteinen mit fluoreszenzmarkierten Lipiden in Echtzeit zu beobachten (Schwarzmann et al., 2005). Die Donorvesikel beinhalten hier das fluoreszenzmarkierte, zu transferierende Lipid. Die Fluoreszenz wird durch Rhodamin-PE gequencht. Im Falle des GM2AP wurde fluoreszenzmarkiertes 2-NBD-GM1 verwendet.

Die Akzeptorvesikel beinhalten keine markierenden Substanzen. Das Verhältnis Donorvesikel zu Akzeptorvesikeln ist 1:5. Die Donorvesikelkonzentration im Assayansatz betrug 20 nmol Lipid pro ml, die Akzeptorvesikelkonzentration 100 nmol Lipid pro ml. Das Assayvolumen betrug 320 μ l.

Der Transfer von 2-NBD-GM1 wurde durch Zugabe einer katalytischen Menge an GM2AP bei 28°C gestartet. Die Anregung der NBD-Gruppe erfolgte bei 480 nm, der Fluoreszenzanstieg wurde bei einer Wellenlänge von 522 nm gemessen (Schwarzmann et al., 2005).

Fluoreszenzzunahme wird als Transfer gewertet, eventuell auftretende Vesikelfusion ist nicht detektierbar.

Das speziell für diesen Assay synthetisierte 2-NBD-GM1 (Schwarzmann et al., 2005) besitzt im Gegensatz zu den sonst verwendeten NBD-Derivaten eine „low off rate“, welche aus der

Positionierung der NBD-Gruppe zwischen dem hydrophoben Lipidanker und der Zuckergruppe resultiert (Abb.15). Die bis dahin verwendeten NBD-Derivate trugen die NBD-Gruppe am Ende einer Fettsäure, was zu einer „high off rate“ führte, da die NBD-Gruppe hydrophil ist. Diese Derivate waren demnach nicht für Lipidtransferassays geeignet.

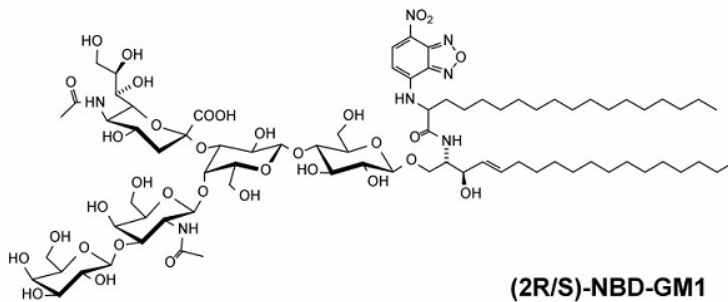


Abbildung 15: Chemische Struktur des fluoreszenten Gangliosides 2-NBD-GM1 (Schwarzmann et al., 2005). Anders als bei den üblichen NBD-Markierungen wurde die NBD-Gruppe hier in 2-Position der Acylkette eingefügt und somit zwischen Ceramidanker und Zuckerkopfgruppe positioniert. Dieses führt dazu, dass 2-NBD-GM1 wie endogenes, unmodifiziertes GM1 in der Membran verankert ist und eine „low off rate“ besitzt. Würde die NBD-Gruppe, wie oft üblich, am Ende der Fettsäure sitzen, so würde ihre Verankerung in der Membran durch Rückfaltung derart destabilisiert, dass das Gangliosid eine „high off rate“ bekommen würde (Schwarzmann et al., 2005).

2.6.2 Transfer-Assay mittels magnetischer Trennung (nach Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007)

Das zu transferierende Lipid ist radioaktiv markiert und befindet sich in den Donorvesikeln. Zudem beinhalten die Donorvesikel Biotin-PE, welches nach dem durchgeführten Assay zur Separation des Donorvesikels von den Akzeptorvesikeln dient (Abb. 16). Hierzu erfolgt die Abtrennung über Streptavidin-überzogene BioMag-Kügelchen in einem Magnetständer. Der Akzeptor bleibt im Überstand zurück (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007).

Der Akzeptor ist mit NBD-PE fluoreszenzmarkiert um ihn nach dem Versuch im Überstand nachweisen zu können. Das Verhältnis Donorvesikel zu Akzeptorvesikel ist 1:5. Die Donorvesikelkonzentration im Assayansatz betrug 20 nmol Lipid pro ml, die Akzeptorvesikelkonzentration 100 nmol Lipid pro ml.

Wird das radioaktiv markierte Lipid von einem LLBP vom Donorvesikel zum Akzeptorvesikel transferiert, so wird im Überstand zusätzlich zur Fluoreszenz auch Radioaktivität nachgewiesen. Ein Verlust von Fluoreszenz im Überstand wird als Vesikelfusion bzw. Vesikelaggregation gewertet (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007).

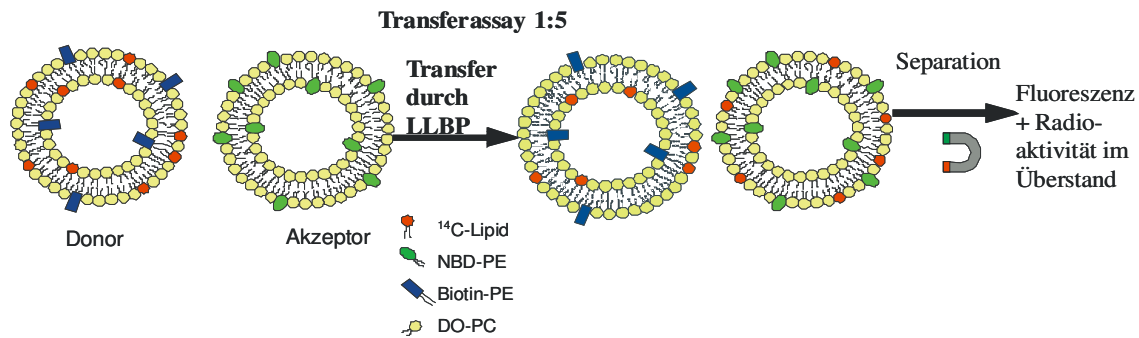


Abbildung 16: Aufbau des Transferassays mittels magnetischer Trennung

Die Donorvesikel beinhalten das zu transferierende, radioaktiv markierte Lipid und sind durch Biotin-PE über Streptavidin-überzogene BioMag-Kügelchen separierbar. Die Akzeptorvesikel sind fluoreszenzmarkiert und können nach der BioMag-Trennung im Überstand nachgewiesen werden können. Wird das radioaktiv markierte Lipid durch ein LLBP zum Akzeptorvesikel transferiert, so lässt sich dessen Radioaktivität zusammen mit der Fluoreszenz im Überstand nachweisen. Ein Verlust an Fluoreszenz im Überstand wird als Vesikelfusion gewertet, wobei Vesikelaggregation nicht ausgeschlossen werden konnte (Modifiziert nach: Abdul-Hammed M. 2010).

2.6.3 Fusions-Assay mittels magnetischer Trennung (nach Abdul-Hammed et al., 2010)

Der Fusions-Assay wird, im Gegensatz zum Transfer-Assay, im Verhältnis 1:1 der Vesikel (I) und Vesikel (II) durchgeführt. Die Vesikel (I) beinhalten Biotin-PE zur Separation über Streptavidin-überzogene BioMag-Kügelchen. Die Vesikel (II) sind über NBD-PE fluoreszenz- und über [¹⁴C]-PE radioaktiv-markiert. Tritt Vesikelfusion zwischen den Vesikeln (I) und (II) auf, so werden die fusionierten Vesikel zusammen mit den Biotin-PE-haltigen Vesikeln (I) aus der Lösung gezogen (Abb. 17). Nach der Separation wird im Überstand der Verlust der Fluoreszenz und der Verlust der Radioaktivität bestimmt und daraus die Vesikelfusion errechnet (Abdul-Hammed et al., 2010).

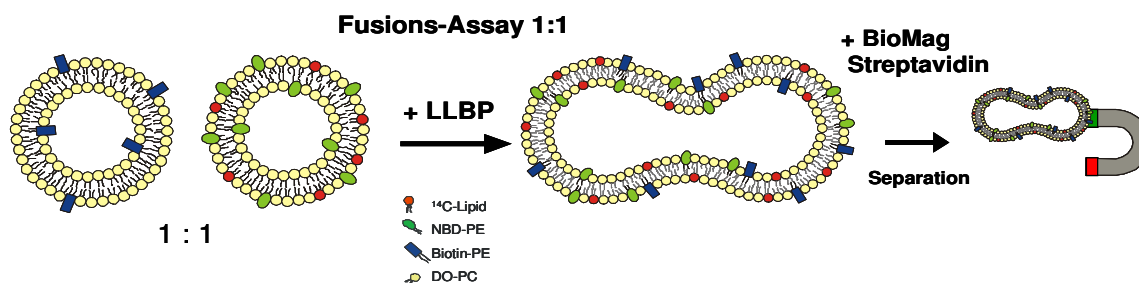


Abbildung 17: Aufbau des Fusions-Assays mittels magnetischer Separation

Im Fusions-Assay beinhaltet die eine Vesikelart (II) NBD-PE und radioaktiv markiertes [¹⁴C]-PE, die andere (I) Biotin-PE. Fusionieren die beiden Vesikelarten miteinander, so werden die fusionierten Vesikel zusammen mit den Biotin-PE markierten Vesikeln (I) durch Streptavidin-überzogene BioMag-Kügelchen aus der Lösung gezogen. Die Vesikelfusion wird über gleichzeitigen Verlust von Fluoreszenz und Radioaktivität im Überstand nachgewiesen (Modifiziert nach: Abdul-Hammed M. 2010).

2.7 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirkung verschiedener Membranlipide auf die Interaktion des GM2APs mit membrangebundenem GM2 bzw. GM1 zu untersuchen. Das GM2AP akzeptiert GM1 als einen dem GM2 gleichwertigen Bindungspartner (Conzelmann et al., 1982a). Hierbei sollte die Rolle des Aktivators beim lysosomalen Abbau genauer untersucht werden.

Zunächst wurde ein rekombinantes GM2AP-Präparat mit Hexahistidin-Rest in Insektenzellen exprimiert und im Vergleich mit einem GM2AP-Präparat aus menschlichem Nierengewebe bzgl. Homogenität und Aktivität charakterisiert.

Um die Wechselwirkung der beiden Präparate mit Membranen zu untersuchen, wurden zunächst SPR-Messungen durchgeführt. Hierbei wies das rGM2AP-His6 grundlegend andere Eigenschaften auf als GM2AP.

In unserer Abteilung wurden bisher drei verschiedene Assays zur Untersuchung von Lipidtransfer, bzw. Membranfusion eingesetzt. Im FRET-Transfer-Assay alleine war bisher keine klare Unterscheidung zwischen Fusion und Transfer möglich. Der Transfer-Assay, bzw. der Fusions-Assay mittels magnetischer Separation lieferten eine klare Aussage über den Lipidtransfer, bzw. die Vesikelfusion in getrennten Experimenten, jedoch nicht über beide Vorgänge gleichzeitig in einem Experiment.

Da der FRET-Transfer-Assay durch kontinuierliche Messung der Fluoreszenzfreisetzung eine Aussage über die Kinetik des Vorganges in Echtzeit macht und der Transfer-Assay in Kombination mit dem Fusions-Assay Aussagen über das Transferverhalten bzw. die fusogenen Eigenschaften zu einem Endpunkt liefert, wurden diese drei Assays im Rahmen der vorliegenden Arbeit versuchsweise in einem Assay kombiniert um alles Aussagen aus einem gemeinsamen experimentellen Ansatz zu erhalten. Dieser kombinierte Lipidtransfer-Membranfusions-Assay soll in Zukunft zur Untersuchung verschiedener Lysosomaler Lipid Bindungs Proteine eingesetzt werden.

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung und Charakterisierung des rGM2AP-His6 und des GM2APs

3.1.1 Expression und Charakterisierung des rGM2AP-His6

Das rGM2AP-His6 wurde im Baculo Expressionsvektor System (BEVS) exprimiert (Wendeler et al., 2003a). Die Proteinexpression erfolgte durch Infektion von *Sf9*-Zellen und *Sf21*-Zellen mit Baculoviren bei einem MOI-Wert (*Multiplicity of infection*) von 3. Vor Einsetzen der Zellyse (ca. 76 Stunden nach der Infektion) wurden die Überstände durch Zentrifugation gewonnen. Das exprimierte Protein wurde zunächst durch Kationenaustausch-Chromatographie an Poros-HS-Material konzentriert. Die Fraktionen, die den rGM2AP-His6 enthielten, wurden vereinigt und über eine Ni-NTA-Säule gereinigt (siehe 5.2.2.1). Die Identität und Homogenität der erhaltenen rGM2AP-His6-Fraktionen wurde durch SDS-PAGE, Immuno-Blot (Abb. 18 A) und MALDI-Massenspektrometrie (Abb. 19) überprüft. In der SDS-Page und im Immuno-Blot trat eine klare Band bei ca. 21 kDa auf. Wie die massenspektrometrische Untersuchung zeigte lag das Protein rein und in glykosylierter Form mit einer Masse von 20,527 kDa vor. Die Ausbeute betrug ca. 10 mg pro Liter.

Die Aktivität des erhaltenen rGM2AP-His6 wurde in einem liposomalen Aktivitätsassay (Abb. 18 B) durch Stimulation des HexA katalysierten Abbaus von [¹⁴C]-GM2 zu [¹⁴C]-GM3 getestet (siehe 5.2.2.2.7). Eine Aktivatoreinheit (1 AE) entsprach 3,8 µg Aktivatorprotein. 1 AE ist im Falle des GM2APs definiert als die Menge an Aktivatorprotein die unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 1 U HexA (siehe 5.2.2.2.6) eine Steigerung der Substratspaltung (GM2 zu GM3) um 1 nmol pro Stunde bewirkt (Conzelmann und Sandhoff, 1979)

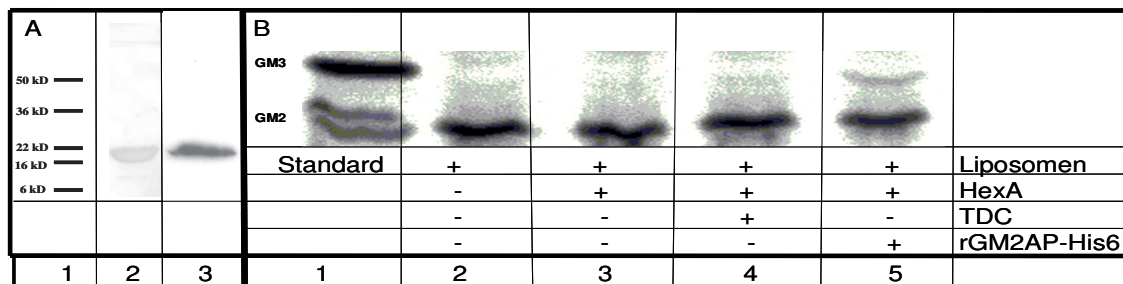


Abbildung 18: (A) SDS-Page und Immuno-Blot des im BEVS erzeugten rGM2AP-His6. Die Proteinauftrennung erfolgte in beiden Fällen in einem 12,5 %igem Tris-Glycin-SDS-Gel, die Detektion im Gel mittels Silberfärbung, die Detektion nach dem Blotvorgang mit einem GM2AP-spezifischen Antikörper. Spur 1:

Standard, Spur 2: SDS-PAGE, Detektion mittels Silberfärbung, Spur 3: Immuno-Blot. Sowohl in der Silberfärbung als auch im Immuno-Blot zeigte sich eine einzelne, scharfe rGM2AP-His6 Bande bei ca. 21 kDa.

(B) Aktivitätstest des rGM2AP-His6

Liposomenzusammensetzung: 10 mol% BMP, 10 mol% Cholesterol, 9 mol% GM2, 1 mol% [¹⁴C]-GM2, 70 mol% DOPC. Der Assay wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf HPTLC-Platte aufgetrennt.

Bahn 1: Standard, Bahn 2: Liposomen 25 mM, Bahn 3: Liposomen 25 mM+ 1U Hex A, Bahn 4: Liposomen 25 mM + 1U Hex A + TDC, Bahn 5: Liposomen 25 mM + 1U Hex A + 0,2 µg rGM2AP-His6 (194 nM). Unter Zugabe von HexA und rGM2AP-His6 (Bahn 5) trat eine deutliche GM3-Bande auf.

Die Identität und Homogenität des r-GM2AP-His6 mit Hexahistidin-Rest wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert (Abb. 19). Entsprechend seiner Aminosäuresequenz (vgl. Abb. 6), der zusätzlichen sechs Histidin-Reste und der Form der Glykosylierung, einer Paucimannose-Struktur GlcNAc₂(Fuc)Man₃ mit MW: 1057,4 Da. Bei der Expression des GM2APs im BEVS (Wendeler et al., 2003a), ergab sich für das glykosylierte rGM2AP-His6 eine theoretische Masse von 20540 Da.

MALDI-MS-Spektrum des rGM2AP-His6

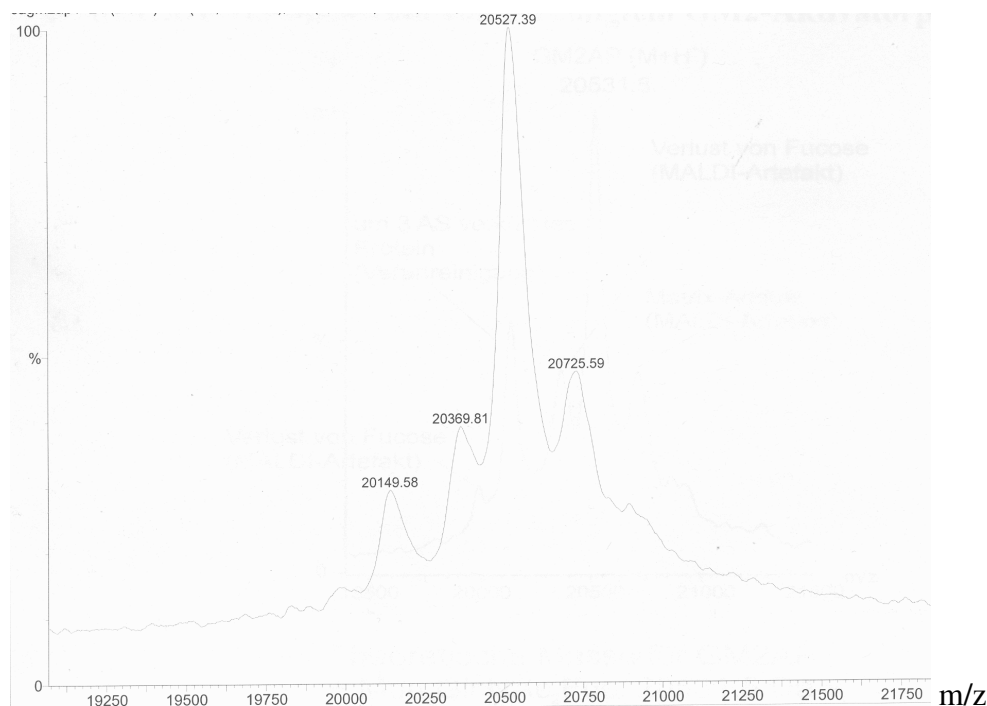


Abbildung 19 : MALDI-Massenspektrum des gereinigten rGM2AP-His6.

Die MALDI-Messung ergab einen Peak bei einer Masse von 20527,39 Da. Die rechnerisch ermittelte theoretische Masse des im BEVS glykosylierten rGM2AP-His6 liegt bei 20545,93 Da.

Bei dem zudem auftretenden Peak bei 20369,81 handelt es sich um das um eine Manoseeinheit verkürzte Protein.

3.1.2 Charakterisierung des GM2AP aus Gewebe

Das gereinigte GM2AP aus menschlichem Nierengewebe lag bereits im Labor vor (Hepbildikler, Diplomarbeit 1996). Seine Identität und Homogenität wurde, wie die des rGM2AP-His6, über SDS-PAGE, Immuno-Blot (Abb. 20 A) und MALDI-Massenspektrometrie (Abb. 21) überprüft. Sowohl in der SDS-Page, als auch im Immuno-Blot trat eine klare Bande bei ca. 18 kDa auf. Mittels MALDI-Massenspektrometrie wurde die Masse mit 18,097 kDa bestimmt. Zur Aktivitätsbestimmung wurde wiederum in einem liposomalen Assay der Abbau von [¹⁴C]-GM2 durch die Hex A stimuliert (Abb. 20 B). Danach konnte die Aktivität des Aktivators mit 1AE = 3 µg Aktivatorprotein bestimmt werden.

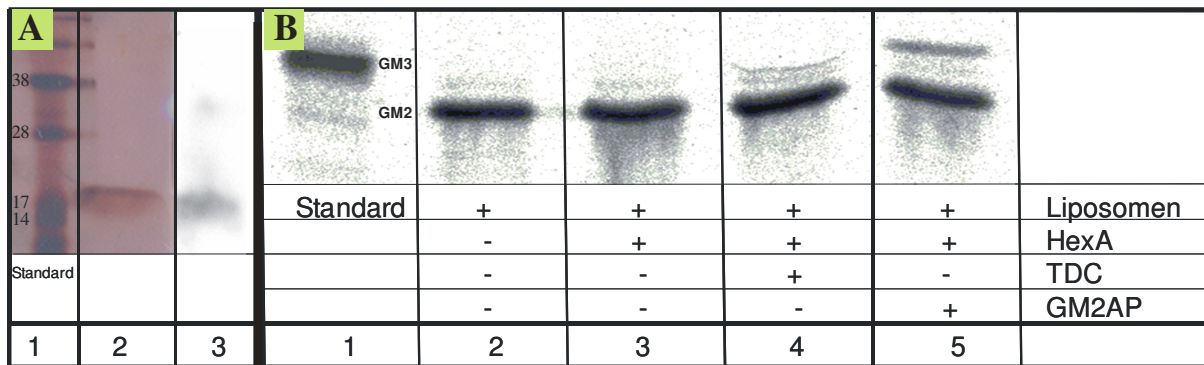


Abbildung 20: (A) SDS-PAGE und Immuno-Blot des aus Gewebe gewonnenen GM2APs.

Spur 1: Standards. Die Proteinauftrennung erfolgte in beiden Fällen in einem 12,5 %igem Tris-Glycin-SDS-Gel, die Detektion im Gel erfolgte mittels Silberfärbung (Spur 2), im Immuno-Blot mittels eines GM2AP-spezifischen Antikörpers (Spur 3). In beiden Fällen zeigt sich eine einzelne Bande auf Höhe von ca. 18 kDa.

(B) Aktivitätstest des GM2APs

Liposomenzusammensetzung: 10 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 9 mol% GM2, 1 mol% [¹⁴C]-GM2, 70 mol% DOPC. Der Assay wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend auf HPTLC-Platte aufgetrennt. Bahn 1: Standard, Bahn 2: Liposomen, Bahn 3: Liposomen+ Hex A, Bahn 4: Liposomen + Hex A + TDC, Bahn 5: Liposomen + Hex A + 0,2 µg GM2AP. Unter Zugabe von Hex A und GM2AP (Bahn 5) trat eine scharfe GM3-Bande auf.

Die Sequenz des reifen GM2APs aus menschlichem Gewebe beginnt nach Abspaltung der Signalsequenz im Lysosom zu 80% bei F34 ((Fürst et al., 1990), Abb.6), was eine Masse von 17,551 kDa ergeben würde.

Die MALDI-Messung ergab einen Peak bei einer Masse von 18,097 kDa, was für eine Glykosylierung mit GlcNac(Man)₂ spricht. Eine genauere Untersuchung der Zuckerstruktur war auf Grund der geringen Proteinmenge nicht möglich.

MALDI-MS-Spektrum des GM2APs aus Gewebe

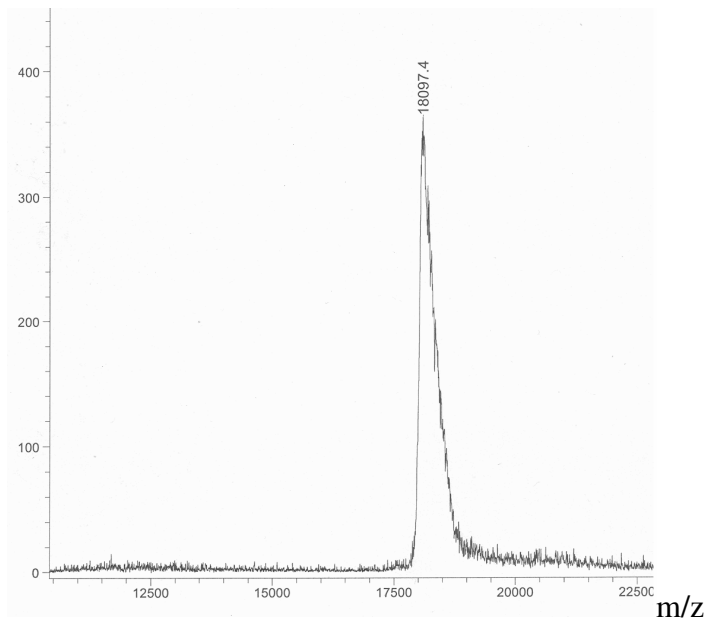


Abbildung 21: MALDI-Massenspektrum des GM2APs

Die MALDI-Messung ergab einen Peak bei einer Masse von 18097,4 Da. Der Literaturwert liegt bei 18000-22000 Da (Ran und Fanucci, 2009). Die rechnerische Masse liegt ohne Zucker bei 17551,335 Da, was für eine Glykosylierung mit GlcNac(Man)₂ spricht.

Beide Präparate lagen in reiner Form vor und zeigten ähnliche Aktivität im Enzymaktivitäts-Assay.

3.2 Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance)

3.2.1 Wechselwirkungen des rGM2AP-His6 mit immobilisierten Lipiddoppelschichten und Kontrollexperimente

3.2.1.2 Grundlagen

Unter der Annahme, dass das rekombinant exprimierte rGM2AP-His6, dessen Aktivität im liposomalen Assay überprüft wurde, ein guter, funktionaler Ersatz für das seltene, nur schwer aus Gewebe zu reinigende GM2AP ist, wurden die SPR-Messungen mit rGM2AP-His6 durchgeführt.

Das Verhalten des rGM2AP-His6 gegenüber Membranen und seine Spezifität gegenüber verschiedenen Lipiden sollte an immobilisierten Liposomen untersucht werden. Entsprechend vorhergegangener Messungen mit den lysosomalen Sphingolipid Aktivatorproteinen Sap-A (Locatelli-Hoops et al., 2006) und Sap-B (Rommel et al., 2007) wurde vermutet, dass auch

beim GM2AP ein von uns als „Abschwemmung“ bezeichnetes Phänomen auftreten könnte, bei dem Lipidmaterial vom Chip abgelöst wird. Dementsprechend wird hier nach der Überleitung der LLBPs nicht nur die Basislinie erreicht, sondern diese, ähnlich wie beim CHAPS, deutlich unterschritten.

Dieses Phänomen wurde in den Messung mit Sap-A und Sap-B durch negativ geladene Lipide wie BMP stimuliert und durch Cholesterol gehemmt (Locatelli-Hoops et al., 2006, Rimmel et al., 2007).

Um dieses zu untersuchen wurden die Liposomen reversibel durch Insertion der Alkylketten eines L1-Chips in die Lipiddoppelschicht an diesen gebunden.

Um eine reproduzierbare Messung zu gewährleisten, wurden folgende Standardbedingungen für die Messung aufgestellt (5.2.4.2, Abb. 22, (Rimmel, 2007)):

- Immobilisierung der Liposomen (Liposomensuspension mit einer Lipidgesamtkonzentration von 0,5 mM in 50mM Natriumcitrat-Puffer pH 4,2) auf einem L1-Chip
- NaOH-Zwischenspülung: Löst nur schwach gebundene Liposomen vom Chip ab. Nach der Spülung wurde erneut mit Liposomen beladen.
- Messung mit einer Analyt-Konzentration (Analyt: nicht immobilisierter Interaktionspartner bei einer Biacore-Messung) von 5 μ M: Injektion von 60 μ l der Analyt-Lösung bei einer Flussrate von 20 μ l/min (entsprechend 180 s) und anschließender Injektion des reinen Puffers mit gleicher Flussrate für 220 s
- Durch Spülen mit 20 mM CHAPS und 50 mM NaOH Regeneration des Chips, d.h. Entfernung aller gebundenen Liposomen, Lipide oder Proteine
- alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt

Die Beladung des Sensorchips mit Liposomen (Abb. 22) lieferte für gleiche Liposomenzusammensetzung reproduzierbare Werte im Bereich zwischen 1000-8000 RU (*Resonance Units*). Eine ausreichende Beladung des Chips liegt ab 6000 RU vor (Cooper et al., 2000).

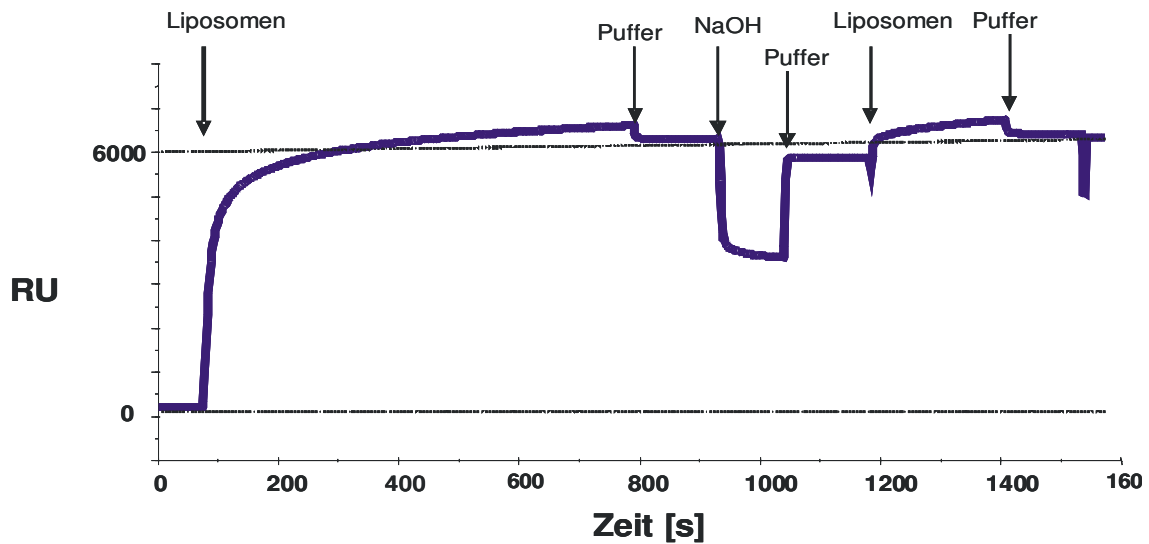


Abbildung 22: Beladung des L1-Chips

Durch Anbindung der Liposomen an den L1-Chip stieg das Signal auf mehr als 6000 RU. Durch Spülen mit Puffer (50 mM Natriumcitratpuffer, pH 4,2) wurden erste, ungebundene Liposomen abgeschwemmt, durch die NaOH-Zwischenspülung schwach gebundene Liposomen abgelöst. Durch Überleitung von NaOH kam es zudem zu einem durch den Puffer-Wechsel verursachten Abfall der RUs. Wurde erneut Puffer übergeleitet, so erhöhte sich das Signal wieder. Um eine bessere Beladung zu erreichen wurde nach der Zwischenspülung erneut mit Liposomen beladen (Locatelli-Hoops et al., 2006, Remmel et al., 2007)

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Auflistung von Liposomenzusammensetzungen, mit denen eine ausreichende Anbindung an den L1-Chip erreicht wurde.

DOPC (mol%)	Cholesterol (mol%)	DO-BMP (mol%)	Gangliosid (mol%) (GM1/GM2)
60	20	20	-
50	10	30	10
55	9	27	9
60	-	20	10
70	-	30	-
50	20	30	-
60	-	30	10
60	20	10	10

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen Liposomen, mit denen eine erfolgreiche Beladung des L1-Chips erfolgte

Liposomen, welche GM1 in Konzentrationen ab 10 mol% in Kombination mit DO-BMP-Konzentrationen ab 20 mol% besaßen, banden meist nicht ausreichend an den L1-Chip an (Abb. 23). Liposomen gleicher Zusammensetzung, welche GM2 oder GM3 beinhalteten, zeigten ähnlich schlechtes Anbindeverhalten (Daten nicht abgebildet).

Auffällig ist, dass die schlechteste Anbindung mit Liposomen erfolgte, die neben PC und Cholesterol nur 20 mol% GM1 enthielten. Es liegt nahe, dass dies in einer sterischen Behinderung durch die Zuckerstruktur des GM1 begründet ist.

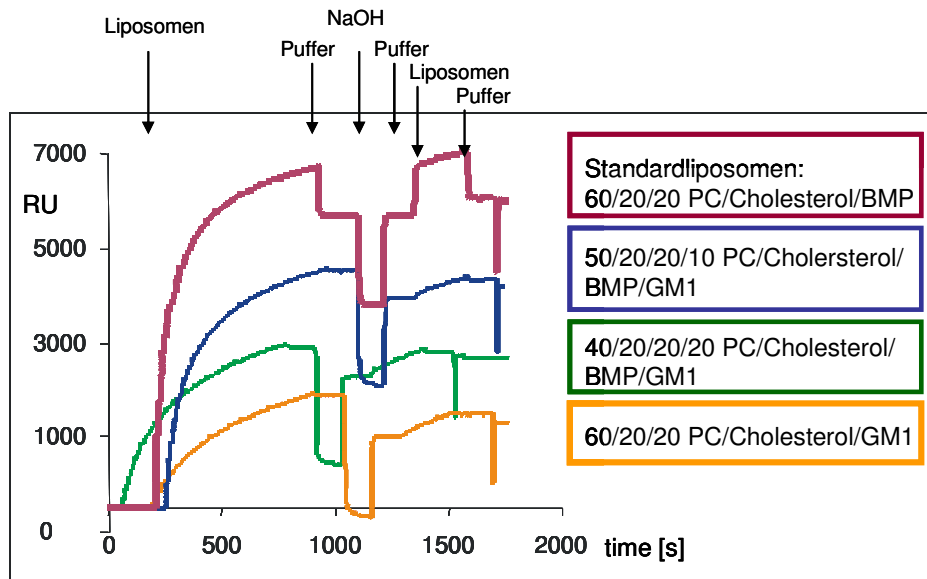


Abbildung 23: Beladung mit Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung

Mit GM1-haltigen Liposomen (10-20 mol%) konnte in Anwesenheit von BMP meist keine ausreichende Anbindung an den Chip erreicht werden. Liposomen, die GM1 in einer Konzentration von 20 mol% beinhalteten, banden auch dann nicht ausreichend an den Chip an, wenn sie kein BMP enthielten. Die Messungen wurden standardmäßig in 50 mM Natriumcitratpuffer durchgeführt, jedoch führte auch ein Wechsel zu anderen Puffern nicht zu einer Verbesserung der Anbindung.

3.2.1.3 Messungen ohne Ganglioside in den Liposomen

Um die Messungen besser vergleichen zu können, wurde der RU-Wert nach der Beladung auf Null gesetzt. Die Grundlinie des unbeladenen Chips lag demnach einige Tausend RU (entsprechend der gebundenen Liposomenmenge) unterhalb der Nulllinie.

Die durch Beladung erreichte Grundlinie war bei Pufferüberleitung stabil, die Lipide aber durch das Detergenz CHAPS (20 mM) innerhalb weniger Sekunden wieder vollständig entfernbar (Abb. 24), d.h. die Grundlinie des unbeladenen Chips wurde wieder erreicht.

CHAPS (20 mM) löste die Liposomen vom Chip ab, das Signal fiel unter die Basislinie. Der Abfall des CHAPS-Signals bei 180 s spiegelte die Änderung des Brechungsindex beim

Übergang von CHAPS-haltigem zu reinem Puffer wieder. Dies ist der Fall, da CHAPS sich auf der hydrophoben Chip-Oberfläche anreichern kann.

Als Standardliposomen dienten Liposomen mit einer Zusammensetzung aus 60 mol% DOPC, 20 mol% Cholesterol und 20 mol% DO-BMP. Die Messungen wurden mit rGM2AP-His6 durchgeführt. Als Kontrolle für ein nicht lysosomales an Membranen anbindendes Protein wurde Cyt c verwendet.

Die Messung an Standardliposomen zeigte, dass das rGM2AP-His6 im Vergleich zu Cyt c weniger stark an die Liposomensicht anbindet. Es erreicht nur etwa 1/3 der RUs von Cyt c. Zudem dissoziierte das rGM2AP-His6 stärker wieder von den Liposomen ab als Cyt c. Die RUs wurden durch Spülen mit Puffer herabgesetzt, die Basislinie wurde jedoch weder erreicht noch unterschritten (Abb. 24)

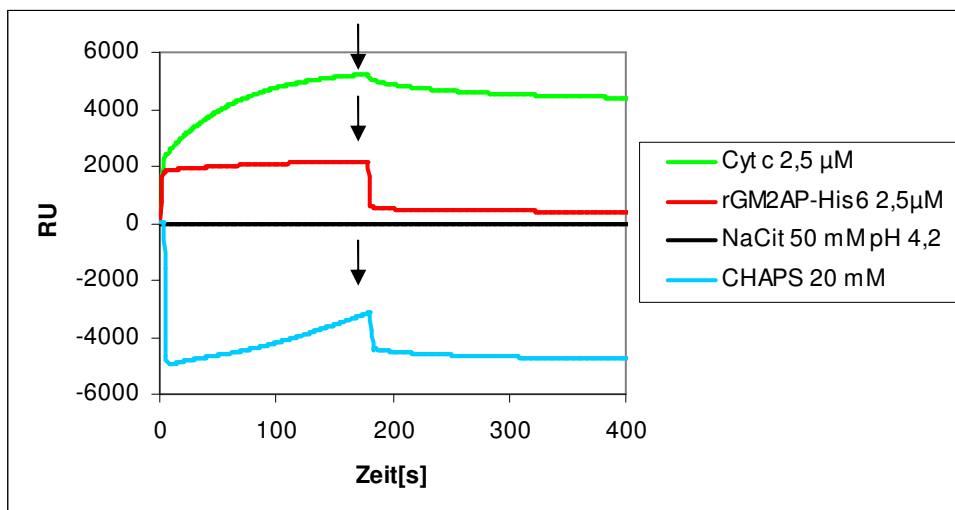


Abbildung 24: Cyt c und rGM2AP-His6 banden an die Liposomen an während CHAPS Lipidmaterial vom Chip ablöste

Nach der Immobilisierung von Standardliposomen (PC/Cholesterol/DO-BMP, 60/20/20 mol%) auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6, Cyt c, CHAPS in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 μl/min injiziert. Im Anschluss (↓) wurde für 220 s mit der gleichen Flussrate Puffer über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständige Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht, Cyt c band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte nur langsam wieder ab, während CHAPS die Liposomen nahezu vollständig vom Chip entfernte. rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte beim Spülen mit Puffer zu einem großen Teil schnell wieder ab. Das Signal unterschritt die Basislinie jedoch nicht.

Des Weiteren wurde der Einfluss der rGM2AP-His6-Konzentration auf das Anbindeverhalten untersucht. Konzentrationserniedrigung des rGM2APs führte zu verringerter

Anbindung des Proteins an die chip-gebundenen Liposomen. Nach Spülung mit Puffer wurden jedoch annähernd gleiche RUs erreicht (Abb. 25 A/B).

Zudem wurde der Einfluss der Kettenlänge des BMPs untersucht. Bei Verwendung von DO-BMP und Myristoyl-BMP stellte sich heraus, dass die Kettenlänge des BMPs keinen Einfluss auf das Anbindeverhalten des rGM2AP-His6 hatte (Abb. 25 A/B).

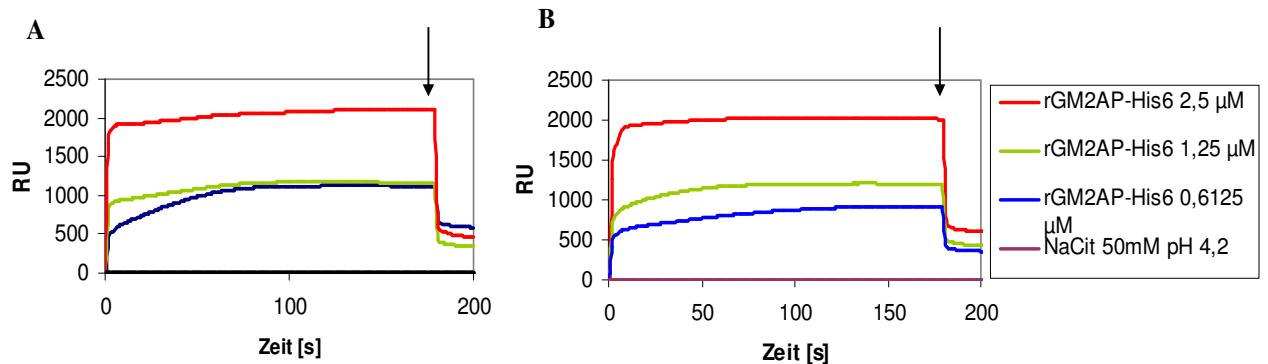


Abbildung 25: Variation der eingesetzten rGM2AP-His6 Menge

A: Verwendung von DO-BMP, B: Verwendung von Myristoyl-BMP

Nach der Immobilisierung von Standardliposomen (PC/Cholesterol/BMP, 60/20/20 mol%) auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6 in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert. Im Anschluss (↓) wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. Die Überleitung des Puffers änderte die Grundlinie (entspricht der vollständigen Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht. rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte zu einem Großteil schnell wieder ab. Das Signal unterschritt die Basislinie jedoch nicht. Eine geringere Konzentration an rGM2AP-His6 führte zu einer verringerten Anbindung, die BMP-Kettenlänge hatte keinen Einfluss auf die Anbindung des rGM2AP-His6.

Da die Verwendung von BMP unterschiedlicher Kettenlänge keine Veränderung bei der Anbindung des rGM2AP-His6 an die Liposomen bewirkt hatte, wurde in den weiteren Experimenten mit DO-BMP gearbeitet.

Zunächst wurde der Einfluss des BMPs durch Konzentrationserhöhung auf 30% untersucht. Es zeigte sich, dass das rGM2AP-His6 unter diesen Bedingungen wieder vollständig von den Liposomen abdiffundiert, die Basislinie jedoch nicht unterschritten wird (Abb. 26 B). Abb. 26 A zeigt zum Vergleich eine Messung mit 20 mol% DO-BMP. Es zeigte sich, dass Anbinde- und Diffusionseigenschaften des rGM2AP-His6 durch Erhöhung des DO-BMP-Gehaltes nur minimal beeinflusst wurden.

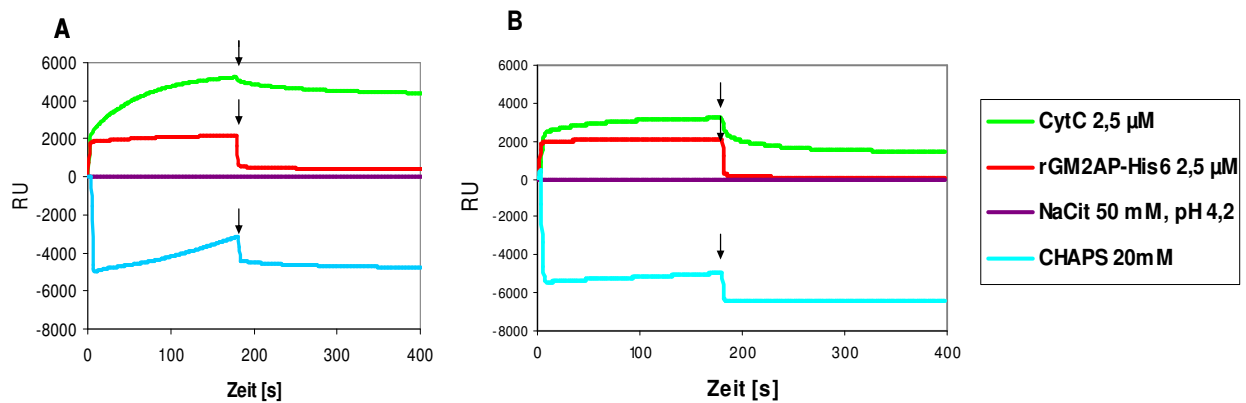


Abbildung 26: Erhöhung der DO-BMP-Konzentration hatte geringen Einfluss auf das Verhalten des rGM2AP-His6

A) Standardliposome, B) PC/Cholesterol/DO-BMP, 50/20/30 mol %

Nach der Immobilisierung der Liposomen auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6, Cyt c, CHAPS in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert, im Anschluss (↓) wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. A) + B) Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständige Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht, Cyt c band an die immobilisierten Liposomen und dissoziierten nur langsam wieder ab, während CHAPS die Liposomen nahezu vollständig vom Chip entfernte. A) rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte zum Teil wieder ab. Das Signal erreichte die Basislinie nicht. B) rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte vollständig wieder ab. Das Signal erreichte die Basislinie, unterschritt diese jedoch nicht.

Wurde bei einem DO-BMP-Gehalt von 30 mol% kein Cholesterol in die Liposomen gegeben, so führte dieses zu keinem weiteren Abfall des Signals. Die Kurve verlief analog zu den bisherigen Messkurven, die Basislinie wurde nicht unterschritten (Daten nicht abgebildet).

3.2.1.4 Messungen mit Gangliosid-haltigen Liposomen

Im Anschluss wurde der Einfluss von Gangliosiden in den Liposomen auf das Anbinde- und Abschwemmverhalten des rGM2AP-His6 untersucht.

Mit DO-BMP-haltigen Liposomen die 10 mol% GM1 beinhalteten konnte eine ausreichende Anbindung an den Chip erreicht werden, auch hier band rGM2AP-His6 an die Liposomen an und dissoziierte, beim Spülen mit Puffer, weitestgehend wieder ab. Die Basislinie wurde nicht

unterschritten. (Abb. 27). Dasselbe Verhalten zeigte sich bei Liposomen mit 10 mol% GM2 oder 10 mol% GM3 oder 5 mol% GM1+ 5 mol% GM2 (Daten nicht abgebildet).

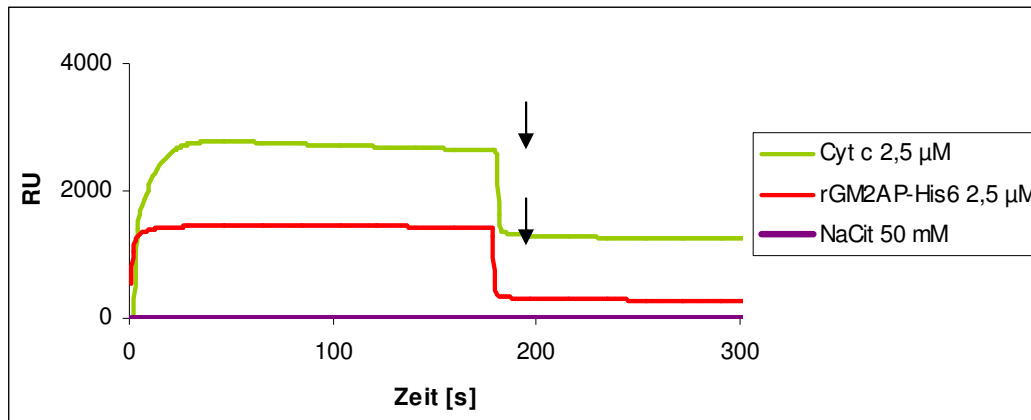


Abbildung 27: Bei liposomalem Gangliosidgehalt von 10 mol% bindet rGM2AP-His6 weiterhin an die Liposomen an.

Nach der Immobilisierung von Standardliposomen (PC/Cholesterol/DO-BMP/GM1, 60/20/10/10 mol%) auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6, Cyt c in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert, im Anschluss wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständige Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht, Cyt c band an die immobilisierten Liposomen an, rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte zu einem Großteil schnell wieder ab. Das Signal unterschritt die Basislinie jedoch nicht.

Ferner wurden weitere Variationen der Liposomenzusammensetzung vorgenommen (vgl. Tab. 1). War die Anbindung der Liposomen an den L1-Chip erfolgreich, so band das rGM2AP-His6 an die Liposomen an und diffundierte zum Teil wieder ab. Das Signal unterschritt jedoch in keinem Falle die Basislinie (Daten nicht abgebildet).

Des Weiteren konnte mit vielen Liposomen mit hohen BMP- und Gangliosid-Konzentrationen keine ausreichende Anbindung erreicht werden (vgl. Abb.23). Auch ein Wechsel des Puffers von 50 mM NaCit pH 4,2 zu PBS pH 7, pH 4,2 oder zu Hepes-Puffer pH 7 führte zu keiner Verbesserung der Anbindung (Daten nicht abgebildet). Zu diesen Liposomen zählten z.B. Liposomen der Zusammensetzung PC/DO-BMP/Gangliosid 70/20/10 und PC/Cholesterol/DO-BMP/Gangliosid 50/20/20/10, welche ebenfalls in verschiedenen Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt wurden.

Bei vorhergegangenen SPR-Messungen mit verschiedenen Saposinen wurde ein Phänomen beobachtet, das als Lipidabschwemmung bezeichnet wird. Dieses bedeutet, dass nach der Überleitung der Lysosomalen Lipid Bindungs Proteine (LLBPs) das Signal nicht nur die Basislinie erreicht, sondern diese, ähnlich wie beim CHAPS, deutlich unterschritten wird.

Daher wurde zum weiteren Vergleich rekombinantes Sap-B, ein LLBP welches für seine lipidabschwemmende Wirkung bekannt ist (Rommel et al., 2007), vermessen (Abb. 28). Das rekombinante Protein trägt zur Erleichterung der Aufreinigung einen Rest aus 4 Histidinen (rSap-B-His4).

Hierbei wurde das, für rSap-B-His4 beschriebene, Abschwemmverhalten beobachtet. rGM2AP-His6 bewirkte jedoch auch unter den für rSap-B-His4 optimalen Bedingungen keine Abschwemmung von Lipiden.

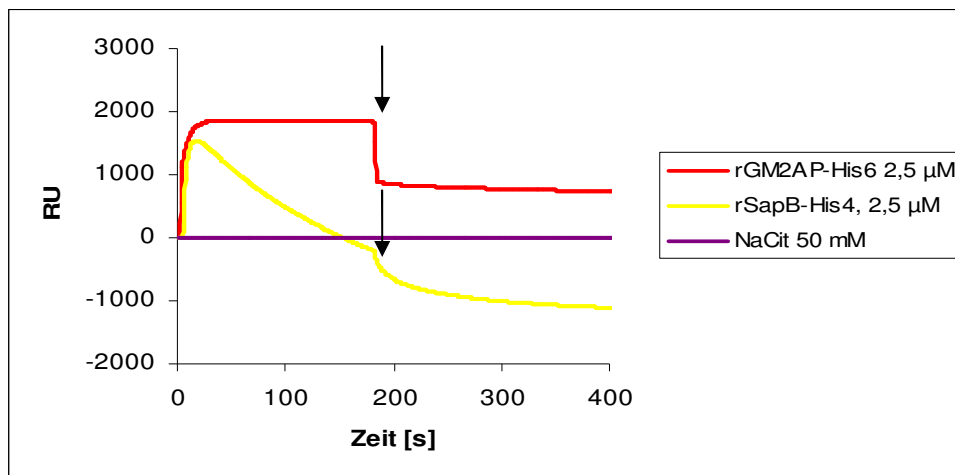


Abbildung 28: rGM2AP-His6 band an Liposomen an, während rSap-B-His4 Lipidmaterial vom Chip ablöste

Nach der Immobilisierung von Standardliposomen (PC/Cholesterol/DO-BMP, 60/20/20 mol%) auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6, rSap-B-His4 in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 μl/min injiziert, im Anschluss (↓) wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständigen Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht. rSap-B-His4 band leicht an die Liposomensicht an, dissoziierte jedoch bereits während der Protein-Überleitung wieder ab und führte bei Puffer-Überleitung verstärkt zu einer Unterschreitung der Basislinie und somit zur Abschwemmung von am Chip gebundenem Material. rGM2AP-His6 band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte zu einem Großteil bei Pufferüberleitung wieder ab. Das Signal unterschreitet die Basislinie jedoch nicht, so dass vermutlich keine Lipide abgeschwemmt wurden.

Auch bei starker Konzentrationserhöhung des rGM2AP-His6 auf bis zu 10 μM konnte auf GM1-haltigen Liposomen (unter Bedingungen unter denen rSap-B-His4 lipidablösende Wirkung zeigt) keine Unterschreitung der Basislinie beobachtet werden (Abb. 29). Die Erhöhung der Konzentration führte zu einem erhöhten Anbindesignal und beim Spülen mit Puffer zu verschlechterter Abdissoziation des Proteins.

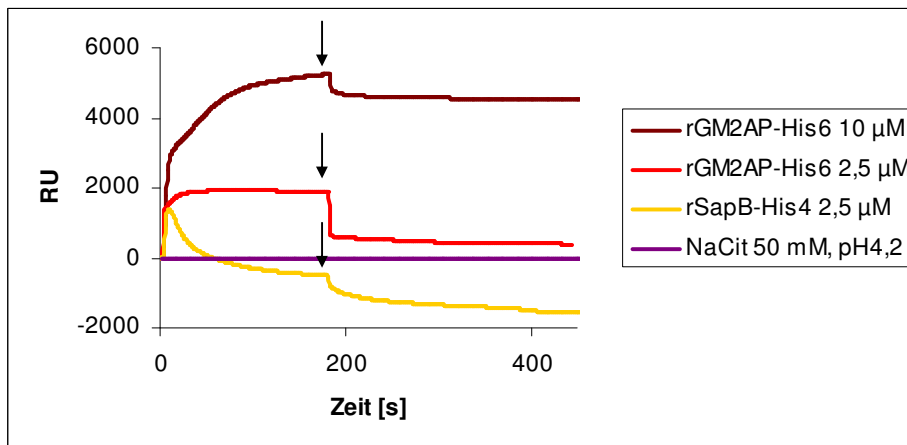


Abbildung 29: Konzentrationserhöhung des rGM2AP-His6 auf GM1-haltigen Liposomen führte zu verstärkter Anbindung.

Nach der Immobilisierung von Liposomen (PC/DO-BMP/GM1, 60/30/10 mol%) auf dem L1-Chip wurden rGM2AP-His6, rSap-B-His4 in Puffer (50 mM NaCit, pH 4,2) oder der Puffer alleine in den angegebenen Konzentrationen für 180 s mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert, im Anschluss (↓) wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständigen Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht. rGM2AP-His6 (2,5 µM) band an die immobilisierten Liposomen an und dissoziierte zu einem Großteil schnell wieder ab. Das Signal unterschritt die Basislinie jedoch nicht, so dass keine Lipide abgeschwemmt wurden. Eine höhere Konzentration an rGM2AP-His6 führte zu einer verstärkten Anbindung und zu einer verringerten Diffusion beim Spülen mit Puffer. Mit rSap-B-His4 wurde die Basislinie unterschritten. Es wurde Material vom Chip abgeschwemmt.

3.2.2 Endogenes GM2AP aus Nierengewebe

Da das rGM2AP-His6 unter Bedingungen, unter denen rSap-B-His4 Lipide vom Chip löst, nur an diese anbindet und wieder abdiffundiert, wurde zum Vergleich das aus menschlichem Gewebe isolierten GM2AP gemessen. Es zeigte sich, dass das GM2AP ohne Hexahistidin-Rest ein anderes Verhalten aufwies als rGM2AP-His6 (Abb. 30). Das Protein band zunächst leicht an den Chip an. Noch während der Überleitung der Proteinlösung sank das Signal jedoch ab und unterschritt bald die Basislinie. Durch Überleitung von Puffer wurde dieser Effekt verstärkt und erreichte ein Signalstärke von -1500 RU. Bei rSap-B-His4 trat der bei GM2AP beobachtete Effekt stärker auf, das Signal fiel auf -3000 RU.

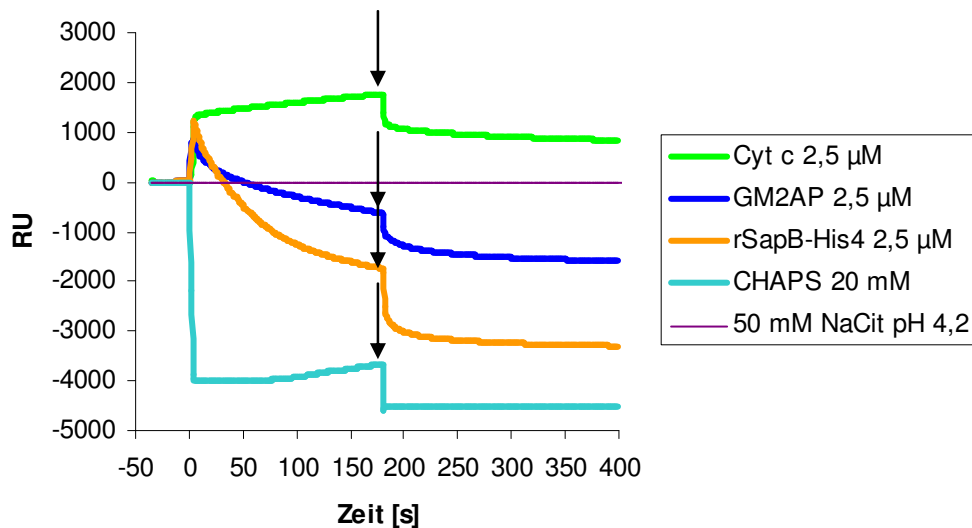


Abbildung 30: GM2AP verhält sich bei SPR-Messungen ähnlich dem rSap-B-His4

Nach der Immobilisierung von Liposomen (PC/DO-BMP/GM2, 85/10/5 mol%) auf dem L1-Chip wurden Cyt c (2,5 µM), GM2AP (2,5 µM), rSap-B-His4 (2,5 µM), CHAPS (20 mM) oder reiner Puffer für 180 s mit einer Flussrate von 20 µl/min injiziert, im Anschluss (↓) wurde für 220 s reiner Puffer mit der gleichen Flussrate über den Chip geleitet. Die Überleitung von Puffer änderte die Grundlinie (entspricht der vollständigen Beladung des Chip L1 mit Liposomen) nicht.

Das Cyt c band an den Chip an und diffundierte beim Spülen mit Puffer teilweise ab. Das GM2AP aus Gewebe band zunächst an den Chip an und schwemmte schon während der Überleitung Lipidmaterial ab. Mit Überleitung des Puffers wurde dieser Effekt verstärkt. Das Signal fiel auf - 1200 RU unter die Basislinie des beladenen Chips. Bei rSap-B-His4 war der beim GM2AP beobachtete Effekt stärker ausgeprägt. Das Signal fiel auf -3000 RU unter die Basislinie des beladenen Chips.

Bei der Überleitung von CHAPS fiel das Signal sofort stark ab.

Aus dieser Messung ließ sich vermuten, dass das GM2AP aus Gewebe ähnlich wie rSap-B-His4 Lipidmaterial vom Chip abschwemmte. Somit bestand ein signifikanter Unterschied zu rGM2AP-His6, welches nur an die Liposomen anband.

Da rGM2AP-His6 sich grundlegend anders als das Protein aus Gewebe verhielt, obwohl das Präparat im Aktivitäts-Assay aktiv war, wurde ein anderes Messverfahren zur Untersuchung der Eigenschaften des GM2AP und des rGM2AP-His gesucht um den Grund dieser veränderten Eigenschaften zu klären.

3.3 Dynamische Lichtstreuung

Um den Einfluss des rGM2AP-His6 auf die Liposomen weiter zu untersuchen wurden DSL-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde die Vesikelgröße vor und nach der Zugabe des rGM2AP-His6 bestimmt.

Die Vesikel besaßen, abhängig von ihrer Zusammensetzung einen Radius von 62-120 nm. Grundsätzlich weisen BMP-haltige Vesikel eine etwas geringere Größe auf, als BMP-freie Vesikel. Nach Bestimmung der Liposomengröße (Abb. 31 A) wurde rGM2AP-His6 zu den Liposomen gegeben und die Vesikelgröße nach 15 Minuten erneut vermessen (Abb. 31 B). Hierbei kam es unabhängig von der Liposomenzusammensetzung zu einer Vergrößerung der Liposomen auf durchschnittlich 200 nm Radius, was zum einen auf Aggregation, zum anderen auf Vesikelfusion beruhen kann. Bei Aggregation würde man jedoch eine stärkere Vergrößerung des Signals erwarten, welches auch diffuser wäre. Dieses müsste jedoch durch EM-Messungen noch weitergehend untersucht werden.

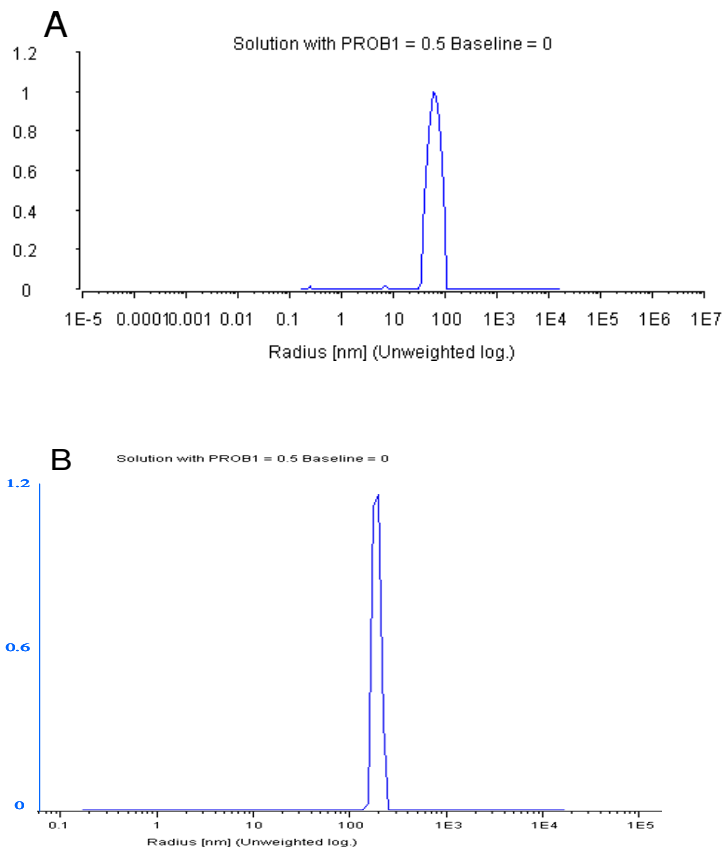


Abbildung 31: Beispielmessung mit Liposomen der Zusammensetzung DOPC/Cholesterol/DO-BMP/GM1 55/20/20/5 mol%. A) Vor rGM2APHis6-Zugabe. B) Nach rGM2AP-His-Zugabe

Nach Zugabe von rGM2AP-His6 zeigte sich nach 15 Minuten Inkubation eine deutliche Vergrößerung des Partikelradius von 80 nm zu 190 nm.

Diese Messungen sprachen dafür, dass durch rGM2AP-His6 Vesikelfusion hervorgerufen wurde. Daher wurde ein neuer Assay zur Untersuchung von Lipidtransfer und Vesikelfusion entwickelt.

3. 4 Entwicklung eines kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays

Um die Wechselwirkungen membranaktiver Proteine mit Lipiddoppelschichten zu untersuchen, wurde ein Assay entwickelt, der es ermöglicht zwischen Lipidtransfer und Vesikelfusion zu unterscheiden. Hierzu wurde die Methode des Förster Resonanz Energie Transfers (FRET) mit der magnetischen Trennung über BioMag[®]-Technik in einem Assay kombiniert (Abb. 32).

Bisher wurden von uns drei verschiedene Assays zur Untersuchung von Lipidtransfer, bzw. Membranfusion eingesetzt. Im FRET-Transfer-Assay war die Beobachtung von Kinetiken möglich, jedoch keine klare Unterscheidung zwischen Vesikelfusion und Lipidtransfer. Der Transfer-Assay, bzw. der Fusions-Assay mittels magnetischer Separation lieferten Aussagen über Lipidtransfer, bzw. die Vesikelfusion, jedoch nicht über beide Vorgänge im gleichen Ansatz.

Da der FRET-Transfer-Assay einen Einblick in die Kinetik der Vorgänge gewährt und über den Transfer-Assay in Kombination mit dem Fusions-Assay über magnetische Separation Aussagen über das Transferverhalten bzw. die fusogenen Eigenschaften am Endpunkt der Reaktion möglich sein sollten, wurden diese drei Assays in einem Assay kombiniert. Dieser kombinierte Lipidtransfer-Membranfusions-Assay könnte in Zukunft auch zur Untersuchung anderer Lysosomaler Lipid Bindungs Proteine eingesetzt werden.

Der Assay basiert auf der Unterscheidbarkeit der eingesetzten Vesikel durch spezielle Markierung zur Detektion und zur Trennung. Der Bindungspartner des zu untersuchenden LLBPs liegt hierbei in fluoreszenzmarkierter Form in den Donorvesikeln (I) vor und muss eine „*low off rate*“ besitzen. Die Aussendung von Licht wird im Donorvesikel durch Rhodamin-PE mit „*low off rate*“ unterbunden. Zur späteren Separierbarkeit beinhalten die Donorvesikel Biotin-PE (BiotinX-DHPE, „*low off rate*“), welches an Streptavidin binden kann. Die Akzeptorvesikel (II) sind zur späteren Detektion mit [¹⁴C]-DPPC markiert, welches auch eine „*low off rate*“ besitzt.

Es wurden zwei verschiedene Präparationen des GM2AP eingesetzt, eine aus menschlichem Nierengewebe gereinigte Präparation (GM2AP) und ein rekombinant hergestelltes Präparat,

welches zur Aufreinigung einen Hexahistidin-Rest trägt (rGM2AP-His6). Ziel war es, die Funktionsweise des GM2APs und eventuelle funktionelle Unterschiede der beiden Proteinpräparationen aufzuklären.

Für die Untersuchung des GM2APs enthalten die Donorvesikel (I), bei Anregung mit 480 nm, grün fluoreszierendes 2-NBD-GM1 (2 mol%), Rhodamin-PE (4 mol%) und Biotin-PE (4 mol%) (Abb. 32). Das 2-NBD-GM1 ist durch seinen langkettigen Ceramidanteil in der Membran verankert und besitzt durch eine, die Anbindung des GM2APs nicht störende, NBD-Gruppe in 2 Position der Acylkette, eine „*low off rate*“ (Schwarzmann et al., 2005) (Abb. 15). Die restliche Vesikelzusammensetzung kann aus verschiedenen unmarkierten Lipiden variiert werden.

Die Markerlipide sind alle fest in der Membran verankert. Ein spontaner Transfer wurde bei vorausgegangenen Kontrollmessungen entsprechend (Abdul-Hammed et al., 2010, Schwarzmann et al., 2005) ausgeschlossen (Daten nicht abgebildet). Durch die Verwendung von 4 mol% Rhodamin-PE als Quencher wird die Grünfluoreszenz des 2-NBD-GM1 in den Donorvesikeln nahezu vollständig gequencht. Kommt es zur Fusion von Vesikeln, so wird die NBD-Fluoreszenz der fusionierten Vesikel ebenfalls nahezu vollständig gequencht.

Das fluoreszente 2-NBD-GM1 kann bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt werden und sendet dann Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm aus. Ist im selben Vesikel ausreichend Rhodamin-PE vorhanden, so wird dieses ausgesendete Licht gequencht. Die Akzeptorvesikel (II) enthalten als markierendes Lipid ausschließlich 1 mol% radioaktives [¹⁴C]-PC. Die weitere Zusammensetzung ist variierbar, besteht jedoch nur aus unmarkierten Lipiden und ist der Zusammensetzung der Donorvesikel (I) äquivalent.

Das vom GM2AP als Bindungspartner akzeptierte 2-NBD-GM1 sollte von diesem zu den Akzeptorvesikeln (II) transferiert werden (Schwarzmann et al., 2005). Das in die Akzeptorvesikel transferierte 2-NBD-GM1 ist nun in der Lage, bei Anregung Licht auszusenden, welches im FRET-Teil des Assays detektiert wird. Des Weiteren kommt es im FRET zu geringem Anstieg der Fluoreszenz, wenn Donorvesikel mit Akzeptorvesikeln fusionieren und es durch die daraus resultierende Verdünnung zum partiellen Dequenchen kommt. Der nur geringe Anstieg auf bis zu 5% der im FRET maximal detektierbaren Fluoreszenz wird durch die 4 mol% Rhodamin-PE bedingt. Dieser Wert wurde experimentell ermittelt, indem die Fluoreszenz von Vesikeln bestimmt wurde, welche durch Extrusion durch 100 nm Poren hergestellt wurden und der Lipidzusammensetzung von, im Verhältnis 1:6 fusionierter Donor- und Akzeptorvesikel entsprachen. Dieser Wert wird als Näherungswert für die maximal durch Fusion erreichbare Fluoreszenz angenommen. Dabei muss beachtet

werden, dass es einen starken Größenunterschied zwischen künstlich hergestellten Fusionsvesikeln von 100 nm und tatsächlich fusionierten Vesikeln gibt. Es ist nicht bekannt, in wie weit dieses sich auf die Fluoreszenzaussendung auswirkt.

Der Assayansatz besteht aus einer Mischung von Donorvesikeln (I) und Akzeptorvesikeln (II) im Verhältnis 1:6 (siehe 5.2.4.3.2). In vorhergegangenen Experimenten hatte sich herausgestellt, dass durch den Überschuss an Akzeptorvesikeln der Transfer des 2-NBD-GM1 zu den Akzeptorvesikeln begünstigt und die Fluoreszenzausbeute erhöht wird. Bei einer 1:1 Zusammensetzung würde sich schnell ein Gleichgewicht auf niedrigem Niveau einstellen, so dass das 2-NBD-GM1 nur noch zwischen Donor und Akzeptor ausgetauscht würde und es somit zu keinem weiteren Fluoreszenzanstieg bei der FRET-Messung mehr käme.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde im FRET-Assay während der 15-160 minütigen Inkubation der Vesikel zusammen mit LLBP bei 28°C die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Wenn im FRET-Assay das Gleichgewicht erreicht war, d.h. kein weiterer Fluoreszenzanstieg mehr detektiert wurde, wurden die Akzeptorvesikel (II) von Donorvesikeln (I) und fusionierten Vesikeln (III) getrennt. Hier wäre für weitere Messungen eine zeitliche Variation möglich.

Die Trennung der verschiedenen Vesikel wird durch das, fest in der Vesikelmembran verankerte, Biotin-PE in den Donorvesikeln ermöglicht. Dieses wurde entsprechend (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007) mit rGM2AP-His6 kontrolliert (Daten nicht abgebildet). Diese können aus der Lösung herausgezogen werden: Biotin bindet an Streptavidin. Daher wird der Reaktionsansatz nach dem FRET-Teil auf neutralen pH-Wert eingestellt und anschließend mit Streptavidin-überzogenen Eisenkügelchen (BioMag-Kügelchen) 20 Minuten auf Eis inkubiert. Donorvesikel und fusionierte Vesikel binden nun an die Kügelchen an. Im Vorfeld wurde experimentell ermittelt, dass die vollständige Bindung der Biotin-haltigen Vesikel gegeben ist.

Durch Pelletierung der Eisenkügelchen in einem Magnetständer werden nun alle Biotin-haltigen Vesikel aus der Lösung gezogen. Die Akzeptorvesikel verbleiben im Überstand.

Die Akzeptorvesikel (II) sind durch [^{14}C]-PC markiert, was erlaubt, sie nach der magnetischen BioMag[®]-Separation im Überstand nachzuweisen. Nach der Separation der Biotin-markierten Vesikel werden, sowohl im Überstand als auch im Pellet, Radioaktivität und Fluoreszenz gemessen. Die Vesikelgröße wird durch Dynamische Lichtstreuung kontrolliert.

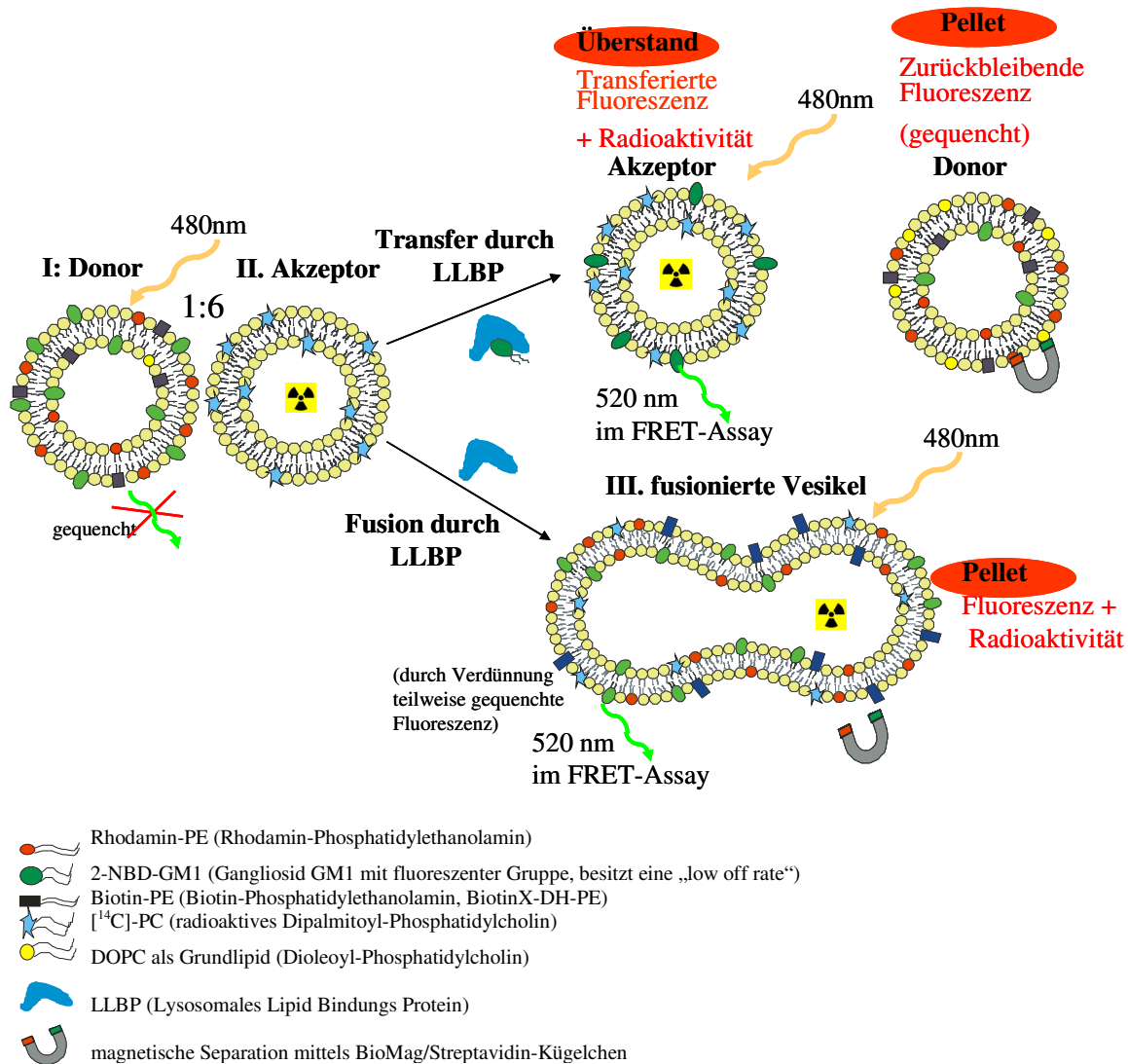


Abbildung 32: Kombiniertes Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay

Die Donorvesikel (I) beinhalten 2 mol % 2-NBD-GM1, 4 mol% Rhodamin-PE, 4 mol% Biotin-PE, 0-20 mol% Cholesterol, 0-20 mol% DO-BMP, ad 100 mol% DOPC. 2-NBD-GM1 dient als fluoreszenter Bindungspartner für das GM2AP, Rhodamin-PE als Quencher. Über Biotin-PE können nach dem FRET-Assay Donorvesikel (I) und fusionierte Vesikel (III) von den Akzeptorvesikeln (II) getrennt werden. Die Akzeptorvesikel (II) entsprechen in der Zusammensetzung unmarkierter Lipide den Donorvesikeln und beinhalten 1 mol% $[^{14}\text{C}]\text{-DPPC}$ zur radioaktiven Markierung. Das Verhältnis Donorvesikel: Akzeptorvesikel ist 1:6.

Zunächst wird im FRET-Assay kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Diese tritt auf, wenn das 2-NBD-GM1 vom Aktivatorprotein zu den Akzeptorvesikeln transferiert wird oder minimal wenn Vesikelfusion zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln auftritt.

Nach dem FRET-Assay (Volumen 400 μl) erfolgt die Trennung von Donorvesikel und fusionierten Vesikel von den Akzeptorvesikeln über BioMag-Streptavidin Interaktion. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis werden Donorvesikel und fusionierte Vesikel in einem Magnetständer pelletiert und so von den im Überstand verbleibenden Akzeptorvesikeln getrennt. Um zwischen Lipidtransfer und Vesikelfusion bzw. Aggregation zu unterscheiden wird im Überstand die Fluoreszenz bestimmt (messbarer Transfer), im Pellet die Radioaktivität gemessen (Vesikelfusion bzw. Aggregation).

Um den Assay zu validieren, wurden die folgenden Kontrollen durchgeführt.

Zunächst wurde kontrolliert, ob das rGM2AP-His6 Lipide, welche keine Vor- oder Abbaustufen des GM2 sind, bei pH-Werten von 4,2-7,4 transferiert. Hierzu wurde ein bereits etablierter Transfer-Assay mittels magnetischer Separation (2.6.2 / 5.2.4.3.1, Abb. 16) mit radioaktiv markierten Lipiden verwendet (Abdul-Hammed et al., 2010).

Um diese Messungen bezüglich Lipidtransfer und Vesikelfusion auszuwerten zu können, wurden die folgenden internen Kontrollmessungen und Blankwertbestimmungen durchgeführt (Radioaktivität = R, Fluoreszenz = F): Donorvesikel alleine (R^D , F^D), Akzeptorvesikel alleine (R^A , F^A), Donorvesikel + Akzeptorvesikel (R^{D+A} , F^{D+A}), Donorvesikel mit BioMag-Streptavidin (R^{D+B} , F^{D+B}), Akzeptorvesikel + BioMag-Streptavidin (R^{A+B} , F^{A+B}), Donor- und Akzeptorvesikel + BioMag-Streptavidin (R^{D+A+B} , F^{D+A+B}), Donor- und Akzeptorvesikel + Protein + BioMag-Streptavidin ($R^{D+A+P+B}$, $F^{D+A+P+B}$). Daraus resultierend wurde der prozentuale Anteil des Lipidtransfers wie folgt berechnet: $[R^{D+A+P+B} - R^{D+A+B}] \times 100 / [R^{D+A} - R^{D+B}]$ (Abdul-Hammed et al., 2010)

Der prozentuale Wert der Vesikelfusion bzw. Aggregation berechnen sich nach $[F^{D+A+B} - F^{D+A+P+B}] \times 100 / F^{D+A}$ (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007) aus dem Verlust von Fluoreszenz durch Fusion.. Dieser Wert dient hier jedoch nur zur internen Versuchskontrolle. Der Wert gibt einen Hinweis auf ein Fusions- bzw. Aggregationsereignis, eignet sich jedoch nicht, um den Anteil der Vesikelfusion genau zu bestimmen, da hier nur der „Verlust der Fluoreszenz im Überstand“ gemessen wird. Demnach gibt es keine Garantie, dass dieser Verlust wirklich durch Vesikelfusion und nicht durch Pipetierfehler oder äußere Einflüsse, wie z.B. unspezifische Bindung an die Gefäßwand, entsteht.

Da die Intensität der Fluoreszenz oft durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst wird, wurde die Verwendbarkeit der NBD-Gruppe durch Messung bei unterschiedlichen pH-Werten überprüft. Es zeigte sich, dass die NBD-Fluoreszenz durch pH-Änderung im Rahmen von 4,2-7,2 nicht nennenswert beeinflusst wurde.

Da beobachtet wurde, dass ca. ein Drittel des gebildeten GM2APs aus kultivierten Zellen ausgeschleust wird (Glombitza et al., 1997) wurde der Frage nachgegangen, ob das GM2AP bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedliche Spezifität aufweist und eventuell weitere Aufgaben neben der Vermittlung der Interaktion von GM2 und HexA besitzen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass das rGM2AP-His6 an BMP-freien Vesikeln mit 10 mol% Cholesterol im pH-Rahmen von 4,2-7,4 keinen Transfer von [¹⁴C]-Phosphatidylethanolamin, [¹⁴C]-Phosphatidylcholin, [¹⁴C]-Sulfatid, [¹⁴C]-Ceramid, [¹⁴C]-Cholesterol und [¹⁴C]-Galaktosylceramid vermittelt (Abb. 33 A).

Es ist zu beachten, dass außer [¹⁴C]-Ceramid und [¹⁴C]-Cholesterol die verwendeten Lipide nicht zum Flip-Flop zwischen den Membranblättern befähigt sind und daher nur die Lipide der äußeren Membranhälfte transferieren können. Für alle verwendeten Lipide außer [¹⁴C]-Cholesterol und [¹⁴C]-Ceramid liegt die maximal transferierbare Lipidmenge demnach bei 50 %.

Mit [¹⁴C]-GM3 haltigen Liposomen trat geringer ein Transfer bei pH 5 auf (Abb. 33 A). Dieses entspricht der Erwartung, da das GM2-Aktivatorprotein auch die Abbauvorstufe des GM2s, das GM1, als Bindungspartner akzeptiert (Conzelmann et al., 1982a). GM3 bildet die nächste Abbaustufe des GM2s und trägt somit einen Zuckerrest weniger. Zudem wurde bereits die Interaktion des GM2APs mit GM3 im TLC-Overlay beobachtet (Hama et al., 1997). Inwieweit das GM2AP wirklich befähigt ist GM3 zu transferieren müsste in weiteren Messungen genauer untersucht werden.

Weiter zeigte sich, dass rGM2AP-His6 auf BMP-freien Liposomen ohne spezifisches Substrat bei pH 4,2 Vesikelfusion im Rahmen von 20-40% vermittelt (Abb.33 B). Schon bei pH 5 sinkt die Vesikelfusion auf Werte um 15%. Mit steigendem pH sinkt die Vesikelfusion bis sie bei pH 7,4 vernachlässigbare Werte von wenigen Prozenten erreicht. Somit könnte die Vesikelfusion nur bei den Vorgängen in den Lysosomen bei pH 4,2 eine Rolle spielen, es bleibt jedoch zu beachten, dass die hier das rGM2AP-His6 mit Hexahistidin-Rest verwendet wird und die Vesikel kein BMP, aber Cholesterol enthalten.

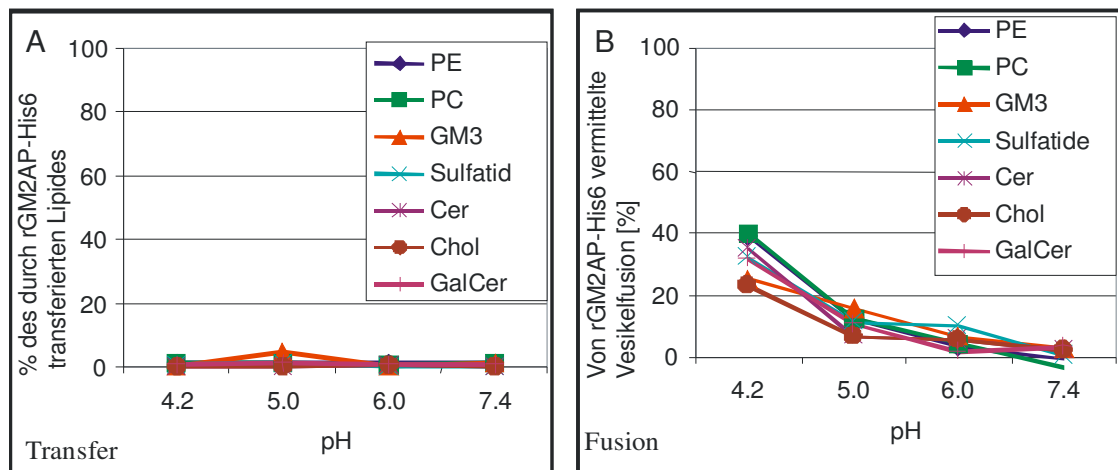


Abbildung 33: Kontrolle des unspezifischen Lipidtransfers durch rGM2AP-His6 im BMP-freien Transferassay

Die Zusammensetzung der Donorvesikel war 85 mol% DOPC, 10 mol% Cholesterol, 4 mol% Biotin-PE und 1 mol% radioaktiv markiertes Lipid, die Akzeptorvesikel beinhalteten 86% DOPC, 10 mol% Cholesterol und 4 mol% NBD-PE. (A) Durch rGM2AP-His6 (1,5 µg, 10 min) transferiertes [¹⁴C]-Lipid [%]. Nur [¹⁴C]-GM3 wird in geringem Maß transferiert. (B) Durch rGM2AP-His6 vermittelte Vesikelfusion. Detektiert als Verlust an Fluoreszenz im Überstand. Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

Unter Berücksichtigung der obigen Beobachtungen wurde die Auswirkung des BMPs, welches in den inneren Membranen der Lysosomen in hoher Konzentration vorhanden ist, auf den unspezifischen Lipidtransfer untersucht. Hierzu wurde der Einfluss von BMP mit zwei unterschiedlichen Kettenlängen (18:1 und 14:0) bei pH-Werten im Bereich von pH 4,2 bis pH 7,4 auf Vesikelfusion und der Transfer von [¹⁴C]-Ceramid und [¹⁴C]-Galaktosylceramid untersucht. Ceramid wurde gewählt, da es das erste zuckerfreie Abbauprodukt des GM2-Abbaus darstellt. Mittels Galaktosylceramid sollte untersucht werden, inwieweit das Vorhandensein eines beliebigen Zuckermoleküls am Ceramid die Bindung durch den GM2AP-beeinflusst.

Es konnte gezeigt werden, dass [¹⁴C]-Ceramid bei den untersuchten pH-Werten und BMP-Kettenlängen nicht durch rGM2AP-His6 transferiert wird (Abb. 34 A). Bei [¹⁴C]-Galaktosylceramid trat sowohl bei DO-BMP als auch bei Myristoyl-BMP bei pH 4,2 ein geringer Transfer auf. Ohne BMP trat kein Transfer auf.

Das GM2AP benötigt demnach mindestens einen Zuckerrest am Ceramid, um noch binden zu können. Das Galaktosylceramid kein Abbauprodukt des GM2s ist scheint nicht von Bedeutung zu sein. Zudem scheint BMP den Lipidtransport zu unterstützen.

Die Neigung zur Vesikelfusion war bei beiden Experimenten ähnlich (Abb. 34 (C)/(D)). Die höchste Fusionsrate von etwa 80% wurde bei pH 4,2 mit BMP-haltigen Liposomen erreicht. Die Kettenlänge war dabei sekundär. Mit steigendem pH-Wert sank die Vesikelfusion.

Somit begünstigt BMP bei pH 4,2 die Vesikelfusion durch rGM2AP-His6, was dafür spricht, dass der durch den GM2AP hervorgerufene Vesikelfusion im Lysosom eine Bedeutung zukommt, da hier ein pH-Wert von 4,2 vorherrscht und die Konzentration an BMP in den intralysosomalen Membranen hoch ist.

Für alle durch den Transfer-Assay gewonnen Werte muss berücksichtigt werden, dass die gemessenen Transferwerte nur den Endzustand widerspiegeln. Akzeptorvesikel, die schon transferiertes Lipid aufgenommen haben und danach mit Donorvesikeln fusionieren werden hier nicht berücksichtigt, da sie bei der magnetischen Separation aus der Lösung gezogen werden. Von einer Berechnung der theoretischen Transferdaten unter der Berücksichtigung der Vesikelfusion wird hier Abstand genommen, da die Vesikelfusion sehr hoch ist und dieses keine genaue Berechnung des Lipidtransfers mehr zulässt.

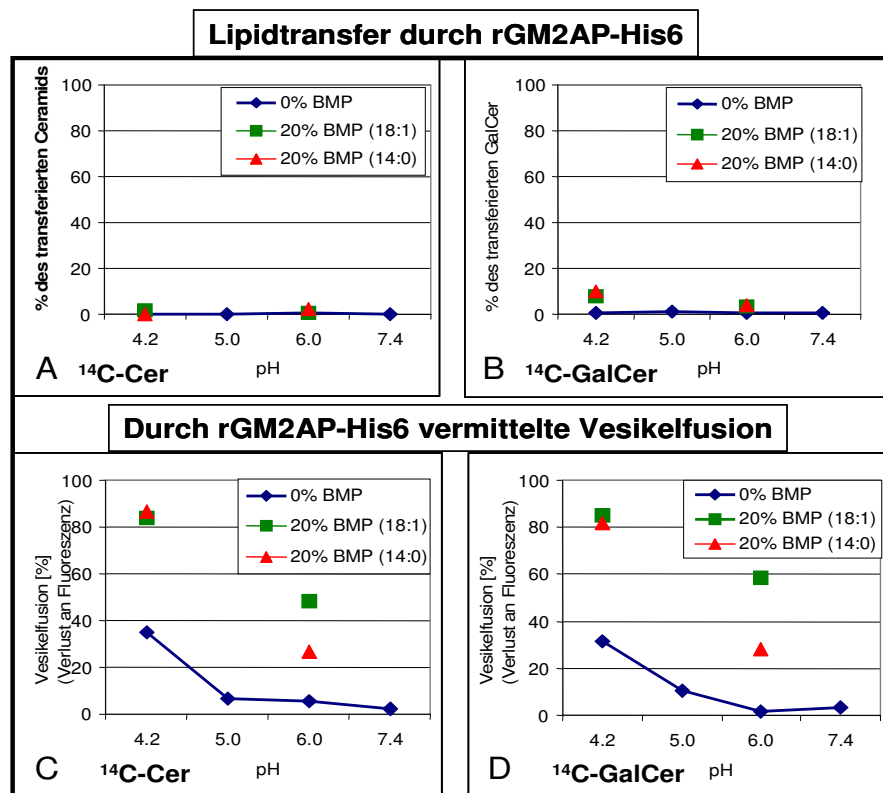


Abb. 34: Auswirkung unterschiedlicher pH-Werte und verschiedener BMP-Konzentrationen auf den Transfer von Ceramid und Galaktosylceramid

Vesikel enthielten 10 mol% Cholesterol und 0 mol% BMP (blau), 20 mol% BMP 18:1 (grün) oder 20 mol% BMP 14:0 (rot). (A) Transfer von [¹⁴C]-Ceramid. (B) Transfer von [¹⁴C]-Galaktosylceramid. (C) Vesikelfusion in Anwesenheit von [¹⁴C]-Ceramid. (D) Vesikelfusion in Anwesenheit von [¹⁴C]-Galaktosylceramid (Rechnenansatz siehe S.52).

Der spezifische Transfer von [¹⁴C]-GM1 wurde mittels Transferassay auf Donorvesikeln mit 67 mol% DOPC, 20 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 1 mol% [¹⁴C]-GM1, 2 mol%

Biotin-PE und Akzeptorvesikeln mit 66 mol% DOPC, 20 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 4 mol% NBD-PE kontrolliert. Für [^{14}C]-GM1 ergab sich ein durch rGM2AP-His6 vermittelter Transfer von 7,5 % der transferierbaren Menge, bei einer Vesikelfusion von 80 % (Verlust von NBD-Fluoreszenz im Überstand) (Daten nicht abgebildet).

Theoretisch könnte man die erhalten Transferwerte unter Berücksichtigung der Vesikelfusion hochrechnen um unter Ausschluss von Vesikelfusion stattfindenden Lipidtransfer abzuschätzen. Bei Fusionswerten von mehr als 40% wird von dieser Hochrechnung jedoch abgesehen, da das Ergebnis zu ungenau wäre (vgl. S. 57).

3.4.1 Enzymaktivitäts-Assay mit 2-NBD-GM2

Um zu überprüfen, ob die NBD-Gruppe des Gangliosides den GM2AP in seiner Funktion behindert, wurde ein liposomaler Enzymaktivitätsassay mit 2-NBD-GM2 durchgeführt. Der Assay wurde entsprechend mit [^{14}C]-GM2 durchgeführt (5.2.2.2.7), wobei sowohl das unmarkierte GM2 als auch das radioaktiv markierte GM2 durch 2-NBD-GM2 ersetzt wurden. Das Ergebnis zeigte, dass das rGM2AP-His6 auch den Abbau von 2-NBD-GM2 durch die Hexosaminidase stimuliert (Abb. 35). In der Probe die rGM2AP-His6 und HexA beinhaltet trat eine klare GM3 Bande auf. Die 2-NBD-Gruppe behindert somit den GM2AP in seiner Funktion nicht, so dass 2-NBD-GM1 im kombinierten FRET-BioMag-Transfer-Fusions-Assay als Substrat eingesetzt werden kann.

Dieses wird durch Messungen in einem mizellaren Assay bestätigt (Schwarzmann et al., 2005).

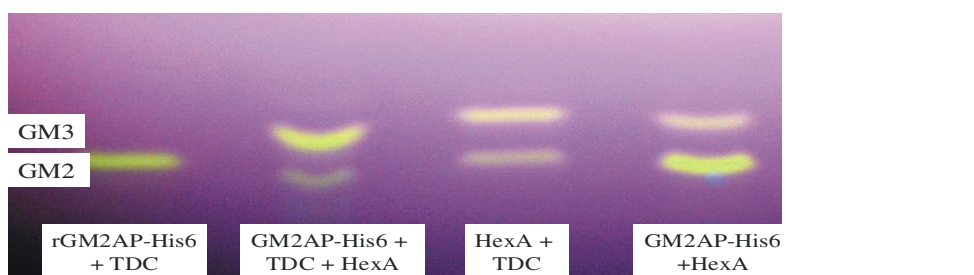


Abbildung 35: Liposomaler Aktivitätsassay mit 2-NBD-GM2

Liposomenzusammensetzung: 10 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 10 mol% 2-NBD-GM2, 70 mol% DOPC, Laufmittel: Chloroform:Methanol:0,22% CaCl_2 / 55:45:10 (v:v:v)

Der Assay wurde 1h bei 37 °C inkubiert. Spur 1: Liposomen und Puffer + 1,5 μg rGM2AP-His6, Spur 2: Liposomen + Puffer + 1,5 μg rGM2AP-His6 + Hex A, Spur 3: Liposomen + Hex A + TDC, Spur 4: Liposomen+ Puffer + Hex A + 1,5 μg rGM2AP-His6. In der Probe, welche HexA und rGM2AP-His6 beinhaltet trat eine deutliche GM3 Bande auf. Die GM3 Bande in Spur 2 war ca. doppelt so stark wie die in den Spuren 3 und 4. Dieses zeigt, dass die Wirkungen von TDC und rGM2AP-His6 sich summieren.

3.4.2 Auswertungs- und Abbildungsschema der Ergebnisse des kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assays

Die genaue Lipidzusammensetzung der jeweils verwendeten Vesikel ist in der Bildunterschrift zu den Messungen zu finden. Die Abbildungen zeigen mittlere Werte aus mindestens drei Messungen.

Da die Vesikel einer Messung sich nur durch die jeweils spezifisch markierten Lipide unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass Donorvesikel und Akzeptorvesikel für die durch ein LLBP vermittelte Aufnahme von 2-NBD-GM1 gleichwertig waren. Im Gleichgewicht erfolgt demnach auch ein Rücktransport von 2-NBD-GM1 zu den Donorvesikeln, bis sich in allen Vesikeloberflächen die gleiche Konzentration von 2-NBD-GM1 befindet. Hierbei muss beachtet werden, dass 2-NBD-GM1 nicht zum „Flip-Flop“ zwischen den beiden Membranblättern fähig ist. Demnach kann nur das in der äußeren Membranschicht befindliche Lipid transferiert werden.

Somit ergab sich bei erreichtem Transfergleichgewicht in einem Ansatz im Verhältnis 1:6 von Donorvesikeln zu Akzeptorvesikeln eine maximal erreichbare Fluoreszenz von $\frac{6}{7}$ der ungequenchten Fluoreszenz der äußeren Schicht ($2\text{-NBD-GM1}^{\text{F } \frac{6}{7}}$), was 42,8 % der eingesetzten Fluoreszenz entspricht. Dies ist der Fall, da sich im Falle eines Transfergleichgewichts ohne Auftreten von Fusion $\frac{1}{7}$ der Fluoreszenz gequencht in den Donorvesikeln befindet.

Der 100% Wert der ungequenchten Fluoreszenz wurde experimentell bestimmt, indem Vesikel angefertigt wurden, die in ihrer Zusammensetzung den Donorvesikeln ohne Rhodamin-PE entsprachen. Diese wurden in der gleichen Konzentration wie die eigentlichen Donorvesikel fluoreszenzvermessen und der Mittelwert aus drei unterschiedlichen Messungen gebildet. Der Wert der maximal transferierbaren Fluoreszenz ($2\text{-NBD-GM1}^{\text{F } \frac{6}{7}}$) errechnet sich aus diesem Messwert wie folgt:

$$2\text{-NBD-GM1}^{\text{F } \frac{6}{7}} = (100\% \text{ Fluoreszenz} / 2) * \frac{6}{7}$$

Hierbei wird näherungsweise angenommen, dass beide Membranschichten gleich groß sind.

3.4.2.1 FRET-Auswertung:

Der Auftrag der FRET-Messung erfolgte in „Prozent der im FRET-Assay erreichbaren Fluoreszenz“ gegen die Zeit. Um die reinen Fluoreszenzwerte der Messung in „Prozent der im FRET-Assay erreichbaren Fluoreszenz“ umzurechnen, musste von dem oben erwähnten 2-NDB-GM1^{F 6/7}-Wert noch die Grundfluoreszenz der mit den Akzeptorvesikel inkubierten Donorvesikel subtrahiert werden (F^{D+A}), um 100% der im FRET erreichbaren Fluoreszenz anzugeben ($2\text{-NBD}^{F 6/7} - F^{D+A}$). Dieser Fluoreszenzhintergrund wurde auch von den Messwerten abgezogen.

Der prozentuale Anteil der im FRET erreichten Fluoreszenz berechnete sich demnach wie folgt: $[F^{D+A+P} - F^{D+A}] / [(2\text{-NBD}^{F 6/7} - F^{D+A}) / 100]$. Dabei entspricht F^{D+A+P} der Fluoreszenz die freigesetzt wird, wenn Donorvesikel und Akzeptorvesikel zusammen mit den LLBP inkubiert werden und F^{D+A} der Fluoreszenz von Donorvesikeln die zusammen mit Akzeptorvesikeln inkubiert wurden.

Endpunktfluoreszenz: Maximal im FRET-Assay erreichte Fluoreszenz, nach der kein weiterer Anstieg der Fluoreszenz mehr detektiert werden kann.

3.4.2.2 Auswertung nach der magnetischen Separation mittels BioMag[®]-Magnetkügelchen:

a) Berechnung der transferierte Fluoreszenz in Prozenten

Die transferierte Fluoreszenz in Prozenten berechnete sich wie folgt: $F^{D+A+P+B} / [(2\text{-NBD}^{F 6/7} - F^{D+A}) / 100]$. Der Wert $F^{D+A+P+B}$ bezieht sich auf die nach der BioMag[®]-Behandlung im Überstand gemessene Fluoreszenz. Da die Donorvesikel vollständig aus der Lösung gezogen werden, muss hier von den gemessenen Werten im Überstand kein Hintergrund abgezogen werden. Die hierzu benötigte Menge an BioMag[®]-Kügelchen wurde in einem Titrationsexperiment bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Die durch Vesikelfusion aus der Lösung entfernten Akzeptorvesikel werden hier nicht berücksichtigt.

b) Definition von 100% Vesikelfusion

Da die radioaktive Markierung sich in den Akzeptorvesikeln befindet, die nicht durch Biotin-PE aus der Lösung gezogen werden, entspricht ein Wert von 100% der eingesetzten Radioaktivität im Pellet einem Wert von 100% Vesikelfusion. Hierbei kann eine Aggregation von Vesikeln nicht ausgeschlossen werden.

Da der neutrale pH-Wert für die spezifische Bindung der Biotin-markierten Akzeptorvesikel an die BioMag-Kügelchen eine entscheidende Rolle spielt, wurde die unspezifische Anbindung von Liposomen an die BioMag-Kügelchen durch Kontrolle des pH-Wertes ausgeschlossen. Zusätzlich wurde eine Kontrollmessung durchgeführt, welche ausschließlich Akzeptorvesikel beinhaltete, die dem Assayansatz entsprechend mit BioMag-Kügelchen behandelt wurden (R^{A+B}). Der erhaltene geringe Radioaktivitätswert im Pellet wurde als Hintergrund von den Messwerten abgezogen. Trat bei dieser Kontrollmessung ein hoher Radioaktivitätswert im Pellet auf, so wurde die Messreihe verworfen, da offenbar unspezifische Bindung der Vesikel an die BioMag-Kügelchen erfolgte. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei einem Teil der Vesikel nicht um fusionierte, sondern aggregierte Vesikel handelt.

c) Berechnung der Vesikelfusion / -aggregation

Des Weiteren wurden die folgenden internen Kontrollen und Hintergrundmessungen durchgeführt, welche alle entsprechend des Assayansatzes behandelt wurden. Donorvesikel alleine (R^D , F^D), Akzeptorvesikel alleine (R^A , F^A), Donorvesikel + Akzeptorvesikel (R^{D+B} , F^{D+A}), Donorvesikel mit BioMag-Streptavidin (R^{D+B} , F^{D+B}), Donor- und Akzeptorvesikel + BioMag-Streptavidin (R^{D+A+B} , F^{D+A+B}), Donor- und Akzeptorvesikel + Protein + BioMag[®]-Streptavidin ($R^{D+A+P+B}$, $F^{D+A+P+B}$). Daraus resultierend wurde der prozentuale Anteil der Vesikelfusion bzw. -aggregation wie folgt berechnet: $(R^{D+A+P+B} - R^{A+B}) / [(R^A - R^{A+B}) / 100]$.
 R^A = Radioaktivität der Akzeptorvesikel, R^{A+B} = Radioaktivität im Pellet nach BioMag[®]-Behandlung der Akzeptorvesikel, $R^{D+A+P+B}$ = Radioaktivität im Pellet des Assays.

Bei den Berechnungen wurden Mittelwerte aus mindestens drei Messungen gebildet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt zu jeder Messreihe anhand einer Graphik, welche sich in sechs Abbildungen (A-F) unterteilt. Messungen mit GM2AP sind in blau dargestellt, solche mit rGM2AP-His6 in rot.

3.4.2.3. Erklärung der Auswertungsgraphiken

Abb. 36 zeigt eine schematische Darstellung der zur Auswertung verwendeten Darstellungsformen.

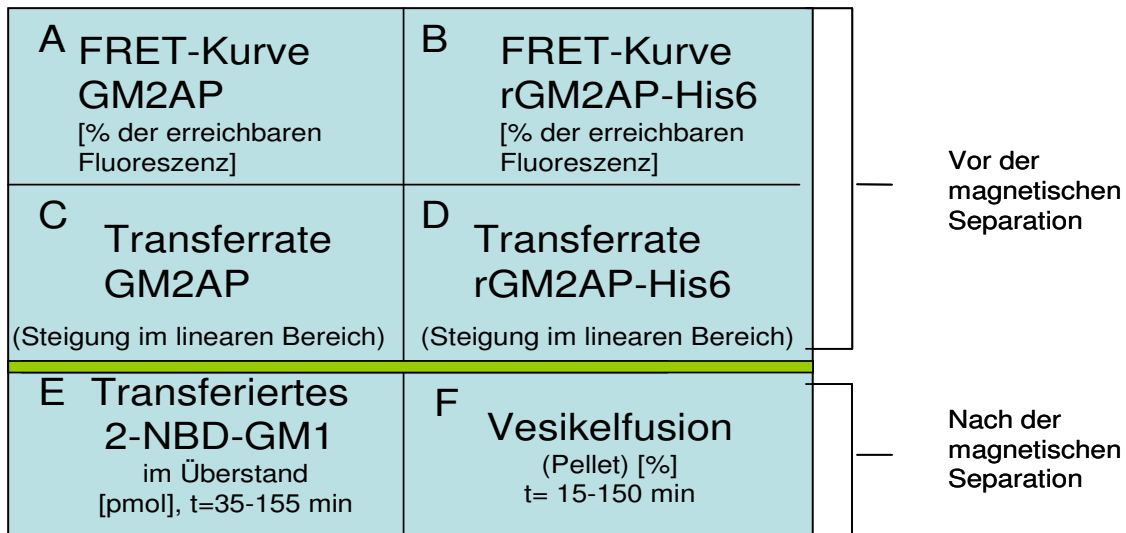


Abbildung 36 : Schematische Darstellung der Auswertungsgraphiken

A stellt die FRET-Messung mit GM2AP dar, B die des rGM2AP-His6. In beiden Fällen wurde „Prozent der in FRET-Assay erreichbaren Fluoreszenz“ gegen die Zeit aufgetragen. In C ist die mit GM2AP gewonnene, abgeschätzte Transferrate in pmol/min angegeben, in D, die des rGM2AP-His6. Die Transferrate wurde aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der FRET-Messung gewonnen. Wurde die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht überschritten, so wird keine Transferrate für die entsprechende Messung angegeben. Grafik E zeigt die nach magnetischer Separation gewonnenen Transferdaten beider Proteine in pmol ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion, Grafik F die Vesikelfusionsdaten in Prozent.

In A und B ist der zeitabhängige Dequench der NBD-Fluoreszenz durch GM2AP (A) bzw. rGM2AP-His6 (B) in Prozent der maximal erreichbaren Fluoreszenz dargestellt. Die minimale Grundfluoreszenz der Donorvesikel und Akzeptorvesikel wurde von den Messwerten abgezogen. Um zu ermitteln wie groß der Dequench bei einer vollständigen Fusion von Donor- und Akzeptorvesikeln wäre, wurden in Näherung Liposomen mit der Lipidzusammensetzung von vollständig fusionierten Vesikeln hergestellt (Extrusion durch 100 nm Poren) und deren Fluoreszenz vermessen. Bei dieser Kontrolle wurde der Einfluss der eventuellen Vesikelvergrößerung bei Fusion auf die auf die ausgesendete NBD-Fluoreszenz vernachlässigt.

Die eingezogene Linie „Basislinie vollständige Fusion“ entspricht dem hierbei gemessenen Fluoreszenzwert und spiegelt die maximal durch Vesikelfusion erreichbare Fluoreszenz wieder. Um die durch Vesikelfusion ausgesendete Fluoreszenz gering zu halten wurde der

Quencher im Überschuss (Verhältnis NBD:Rhodamin = 1:2) zugegeben. Theoretisch müssen demnach Messwerte, die über dieser Linie liegen, durch zusätzlichen Lipidtransfer oder Lipidtransfer alleine hervorgerufen werden.

Zudem muss beachtet werden, dass die Fluoreszenz im FRET-Assay sinkt, wenn Akzeptorvesikel, welche schon transferiertes 2-NBD-GM1 beinhalten, mit Donorvesikeln fusionieren. Dies ist der Fall, da die Fluoreszenz der NBD-Gruppe dann durch das im Überschuss vorhandene Rhodamin-PE gequencht wird.

Mit Hilfe der FRET-Kurven lassen sich Rückschlüsse auf die Kinetik des Reaktionsablaufes ziehen. C und D stellen die Transferrate in „pmol pro Minute“ dar. Der Wert wurde aus dem nahezu linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve gewonnen und dient als Näherungswert zur Abschätzung des stattfindenden Transfers von 2-NBD-GM1. Wurde die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht von der Messkurve überschritten, so wurde von einer Abschätzung der Transferrate abgesehen, da Fluoreszenzwerte die unterhalb dieser Linie liegen theoretisch durch Fusion entstanden sein könnten.

E und F zeigen die Werte nach Beendigung des FRET-Assays und erfolgter magnetischer BioMag[®]-Trennung. Nach der Separation enthält der Überstand nur noch Akzeptorvesikel und das wasserlösliche Protein. Die im Überstand detektierte Fluoreszenz stammt von transferiertem 2-NBD-GM1. In E wird der Transfer von 2-NBD-GM1 in den Überstand am Endpunkt der Messung in pmol dargestellt. Die maximal transferierbare Menge 2-NBD-GM1 beträgt pro Ansatz 171 pmol (6/7 des in der äußeren Membran der Donorvesikel befindlichen 2-NBD-GM1). In dieser Darstellung wurde nur der Überstand, jedoch nicht die pelletierten, eventuell fusionierten Akzeptorvesikel berücksichtigt. Es handelt sich hier um den am Endpunkt nach magnetischer Trennung im Überstand gemessenen Transfer. Die prozentuale Abweichung beträgt ca. +/-10 %.

In F ist die aus den Radioaktivitätsdaten des Pellets gewonnene Vesikelfusion am Endpunkt der Messung in Prozenten dargestellt. Das Pellet besteht aus Donorvesikeln und fusionierten Vesikeln, welche bei der magnetischen Separation pelletiert werden. Die prozentuale Abweichung beträgt auch hier ca. +/- 10 %.

Die Ausnahmen zu dieser Darstellungsform bilden Abb. 37 und Abb. 42. Abb. 37 besteht nur aus vier Graphiken. Dort zeigt A die FRET-Kurve, B die Transferrate, C den Transfer von 2-NBD-GM1 und D die Vesikelfusion. In Abb. 42 bestehen E und F jeweils aus zwei Diagrammen. E zeigt hier den durch GM2AP bewirkten Lipidtransfer und die Vesikelfusion, F enthält die entsprechenden Diagramme des rGM2AP-His6.

Der unter Berücksichtigung der Vesikelfusion aus dem Überstand nach magnetischer Trennung errechnete theoretische Transferwert wird, sofern die Vesikelfusion 40 % nicht überschreitet, am Ende der jeweiligen Messungen angegeben. Dieser Wert kann nur als Näherungswert für den tatsächlich stattfindenden Transfer angesehen werden. Hierbei wird von folgender Situation ausgegangen: Akzeptorvesikel, welche schon 2-NBD-GM1 aufgenommen haben, können auch mit Donorvesikeln fusionieren. Der Lipidtransfer findet auch während und nach der Vesikelfusion statt. Der Transfer nach der Vesikelfusion erfolgt als nicht messbarer Austausch im Gleichgewicht. Akzeptorvesikel, Donorvesikel und fusionierte Vesikel sind für die Aufnahme von 2-NBD-GM1 gleichwertig. Wenn sich nun z.B. die folgenden Messwerte einstellen, Lipidtransfer = 9 %, Vesikelfusion = 50 %, so bedeutet das, dass der gemessene Transfer nur noch die Hälfte der eingesetzten Akzeptorvesikel erfasst, da die restlichen als fusionierte Vesikel aus der Lösung gezogen wurden. Daraus resultiert eine rechnerische Transferrate von $2 \times 9 \%$, was einem Lipidtransfer von 18 % entspricht. Dieser Wert kann wiederum in pmol umgerechnet werden. Für den Fall, dass die Vesikelfusion 40 % überschreitet wird von einer theoretischen Rechnung abgesehen, da die Vesikelfusion hier in den Vordergrund tritt und dadurch die Hochrechnung fehlerhaft würde.

3.4.3 Sowohl GM2AP als auch rGM2AP-His6 transferierte im Assay mit BMP- und Cholesterol-freien Vesikeln (Basisvesikel) 2-NBD-GM1 und vermittelte Vesikelfusion

Zunächst wurden die Eigenschaften des aus Gewebe gereinigten GM2APs und des rekombinanten, im BEVS exprimierten rGM2AP-His6 mit Hexahistidin-Rest im kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay unter Verwendung von Basisvesikeln untersucht.

Die Grundlipidzusammensetzung der Basisvesikel betrug für die Donorvesikel 90 mol% DOPC, 2 mol% 2-NBD-GM1, 4 mol% Rhodamin-PE und 4 mol% Biotin-PE und für die Akzeptorvesikel 99 mol% DOPC und 1 mol% [^{14}C]-PC. In Abb. 33 wird gezeigt, dass weder PE noch PC vom Aktivatorprotein transferiert werden, so dass die Verwendung der oben aufgeführten Markerlipide sinnvoll ist.

Diese Lipidzusammensetzung wurde in den weiteren Messungen durch Ersatz des DOPCs durch unmarkierte Lipide, wie z.B. DO-BMP, variiert. Die Experimente wurden nach einer Vesikelpräinkubationszeit von 5 min bei 28 °C durch Zugabe von GM2AP (1,5 µg) / rGM2AP-His6 (1,5 µg) gestartet. Die Zeitachse der FRET-Kurve in den Abbildungen beginnt daher bei -5 min. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde das Aktivatorprotein zugegeben. Durch die

fünfminütige Präinkubationszeit konnte gezeigt werden, dass die Vesikel nicht schon ohne Proteinzugaben miteinander wechselwirkten und es hier noch nicht zu einem Dequench der NBD-Fluoreszenz kam. Als Puffer wurde 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2 verwendet. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzzunahme im FRET-Assay bei rGM2AP-His6 schneller verläuft und einen höheren Endpunkt erreicht als bei GM2AP (Abb. 37 A). In Abb. 37 B ist nur die Transferrate des rGM2AP-His6 dargestellt, da diese Messkurve oberhalb der „Basislinie vollständige Fusion“ verläuft. Die Transferrate wurde aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve wie in 3.4.2 beschrieben kalkuliert und dient als Wert für die Abschätzung des Lipidtransfers. Für GM2AP wird keine Transferrate angegeben, da hier die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht überschritten wird.

Nach der BioMag-Trennung in Überstand und Pellet war die von GM2AP transferierte Menge an 2-NBD-GM1 im Überstand mit 14,7 pmol deutlich höher als die von rGM2AP-His6 transferierte mit 9,7 pmol (Abb. 37 C). Es handelt sich hier um die reinen Messwerte ohne Berücksichtigung der stattfindenden Vesikelfusion. Die Vesikelfusion ist in beiden Fällen am Endpunkt der Messung mit ca. 90 % sehr hoch (Abb. 37 D). Da die nahezu ungeladenen Liposomen sich nicht abstoßen ist die Fusion hier erleichtert.

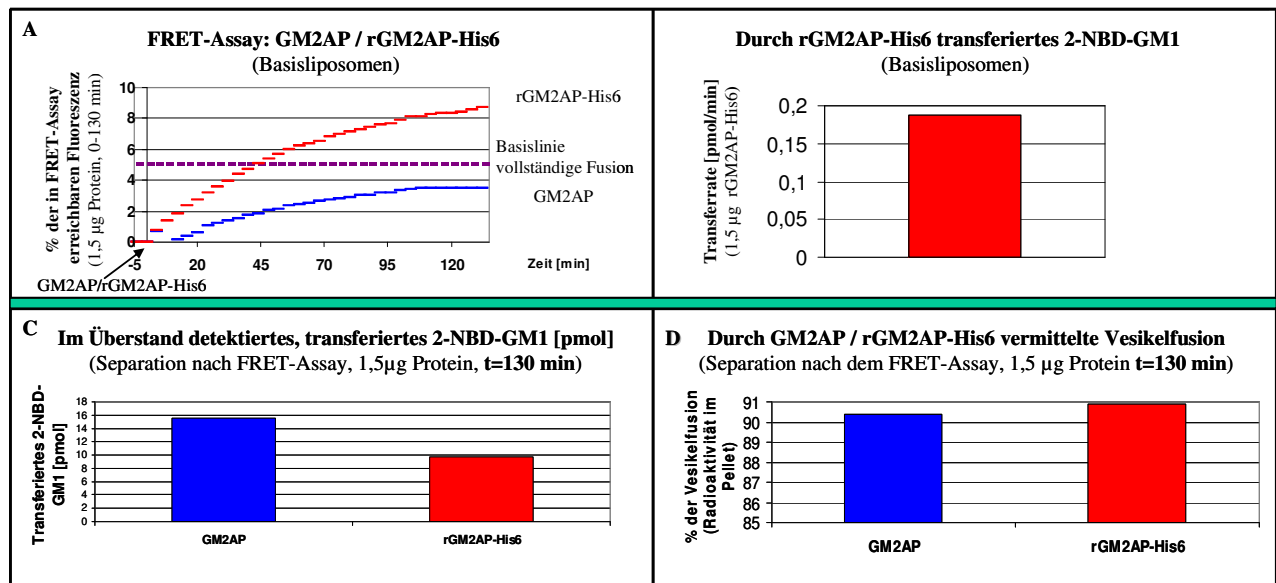


Abbildung 37: GM2AP und rGM2AP-His6 transferieren beim Einsatz BMP- und Cholesterolfreier Vesikel 2-NBD-GM1 und vermitteln Vesikelfusion

Kombinierter Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 0 mol% Cholesterol und 0 mol% BMP. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay. Bei rGM2AP-His6 wurde ein schnellerer Fluoreszenzanstieg beobachtet. Zudem wurde nach Einstellung des Gleichgewichtes eine höhere Fluoreszenz erreicht. (B) Darstellung der aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve abgeschätzten Transferrate des rGM2AP-His6. Da die FRET-Kurve des GM2APs die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht überschritt, wurde hier von einer Abschätzung der Transferrate abgesehen.

(C) Nach der FRET-Messung (0-135 min) und anschließender magnetischer Trennung im Überstand detektiertes, transferiertes 2-NBD-GM1. Es handelt sich hier um die unkorrigierten Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. GM2AP transferierte eine größere Menge 2-NBD-GM1 als rGM2AP-His6.

(D) Am Ende des FRET-Assays gemessene Vesikelfusion, die nach der magnetischen Separation aus den pelletierten Vesikeln bestimmt wurde.

Da die Vesikelfusion in beiden Fällen mehr als 90% betrug wurde von einer Hochrechnung der transferierten 2-NBD-GM1-Menge aus den Messwerten des Überstandes unter Berücksichtigung der Vesikelfusion abgesehen.

3.4.4 Kontrolle mit Hexahistidin-Peptid (His6)

Um beurteilen zu können, inwieweit die beobachteten fusogenen Eigenschaften des rGM2AP-His6 und seine beschleunigende Wirkung auf die Fluoreszenzfreesetzung im FRET-Assay auf dem Hexahistidin-Rest beruhen, wurden Messungen mit einem synthetischen Hexahistidin-

Peptid (His6) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Hexahistidin-Peptid sich an Liposomen anlagerte (Abb. 38 C), jedoch keine Fluoreszenzerhöhung im FRET (Abb. 38 A), keinen Lipidtransfer (Abb. 38 B) und keine Vesikelfusion (Daten nicht abgebildet) vermittelte. Somit war die in den Assays beobachtete Wirkung des rGM2AP-His6 auf einer Kombination der GM2AP-Wirkung und der elektrostatischen, adsorbierenden Wirkung des Hexahistidin-Peptides begründet.

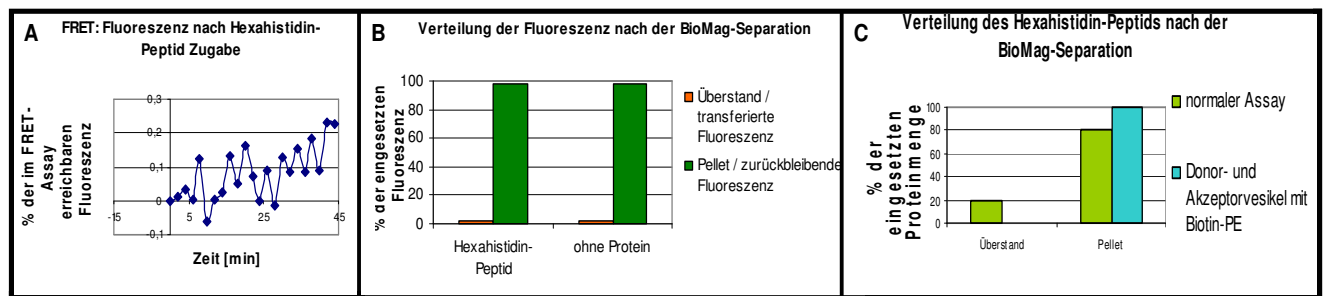


Abbildung 38: Hexahistidin-Peptid erzeugt weder Fluoreszenzanstieg im FRET-Assay noch Vesikelfusion.

Die Vesikel hatten Grundlipidzusammensetzung mit 20 mol% DO-BMP und 20 mol% Cholesterol. (A) FRET-Messung: Die Zugabe von Hexahistidin-Peptid (3 µg) zeigte keine Fluoreszenzerhöhung im FRET-Assay. (B) Die Verteilung der Fluoreszenz in Ansätzen mit Hexahistidin-Peptid und ohne Proteinzugabe war nach magnetischer Separation identisch. Die Fluoreszenz wurde komplett im Pellet gefunden. Es fand kein Lipid-Transfer statt. (C) Vergleich der Proteinverteilung nach BioMag-Trennung, zum einen nach dem normal durchgeführten Assay, zum anderen nach einem Assay in dem beide Vesikelarten mit Biotin-PE markiert waren. Wurden hier sowohl Donorvesikel, als auch Akzeptorvesikel aus der Lösung gezogen, so war im Überstand kein Protein mehr detektierbar. Das Hexahistidin-Peptid lag demnach an die Vesikel gebunden vor.

3.4.5 Zusatz von DO-BMP (20 mol%) zu der Präparation der Basisvesikel steigert den Transfer von 2-NBD-GM1 und verringert die Vesikelfusion durch beide Proteinpräparate

Das Experiment wurde nach einer 5 minütigen Inkubationszeit der Vesikel bei 28 °C durch Zugabe des LLBP gestartet. Der Puffer war 50 mM Natriumcitrat, 113 mM NaCl, pH 4,2. DO-BMP (20 mol%) beschleunigte, im Vergleich mit DO-PC-Vesikeln, bei GM2AP und rGM2AP-His6 die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und erhöhte die im FRET-Assay gemessene Fluoreszenz im Fall von GM2AP von 4 % auf 16 % bzw. bei rGM2AP-His6 von 10 % auf 21 % (Abb. 39 A / B).

Im Fall des rGM2AP-His6 war die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung im FRET höher als bei GM2AP und es wurde am Endpunkt der Messung eine etwas höhere Fluoreszenz erreicht (Abb. 39 A/B). Hierfür schien der bei pH 4,2 6-fach positiv geladene Hexahistidin-Rest verantwortlich zu sein, da er den einzigen Unterschied zwischen den Präparaten darstellte. Die positive Ladung des Hexahistidin-Restes schien durch

elektrostatische Interaktion mit dem negativ geladenen BMP die Anlagerung des rGM2AP-His6s an die Vesikeloberfläche zu beschleunigen. Besonders deutlich wurde dieses bei Betrachtung der, aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve abgeschätzten, Transferrate (Abb. 39 C / D). Ohne BMP wird die Basislinie bei Verwendung von 1,5 µg GM2AP nicht durchbrochen, so dass keine Abschätzung der Transferrate vorgenommen werden kann. Mit 20 mol% DO-BMP in den Vesikeln wird eine Transferrate von 0,3 pmol pro Minute erreicht. Bei Verwendung von 1,5 µg rGM2AP-His6 (Abb. 39 D), steigt die abgeschätzte Transferrate durch DO-BMP-Zugabe von 0,25 auf 5,5 pmol/min. Die Reaktion fand demnach bei beiden Proteinpräparaten mit DO-BMP sehr viel schneller statt.

Die Abbildungen 39 E und F zeigen die Daten nach der BioMag-Trennung. Der nach der magnetischen Separation detektierte Transfer von 2-NBD-GM1 in den Überstand wurde bei beiden Präparaten durch DO-BMP erhöht (Abb. 39 E). Es handelt sich hier um die reinen Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. Die Vesikelfusion war im Vergleich zu reinen DOPC-Liposomen herabgesetzt (Abb. 39 F). Im Falle von GM2AP erhöhte sich die am Endpunkt der Messung im Überstand vorliegende Menge an 2-NBD-GM1 von 15,4 pmol auf 37,2 pmol. Auch ohne BMP war die am Ende des Assays im Überstand detektierte Menge an 2-NBD-GM1 bei GM2APs höher als die von rGM2AP-His6. Dieses war wahrscheinlich in einer verstärkten Induktion von Vesikelaggregation und -fusion durch das Protein mit Hexahistidin-Rest begründet. Dadurch wurde ein Großteil der Akzeptorvesikel aus der Lösung gezogen und war im Überstand nicht mehr detektierbar (Abb. 39 F). Bei DO-BMP-haltigen Vesikeln war die durch GM2AP vermittelte Vesikelfusion stark von 90,3 % auf 40,9 %, die durch rGM2AP-His-6 von 90,81 % auf 84,6 % herabgesetzt. Die unterschiedlich starke Vesikelfusion mit und ohne BMP scheint in der negativen Ladung des BMPs begründet zu sein. BMP-haltige Vesikel sind bei pH 4,2 negativ geladen und stoßen sich daher gegenseitig ab, so dass Aggregation und somit auch Fusion erschwert werden.

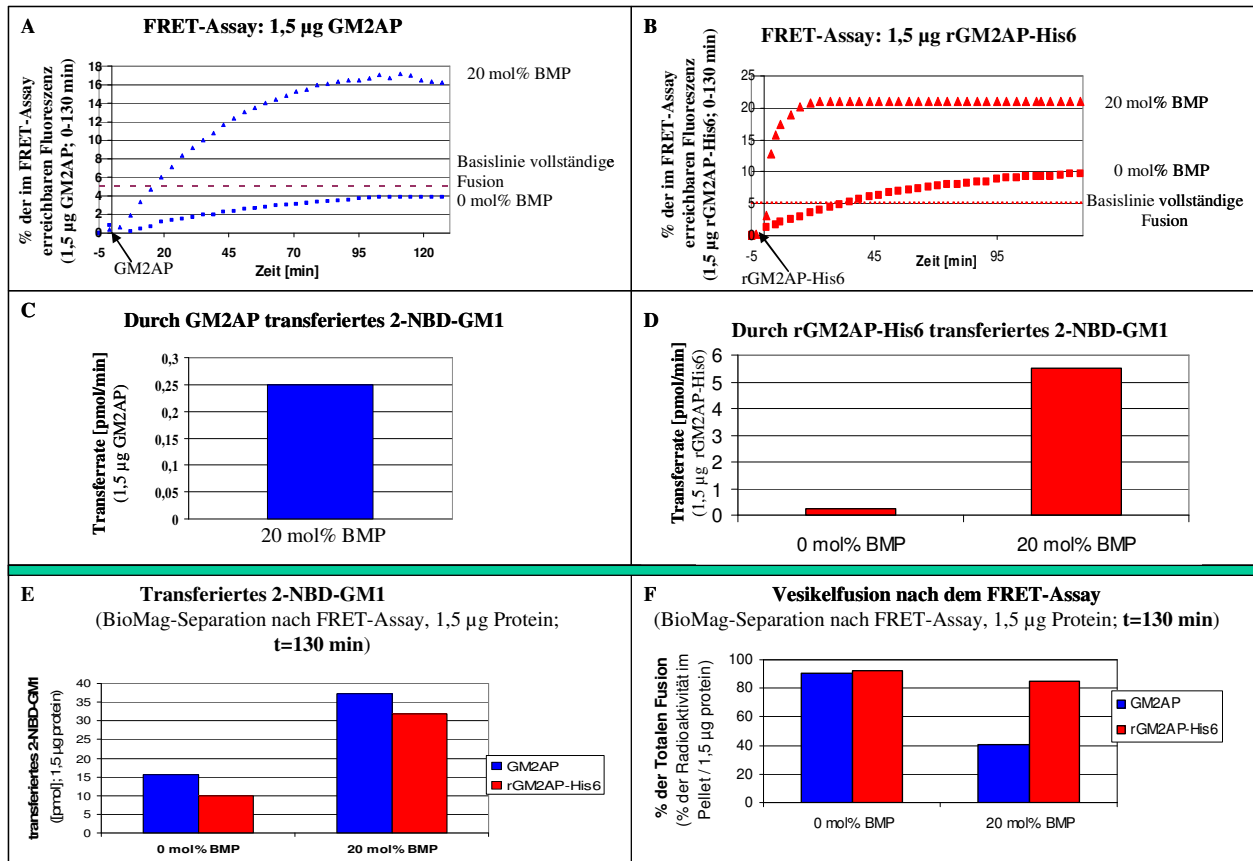


Abbildung 39: In Abwesenheit von Cholesterol wurde bei beiden Präparaten durch DO-BMP die im Überstand detektierte Menge an 2-NBD-GM1 erhöht und die Vesikelfusion herabgesetzt

Kombinierter Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 0 mol% Cholesterol und 0-20 mol% DO-BMP. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay (0 mol% DO-BMP:■, 20 mol% DO-BMP:▲). Bei rGM2AP-His6 wurde ein schnellerer Fluoreszenzanstieg beobachtet. DO-BMP (20 mol%) beschleunigte in beiden Fällen die Reaktion und erhöhte die detektierte Endpunktfluoreszenz.

(C)/(D) Darstellung der aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der oberhalb der „Basislinie vollständige Fusion“ liegenden Kurven abgeschätzten Transferraten. Unter Verwendung von Basisvesikeln ohne BMP und GM2AP wird die Basislinie nicht durchbrochen und daher keine Transferrate angegeben. Die Transferrate wird durch DO-BMP in den Vesikeln bei beiden Präparaten erhöht.

(E) In den Überstand transferiertes 2-NBD-GM1 nach der FRET-Messung (0-130 min) und magnetischer Trennung. Es handelt sich um die Darstellung der reinen Messwerte ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. Bei GM2AP wurde eine größere Menge 2-NBD-GM1 im Überstand detektiert als bei rGM2AP-His6. DO-BMP (20 mol%) erhöhte diesen Transfer in beiden Fällen. (F) Nach Beendigung der FRET-Messung und erfolgter magnetischer Separation vorliegende Vesikelfusion. Durch DO-BMP (20 mol%) wurde im Vergleich zu DOPC-Vesikeln besonders die Fusionsrate des GM2APs stark herabgesetzt.

Wurde die 2-NBD-GM1-Menge der fusionierten Akzeptorvesikel mit einbezogen, so ergaben sich für das transferierte 2-NBD-GM1 im Falle von GM2AP folgender rechnerische Transferwert bei DO-BMP-haltigen Vesikeln: 64 pmol (Inkubationszeit: 135 min). Im Falle der anderen Messungen war die Vesikelfusion so hoch, dass von einer Berechnung der theoretischen Transferrate abgesehen wurde.

3.4.6 Im Vergleich zu Basisvesikeln wurde bei Vesikeln mit Cholesterol (20 mol%) bei beiden Präparaten der Transfer von 2-NBD-GM1 erhöht und die Vesikelfusion verringert

Im Vergleich zu Cholesterol- und BMP-freien Basisvesikeln erhöhte Cholesterol (20 mol%) die im FRET-Assay erreichte Fluoreszenz (Abb. 40 A/B). Dieses war darin begründet, dass bei Vesikeln ohne BMP und Cholesterol die Fusionsneigung sehr hoch ist und somit Vesikelfusion das vorherrschende Ereignis ist (Abb. 40 D). Die Fluoreszenzfreisetzung lief vor allem in Gegenwart von GM2AP mit Cholesterol schneller ab als ohne.

Cholesterol beschleunigte die bei Basisvesikeln nicht abschätzbare Transferrate von GM2AP auf 0,26 pmol pro Minute (Abb. 40 C) und die von rGM2AP-His6 von 0,24 auf 5,13 pmol pro Minute (Abb. 40 D).

Abbildung 42 E und F zeigen die Daten nach der magnetischen Separation. Der nach magnetischer Separation detektierte Transfer von 2-NBD-GM1 in den Überstand wurde durch 20 mol% Cholesterol leicht erhöht (Abb. 40 E). Beim Einsatz von 1,5 µg GM2AP stieg die Menge an 2-NBD-GM1 von 14,4 pmol auf 16,2 pmol, im Falle von rGM2AP-His6 von 9,4 pmol auf 12,2 pmol. Es handelt sich hier um die unkorrigierten Messwerte ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion.

Die Vesikelfusion wurde im Vergleich zu reinen DOPC-Liposomen herabgesetzt (Abb. 40 F). Dieses war besonders bei GM2AP der Fall. Die Fusion wurde hier durch das Vorhandensein von Cholesterol um 50% reduziert, während durch den Hexahistidin-Rest des rGM2AP-His6 die Vesikelfusion weiterhin begünstigt wurde (Abb. 40 F).

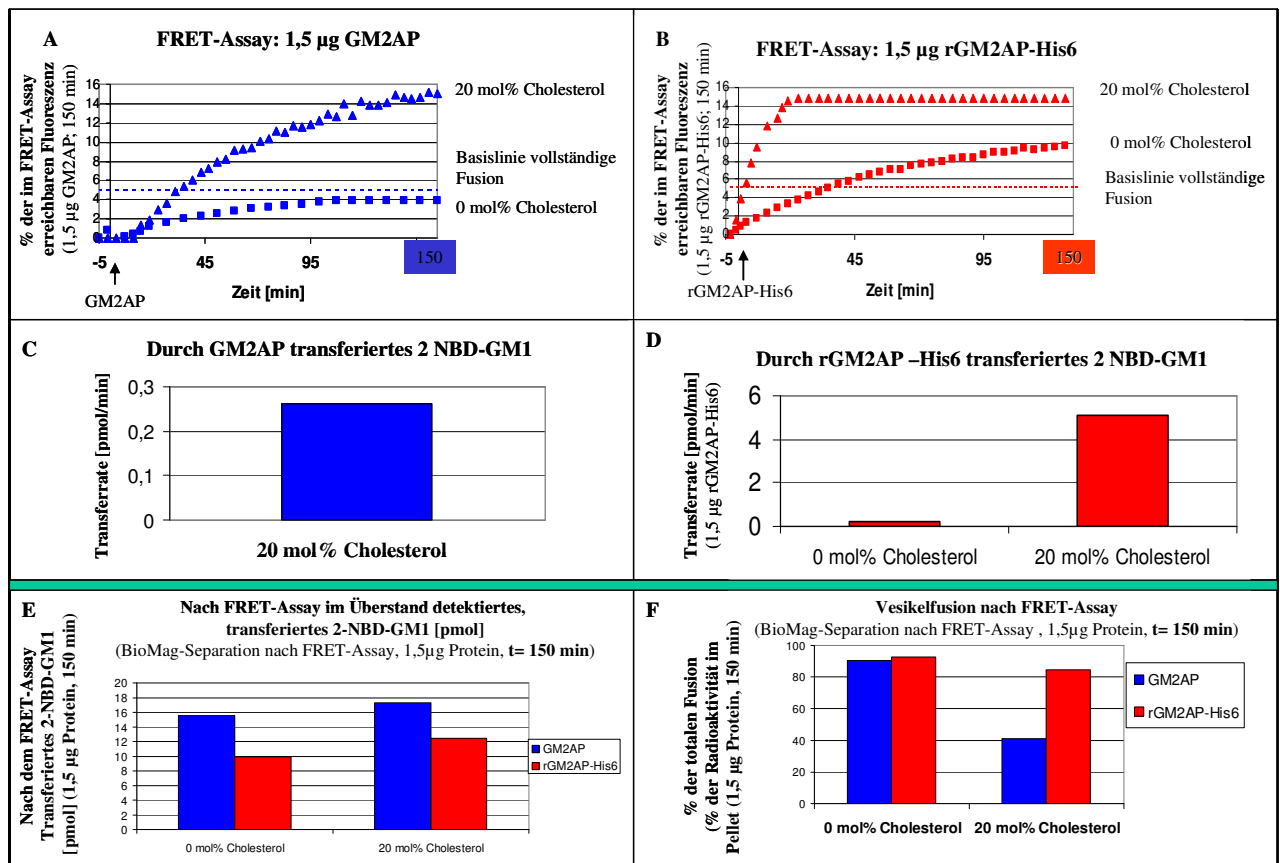


Abbildung 40: In Abwesenheit von DO-BMP erhöhte Cholesterol den Transfer in den Überstand und setzte die Vesikelfusion herab

Kombinierter Lipidtransfer und Membranfusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 0 mol% DO-BMP und 0-20 mol% Cholesterol. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay (0 mol% Cholesterol ■, 20 mol% Cholesterol: ▲). Bei rGM2AP-His6 wurde ein schnellerer Fluoreszenzanstieg beobachtet. Cholesterol (20 mol%) beschleunigte die Reaktion und erhöhte die detektierte Endfluoreszenz. (C)/(D) Darstellung der im annähernd linearen Anfangsbereich der FRET-Kurven abgeschätzten Transferrate. Cholesterol erhöhte die Transferrate bei beiden Präparaten. Da die Basislinie bei Verwendung von GM2AP und Basisliposomen nicht durchbrochen wurde wurde hier keine Transferrate angegeben. (E) Transferiertes 2-NBD-GM1 nach der FRET-Messung (0-150 min) und anschließender magnetischer Trennung. Cholesterol (20 mol%) erhöhte die Menge des im Überstand detektierten 2-NBD-GM1. Es handelt sich hier um die reinen Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. (F) Am Ende der FRET-Messung nach magnetischer Separation vorliegende Vesikelfusion.

Wurde die theoretische Transferrate aus dem Messwerten nach der magnetischen Separation unter Berücksichtigung der Vesikelfusion berechnet, so ergab sich für GM2AP nach 150 min

im Falle von Cholesterol-haltigen, BMP-freien Vesikeln ein Transferwert von 29,3 pmol. Da bei den weiteren Messungen die Vesikelfusion das vorherrschende Ereignis war, wurde hier von einer Berechnung der theoretischen Transferrate abgesehen.

3.4.7 In Anwesenheit von DO-BMP senkte Cholesterol den Transfer von 2-NBD-GM1 durch GM2AP und rGM2AP-His6 und erhöht die Vesikelfusion

In Anwesenheit von Dioleoyl-BMP (20 mol%) setzte Cholesterol die im FRET-Assay unter Zugabe von GM2AP oder rGM2AP-His6 detektierte Fluoreszenz herab (Abb. 41 A / B). Der Transfer von 2-NBD-GM1 war nach der magnetischen Separation herabgesetzt (Abb. 41 E), die Vesikelfusion erhöht (Abb. 41 F).

Im Falle von GM2AP und rGM2AP-His6 setzte ein Cholesterolgehalt von 10 mol% in DO-BMP-haltigen Vesikeln die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung im FRET-Assay, im Vergleich zu BMP-haltigen Vesikeln ohne Cholesterol, herab. Erhöhung des Cholesterolgehaltes auf 20 mol% setzte die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung weiter herab und senkte Endpunktfluoreszenz (Abb. 41 A / B). Dieses ist der Fall, da durch den Cholesterolgehalt die Vesikelfusion zunimmt (Abb. 41 E) und bei steigender Fusion die detektierbare Fluoreszenz im FRET sinkt, da die NBD-Fluoreszenz in fusionierten Vesikeln vollständig gequencht wird.

Somit schien Cholesterol die Interaktion des GM2APs mit seinem Bindungspartner in Anwesenheit von DO-BMP herabzusetzen und die Fusion zu erhöhen.

Der Endzustand stellte sich bei rGM2AP-His6 (25 min) sehr viel schneller ein als bei GM2AP (155 min). Dieses wurde besonders durch die, aus dem nahezu linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve abgeschätzte, Transferrate der Reaktionen deutlich (Abb. 41 C / D). Der Hexahistidin-Rest schien die Anlagerung des Proteins an die Oberfläche von DO-BMP-haltigen Vesikeln durch elektrostatische Interaktion zu beschleunigen.

Im Falle von GM2AP setzte die Erhöhung des Cholesterolgehaltes von 0 mol% über 10 mol% auf 20 mol% in DO-BMP-haltigen Vesikeln unter Verwendung von 1,5 µg Protein die im linearen Bereich der FRET-Kurve abgeschätzte Transferrate von 1,37 pmol über 1,03 pmol auf 0,29 pmol pro Minute herab (Abb. 41 C). Bei rGM2AP-His6 zeigte sich durch diese Abschätzung die höchste Transferrate von 34,2 pmol pro Minute bei 10 mol% Cholesterol (Abb. 41 D).

Abb. 41 E und F zeigen die Daten nach der magnetischen Trennung. Bei DO-BMP-haltigen Vesikeln wurde durch hohen Cholesterolgehalt (20 mol%) der im Überstand detektierbare

Transfer von 2-NBD-GM1 im Fall von GM2AP von 37,6 pmol auf 20,7 pmol herabgesetzt. Der detektierbare Transfer ist bei GM2AP grundsätzlich höher als bei rGM2AP-His6 (Abb. 41 E), da rGM2AP-His6 starke Vesikelfusion vermittelt. Hier wurde der Transfer von 32 pmol auf 15 pmol herabgesetzt. Es handelt sich hier um die unkorrigierten, reinen Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion.

Die Fusion von Vesikeln mit einem DO-BMP-Gehalt von 20 mol% wurde durch Cholesterolzugabe erhöht. Dieses zeigt sich besonders bei GM2AP, wo eine Erhöhung von 41 % auf 93 % eintrat. Zudem war die Vesikelfusion bei rGM2AP-His6 grundsätzlich erhöht (Abb. 41 F).

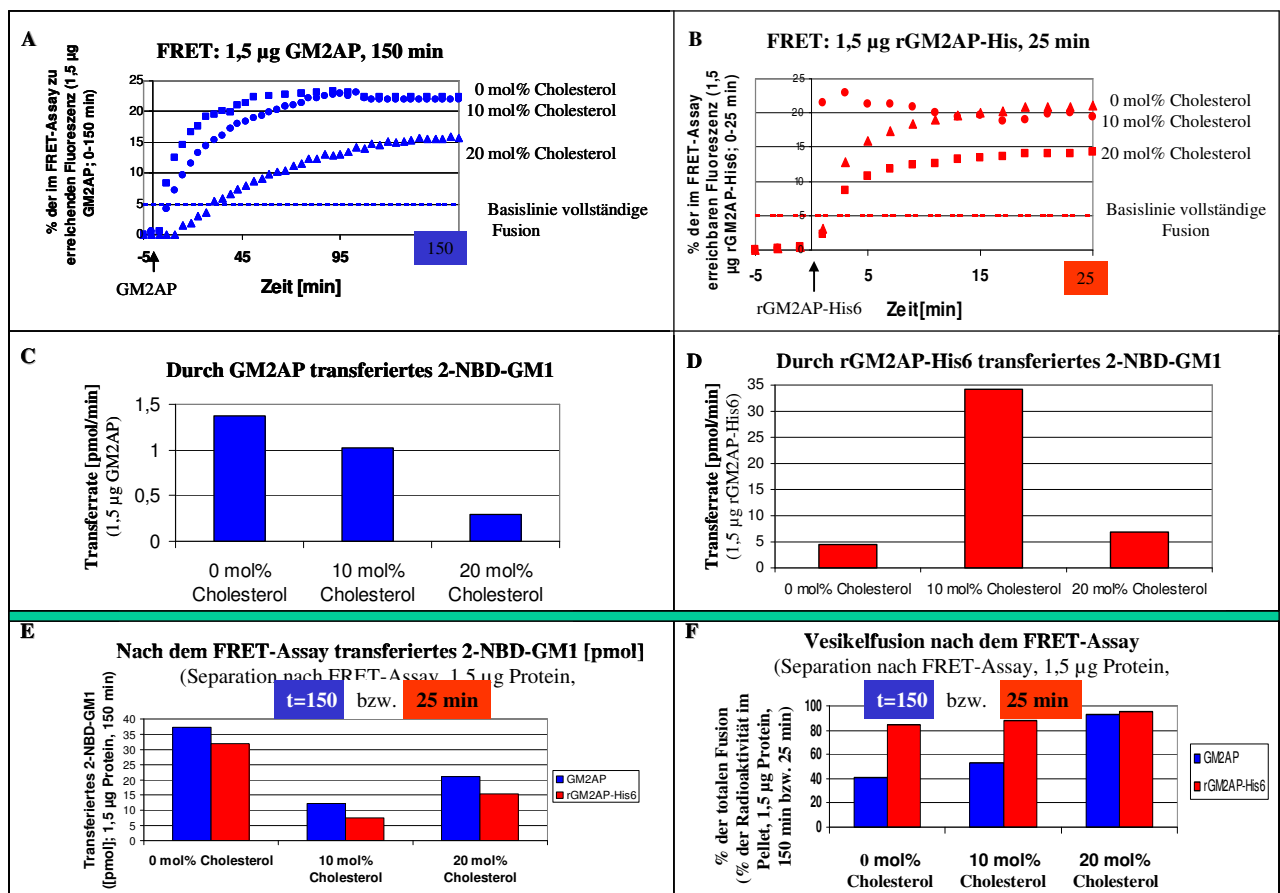


Abbildung 41: In Anwesenheit von DO-BMP setzte Cholesterol (20 mol%) den Transfer von 2-NBD-GM1 in den Überstand herab und erhöhte die Vesikelfusion.

Kombinierter FRET-BioMag-Transfer-Fusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 20 mol% DO-BMP und 0-20 mol% Cholesterol. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay (0 mol% Cholesterol ■, 10 mol% Cholesterol ● und 20 mol% Cholesterol ▲). Bei rGM2AP-His6 wurde ein schnellerer Fluoreszenzanstieg beobachtet. Cholesterol (20 mol%) verlangsamte die Reaktion und senkte die detektierte Fluoreszenz.

(C)/(D) Darstellung der Transferrate beider Reaktionen. Die Transferrate wurde aus dem annähernd linearen Anfangsbereich der Messkurve abgeschätzt. (E) Nach der FRET-Messung (0-150 min GM2AP, 0-25 min rGM2AP-His6) und erfolgter BioMag[®]-Separation in den Überstand transferiertes 2-NBD-GM1. Cholesterol (20 mol%) senkte die Menge des im Überstand detektierten 2-NBD-GM1. Es handelt sich hier um die reinen Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. (F) Nach der BioMag-Trennung im Anschluss an die FRET-Messung vorliegende Vesikelfusion. Die durch GM2AP hervorgerufene Vesikelfusion war grundsätzlich geringer als die durch rGM2AP-His6 vermittelte.

Wegen der hier sehr dominanten Vesikelfusion konnten für rGM2AP-His6 aus dem Messdaten nach magnetischer Separation keine theoretischen Transferdaten berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Vesikelfusion ergaben sich die folgenden rechnerisch ermittelten Werte für den Lipidtransfer durch GM2AP nach 155 min: 0 mol% Cholesterol, 62 pmol, 10 mol% Cholesterol: 24,4 pmol. Für 20 mol% Cholesterol konnten auf Grund der hohen Vesikelfusion kein Wert berechnet werden.

3.4.8 In Gegenwart von Cholesterol steigerte DO-BMP beim GM2AP die Vesikelfusion

Bei Verwendung von Vesikeln mit unterschiedlicher DO-BMP-Konzentration und 20 mol% Cholesterol zeigte sich unter Zugabe von GM2AP und rGM2AP-His6, dass die Erhöhung der DO-BMP-Konzentration die Freisetzung von Fluoreszenz im FRET-Assay beschleunigte und die detektierte Fluoreszenz erhöhte (Abb. 42 A / B). Diese Effekte waren bei rGM2AP-His6 stärker als bei GM2AP.

Eine BMP-Konzentration von 10 mol% DO-BMP erhöhte die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und die in FRET-Assay detektierte Fluoreszenz beim GM2AP und rGM2AP-His6 (Abb. 42 A/B). Wurde der DO-BMP-Gehalt der Vesikel auf 20 mol% erhöht stieg die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung bei beiden Präparaten weiter an, jedoch war nur bei rGM2AP-His6 die am Endpunkt erreichte Fluoreszenz erhöht (Abb. 42 A/B). Bei rGM2AP-His6 stellte sich das Gleichgewicht nach 25 Minuten bei allen BMP-Konzentrationen sehr viel schneller ein als beim GM2AP (155 min). Die BMP-abhängigen Effekte traten hier stärker hervor (Abb. 42 B).

In Abbildung 42 C und D sind die Transferraten der Reaktionen dargestellt, welche aus dem fast linearen Anfangsbereich der FRET-Kurve abgeschätzt wurden. Beim GM2AP wurde die Transferrate unter Verwendung von 1,5 µg Protein durch Steigerung der BMP-Konzentration

von 0,28 über 0,855 auf 1,71 pmol pro Minute erhöht (Abb. 42 C). Dies sprach dafür, dass das negativ geladene BMP die Interaktion des GM2APs mit der Vesikeloberfläche verbesserte. Beim rGM2AP-His6 war der Einfluss des BMP deutlich verstärkt (Abb. 42 D). Ein DO-BMP-Gehalt von 10 mol% erhöhte die Transferrate von 0,66 auf 8,55 pmol pro Minute, 20 mol% DO-BMP beschleunigten die Transferrate auf 25,6 pmol pro Minute.

Abbildung 42 E und F zeigen die Daten am Endpunkt nach der magnetischen Trennung. Steigender Anteil von DO-BMP in den vesikulären Membranen erhöhte die im Überstand detektierte Fluoreszenz nur leicht (Abb. 42 E). Es handelt sich hier um die reinen Messdaten. Die Vesikelfusion wurde nicht berücksichtigt. Die Menge an im Überstand detektiertem 2-NBD-GM1 war im Falle von GM2AP bei allen BMP-Konzentrationen höher als die von rGM2AP-His6. Dieses schien in einer erhöhten Fusionsneigung durch den Hexahistidin-Rest begründet.

Da sich die Endpunktdaten nach magnetischer Separation mit rGM2AP-His6 bei allen Messungen stark von denen des GM2APs aus Gewebe (ohne Hexahistidin-Rest) unterschieden, wurden hier zwischenzeitlich Aliquots des Ansatzes abgestoppt und magnetische Trennungen nach fünf und 10 Minuten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die im Überstand detektierte Menge von 2-NBD-GM1 bei rGM2AP-His6 bei allen BMP-Konzentrationen nach 10 Minuten am höchsten war und annähernd mit den Endpunkt-Transferdaten des Hexahistidin-Rest-freien Proteins nach 155 min übereinstimmte. Am Endpunkt von 25 Minuten überwog das Fusionsereignis und der Transfer erschien gering (Abb. 42 F).

Es zeigte sich, dass durch DO-BMP bei Vesikeln mit 2-NBD-GM1 und Cholesterol (20 mol%) die durch GM2AP vermittelte Vesikelfusion verstärkt wurde (Abb. 42 E). In Gegenwart von rGM2AP-His6 wurde dieser Effekt nicht so stark deutlich da hier die Fusionsrate auch in Abwesenheit von BMP sehr hoch war (Abb. 42 F). Das die Fusionsneigung des rGM2AP-His6s auch in Abwesenheit von BMP stärker als die des GM2APs war, konnte wiederum durch elektrostatische Interaktion des positiv geladenen Hexahistidin-Restes mit negativ geladenen Vesikellipiden begründet werden, da das in den Vesikeln enthaltene Biotin-PE bei pH 4,2 negativ geladen ist und 2-NBD-GM1 zudem negative Ladung trägt.

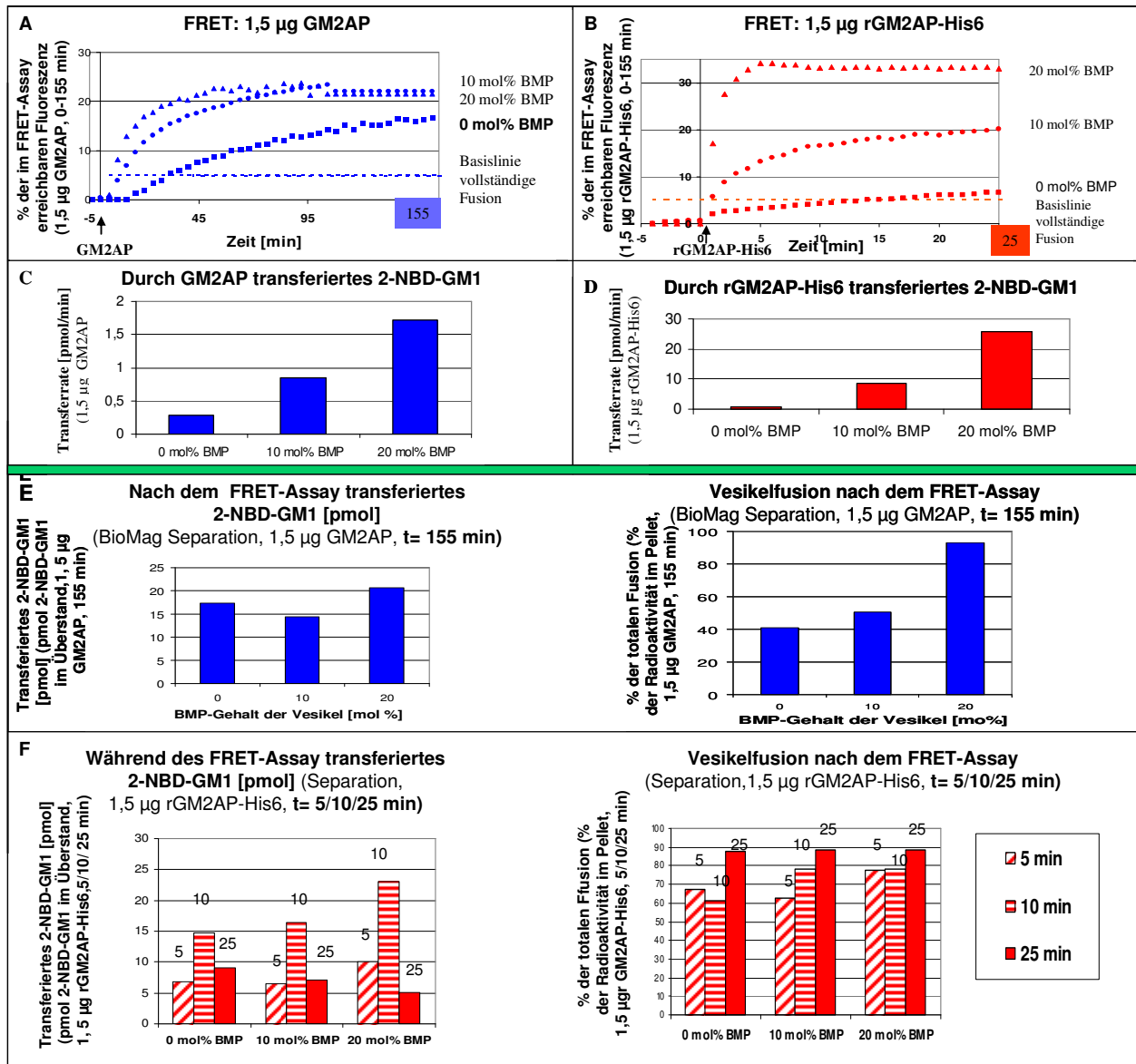


Abbildung 42: In Gegenwart von Cholesterol steigerte DO-BMP die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und die Endfluoreszenz im FRET-Assay

Kombinatorischer Transfer-Fusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 20 mol% Cholesterol und 0-20 mol% DO-BMP. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay (0 mol% DO-BMP ■, 10 mol% DO-BMP: ● und 20 mol% DO-BMP ▲). In Gegenwart von Cholesterol (20 mol%) steigerte die Zugabe von 10 mol% DO-BMP die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und die Endpunktfluoreszenz im FRET. Im Falle von GM2AP wurde durch weitere Erhöhung der BMP-Konzentration die Fluoreszenzfreisetzung weiter beschleunigt, aber die am Endpunkt gemessene Fluoreszenz nicht beeinflusst (A). Beim rGM2AP-His6 hingegen wurde durch weitere Erhöhung der BMP-Konzentration nicht nur die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung erhöht, sondern auch die erreichte Fluoreszenz (B). Der Einfluss des BMPs war bei

rGM2AP-His6 deutlich stärker als bei GM2AP. (C)/(D) Darstellung der aus dem nahezu linearen Anfangsbereich der Messkurve abgeschätzten Transferrate beider Reaktionen. Steigender DO-BMP-Gehalt steigerte bei Cholesterol-haltigen Vesikeln bei beiden Proteinpräparaten den Transfer von 2-NBD-GM1. (E) Durch GM2AP nach der FRET-Messung (155 min) und erfolgter BioMag-Trennung in den Überstand transferiertes 2-NBD-GM1 (Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion) und vorliegende Vesikelfusion. Cholesterol (20 mol%) erhöhte die Menge an im Überstand detektiertem 2-NBD-GM1 und setzte die Vesikelfusion herab. (F) Durch rGM2AP-His6 in den Überstand transferiertes 2-NBD-GM1 während und nach der FRET-Messung (0-5 min, 0-10 min, 0-25 min, Messwerte ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion), sowie parallel auftretende Vesikelfusion (0-5 min, 0-10 min, 0-25 min, Daten alle nach magnetischer Trennung). Die Menge an durch rGM2AP-His6 in den Überstand transferiertem 2-NBD-GM1 war bei allen BMP-Konzentrationen nach 10 Minuten am höchsten und mit den am Endpunkt der Messung im Überstand detektierten Werten des Proteins ohne Hexahistidin-Rest vergleichbar. Nach 25 Minuten überwog das Fusionsereignis und der Transfer erschien gering.

Unter Berücksichtigung der Vesikelfusion ergaben sich, nach einer Reaktionszeit von 155 Minuten und erfolgter magnetischer Separation, die folgenden rechnerisch ermittelten Transferwerte für GM2AP (1,5µg): 0 mol% DO-BMP: 28,95 pmol, 10 mol% DO-BMP: 29,14 pmol. Der Transfer von 2-NBD-GM1 wurde demnach, im Falle von GM2AP, in Anwesenheit von Cholesterol durch BMP auch nach der Hochrechnung erhöht.

Wegen der vorherrschenden Vesikelfusion wurde von einer Hochrechnung der Daten des rGM2AP-His6 und des 20 mol%-Wertes des GM2APs abgesehen. Jedoch können die Daten für die Transferwerte nach 10 min grob abgeschätzt werden. Hierbei zeigt sich, dass durch die starke Fusion ein großer Teil des transferierten 2-NBD-GM1 aus der Lösung gezogen werden könnte: 0 mol% DO-BMP: 37,8 pmol, 10 mol% DO-BMP: 77 pmol, 20 mol% DO-BMP: 101,5 pmol.

3.4.9 Verringerung der Ionenstärke führte bei GM2AP zu einer Erhöhung der Vesikelfusion

Die Verringerung der Ionenstärke führte beim GM2AP zu einer dramatischen Verlangsamung der Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und einem massiven Abfall der im FRET-Assay erreichten Fluoreszenz von 16% auf 4% (Abb. 43 A). Die Vesikelfusion nach magnetischer Separation war verstärkt (Abb. 43 F) und somit die detektierte Fluoreszenz im FRET-Assay durch Quench der NBD-Fluoreszenz in den fusionierten Vesikeln herabgesetzt. Unter Verwendung von 1,5 µg GM2AP wurde die Transfargeschwindigkeit des GM2APs durch das Absenken der Ionenstärke von 2,28 pmol pro Minute so stark herabgesetzt, dass die FRET-Kurve unterhalb der „Basislinie vollständige Fusion“ verlief und somit keine Transferrate abgeschätzt werden konnte (Abb. 43 C).

Beim rGM2AP-His6 zeigte sich bei niedrigerer Ionenstärke im FRET-Assay keine so starke Veränderung (Abb. 43 B). Die abgeschätzte Transferrate wurde von 8,5 pmol auf 4,25 pmol pro Minute herabgesetzt (Abb. 43 D).

Die Grafiken 43 E und F zeigen die Daten nach der magnetischen Separation. Die im Überstand gemessene Menge an 2-NBD-GM1 zeigte bei beiden Präparaten keine Veränderung (Abb. 43 E). Es handelt sich hier um die nicht korrigierten Messdaten, bei denen die Vesikelfusion nicht berücksichtigt wird.

Die Fusionsrate von GM2AP wurde durch Erniedrigung der Ionenstärke von 41 % auf 65 % erhöht (Abb. 43 F), was den Abfall der im FRET-Assay erreichten Fluoreszenz erklärte. Beim rGM2AP-His6 zeigte sich nur eine geringe Erhöhung der Vesikelfusion von 73 % zu 77 % (Abb. 43 F).

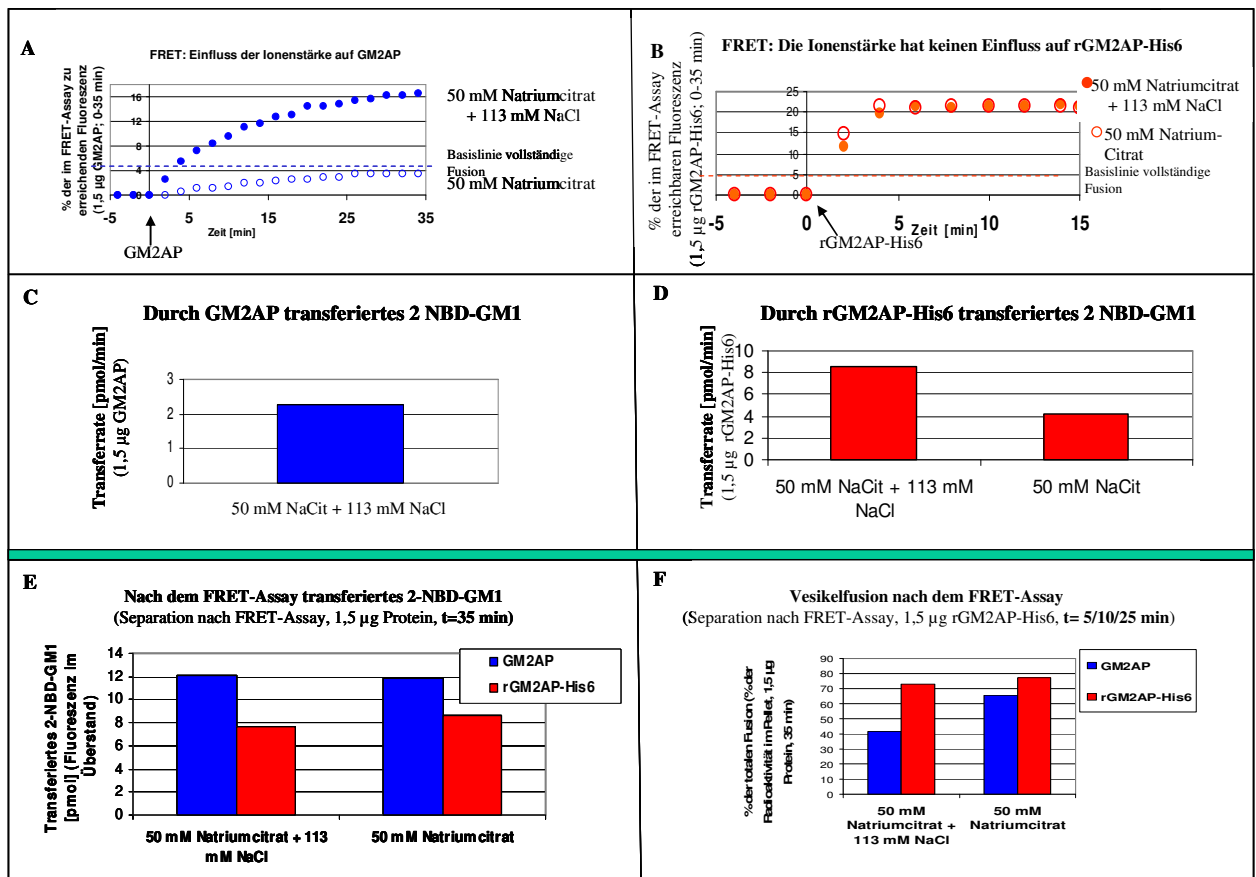


Abbildung 43: Die Erniedrigung der Ionenstärke erhöhte die Vesikelfusion durch GM2AP und hatte keinen Einfluss auf die Eigenschaften des rGM2AP-His6

Kombinatorischer Transfer-Fusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 20 mol% Cholesterol und 10 mol% DO-BMP. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die Endpunktfluoreszenz im FRET-Assay wurden bei GM2AP durch Erniedrigung der Ionenstärke stark herabgesetzt, Bei rGM2AP-His6 zeigte sich keine Veränderung. (C)/(D) Darstellung der abgeschätzten Transferrate beider Reaktionen. Da bei Verwendung von GM2AP und 50 mM NaCit die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht durchbrochen wurde wurde hier keine Transferrate abgeschätzt. (E) Nach der FRET-Messung (0-35 min GM2AP, 0-15 min rGM2AP-His6) und magnetischer Trennung im Überstand detektiertes 2-NBD-GM1. Der Transfer von 2-NBD-GM1 blieb in beiden Fällen nahezu unverändert. Es handelt sich hier um die reinen Messdaten ohne Korrektur der Vesikelfusion.

(F) Vesikelfusion nach der FRET-Messung (0-35 min GM2AP, 0-15 min rGM2AP-His6) und erfolgter magnetischer Trennung. Die Vesikelfusion zeigte sich bei rGM2AP-His6 unbeeinflusst, wurde aber bei GM2AP durch Absenkung der Ionenstärke fast verdoppelt.

Wurde das in den fusionierten Akzeptorvesikeln befindliche 2-NBD-GM1 in die Rechnung einbezogen so ergab sich für 1,5 µg GM2AP im Falle einer hohen Ionenstärke nach einer

Reaktionszeit von 35 min ein theoretischer Transferwert 20,6 pmol. Wegen der ansonsten zu hohen Vesikelfusion wurde in den restlichen Fällen von einer Berechnung der theoretischen Transferrate abgesehen.

3.4.10 Einfluss des pH-Wertes auf Lipidtransfer und Vesikelfusion durch GM2AP und rGM2AP-His6

Die Messungen wurden mit Vesikeln welche 20 mol% Cholesterol und 20 mol% DO-BMP enthielten durchgeführt.

Im FRET-Assay führte eine Erhöhung des pHs bei beiden Präparaten zu einer Verringerung der Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung und geringerer Fluoreszenz am Endpunkt (Abb. 44 A/B). Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung, und somit die 2-NBD-GM1-Transferrate, wurde durch pH-Erhöhung herabgesetzt (Abb. 44 C/D). Hier konnte die Transferrate nur für einige Reaktionen abgeschätzt werden, da der Transfer von 2-NBD-GM1 durch pH-Erhöhung so stark herabgesetzt wurde, dass die „Basislinie vollständige Fusion“ nicht erreicht wurde. Die Fluoreszenzfreisetzung geschah im Falle des rGM2AP-His6 bei allen pH-Werten deutlich schneller als beim GM2AP

Die Graphiken 44 E und F zeigen die Daten nach der magnetischen Separation. Wurde der pH von 4,2 auf pH 7 erhöht, so wurde beim GM2AP die im Überstand detektierte Menge an 2-NBD-GM1 verringert. Beim rGM2AP-His6 wurde ein Anstieg beobachtet (Abb. 44 D). In beiden Fällen handelt es sich um die reinen, nicht auf Vesikelfusion korrigierten, Messwerte.

Die Beobachtung bei Einsatz von rGM2AP-His6 könnte durch den bei pH 4,2 stark positiv geladenen Hexahistidin-Rest erklärt werden. Diese Ladung geht mit pH-Erhöhung sukzessive verloren. Bei pH 4,2 war nach 95 min durch die starke Fusionsneigung des rGM2AP-His6s fast kein Transfer mehr messbar (Abb. 44 E). Die oben beschriebene Wirkung der pH-Erhöhung auf den Hexahistidin-Rest zeigte sich in den Vesikelfusionsdaten bestätigt. Mit Erhöhung des pH-Wertes sanken die sonst auffällig dominanten Fusionseigenschaften des rGM2AP-His6 und waren bei pH 7 annähernd verschwunden (Abb. 44 F).

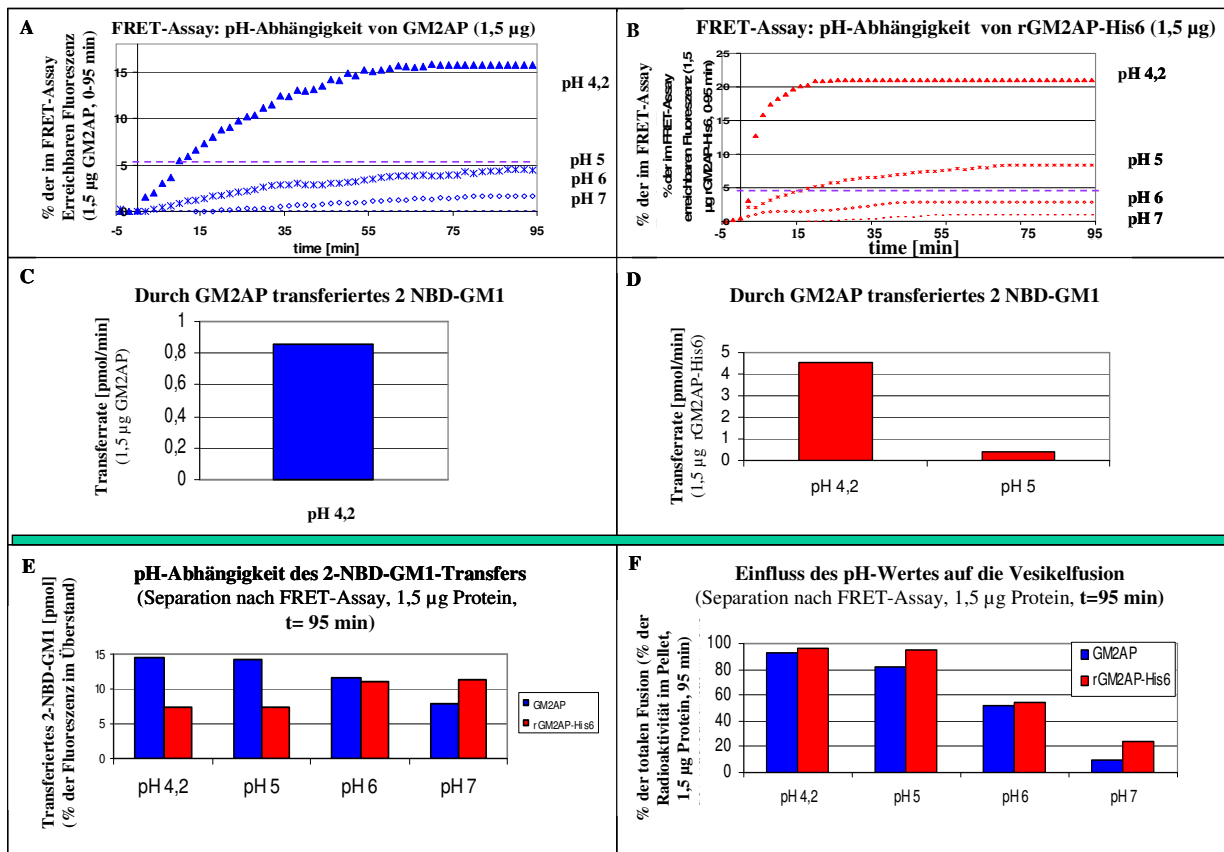


Abbildung 44: pH-Erhöhung setzte die Vesikelfusion herab, wirkte sich aber bei GM2AP und rGM2AP-His6 gegenläufig auf die im Überstand detektierte Menge an 2-NBD-GM1 aus.

Kombinatorischer Transfer-Fusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 20 mol% Cholesterol und 20 mol% DO-BMP. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay. pH 4,2: ▲, pH5: *, pH6: ○, pH7: gestrichelt. pH-Erhöhung setzte die Reaktionsgeschwindigkeit und die Endfluoreszenz der Reaktionen herab. (C)/(D) Darstellung der abgeschätzten Transferrate, sofern die „Basislinie vollständige Fusion“ durchbrochen wurde. (E) Nach der FRET-Messung (0-95 min) und erfolgter BioMag-Trennung im Überstand detektiertes 2-NBD-GM1. Bei GM2AP sank die detektierte Menge mit pH Erhöhung, bei rGM2AP-His6 stieg sie an. (F) Vesikelfusion nach der BioMag-Trennung im Anschluss an die FRET-Messung (0-95 min). Die pH-Erhöhung führte zum Absinken der Fusionsrate. Dieses war besonders bei rGM2AP-His6 deutlich.

Wurden die im Pellet fusionierten Akzeptorvesikel mit einberechnet, so ergaben sich nach 95 minütiger Inkubation rechnerisch die folgenden Werte für den theoretischen Transfer von 2-NBD-GM1:

GM2AP: pH 6= 23,5 pmol, pH 7= 9,8 pmol

rGM2AP-His6: pH 6 = 24 pmol, pH 7 = 14,6 pmol

Somit sankt der 2-NBD-Transfer mit Erhöhung des pH-Wertes sowohl beim GM2AP aus Gewebe, als auch beim exprimierten Protein.

Von einer Berechnung der theoretischen Transferwerte bei den niedrigeren pH-Werten wurde wegen der hohen Vesikelfusion abgesehen.

3.4.11 Sphingomyelin verringerte bei beiden Präparaten die Fluoreszenzfreisetzung im FRET, sowie bei GM2AP den Transfer von 2-NBD-GM1

Mit 10 mol% Sphingomyelin in den Vesikeln wurde die Geschwindigkeit der Fluoreszenzfreisetzung im FRET-Assay bei beiden Präparaten herabgesetzt und die erreichte Fluoreszenz verringert (Abb. 45 A/B). Die aus dem nahezu linearen Bereich der FRET-Kurve abgeschätzte Transferrate wurde bei Verwendung von 1,5 µg GM2AP von 17,1 auf 4,27 pmol pro Minute gesenkt, bei rGM2AP-His6 von 8,5 auf 2,1 pmol pro Minute.

Abbildungen 45 E und F zeigen die Daten nach der magnetischen Separation. Die Menge an in den Überstand transferiertem 2-NBD-GM1 sank im Falle von GM2AP von 21 pmol auf 11,3 pmol, bei rGM2AP-His6 wurde sie von 5,1 pmol auf 6,7 pmol erhöht (Abb. 45 E). Es handelt sich in beiden Fällen um die nicht auf Vesikelfusion korrigierten Messdaten.

Die Vesikelfusion wurde im Falle von GM2AP nicht durch Sphingomyelin beeinflusst, bei rGM2AP-His6 trat eine Erhöhung von 88 % auf 97 % auf (Abb. 45 F).

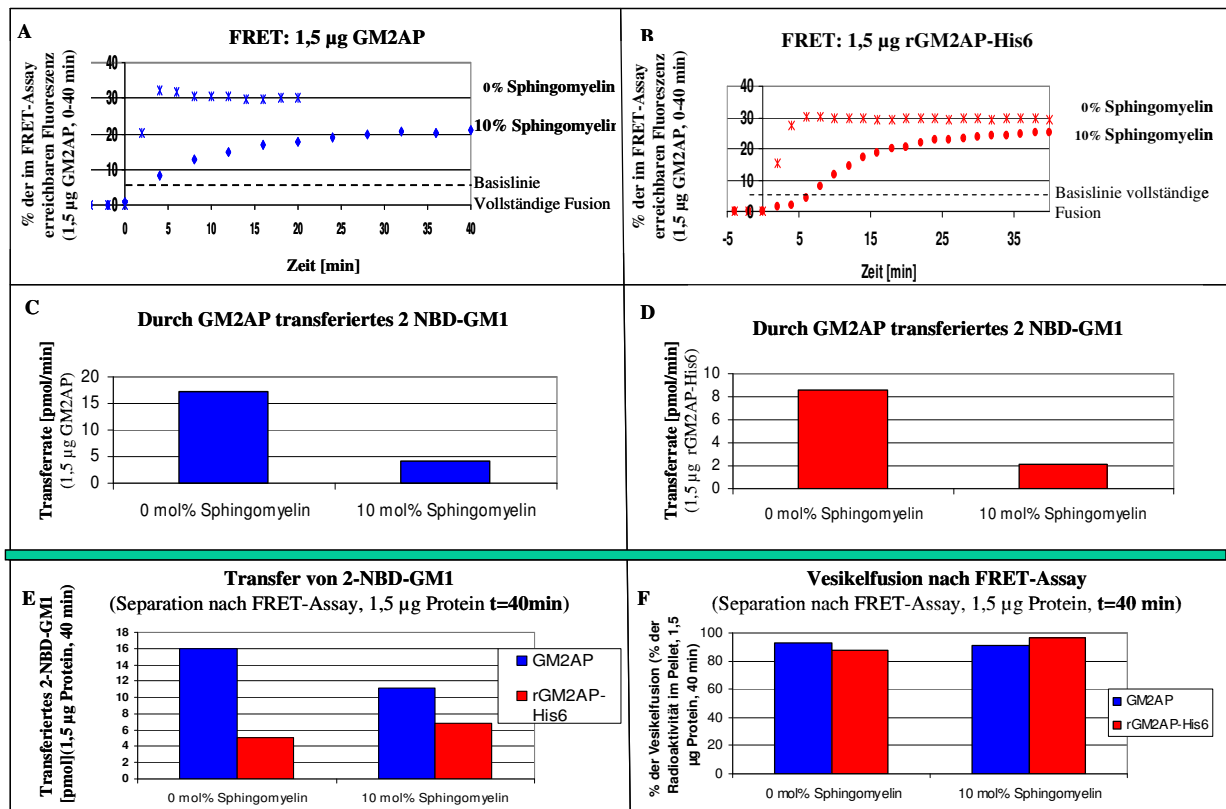


Abbildung 45: Spingomyelin hatte in Anwesenheit von DO-BMP hemmende Wirkung auf GM2AP

Kombinatorischer Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay. Das Assayvolumen betrug 400 µl, der Puffer war 50 mM NaCit + 113 mM NaCl, pH 4,2. Die Abbildung zeigt den Mittelwert einer Dreifachmessung. Die Abweichung beträgt maximal 10%.

Basislipidzusammensetzung mit 20 mol% Cholesterol und 10 mol% DO-BMP und 10 mol% Spingomyelin. Experimente mit GM2AP sind in blau, solche mit rGM2AP-His6 in rot dargestellt.

(A)/(B) Kontinuierliche Messung des Fluoreszenzanstieges im FRET-Assay. 0 mol% Spingomyelin : *, 10 mol% Spingomyelin: ♦. Durch 10 mol% Spingomyelin wurde bei beiden Proteinen eine Erniedrigung der Geschwindigkeit und der Endpunktfluoreszenz erreicht (A/B). (C)/(D) Darstellung der abgeschätzten Transferraten. In beiden Fällen bewirkte Spingomyelin eine Verlangsamung der Fluoreszenzfreisetzung im FRET-Assay und somit eine Verringerung des 2-NBD-GM1-Transfers. (E) Nach der FRET-Messung (0-40 min) und erfolgter magnetischer Trennung messbarer 2-NBD-GM1 Transfer. Die im Überstand detektierte 2-NBD-GM1-Menge wurde im Fall von GM2AP durch Spingomyelin verringert im Falle von rGM2AP-His6 erhöht. Es handelt sich um die reinen Messdaten ohne Berücksichtigung der Vesikelfusion. (F) Vesikelfusion nach der FRET-Messung (0-40 min) und erfolgter BioMag-Trennung. Die Vesikelfusion wurde durch Spingomyelin nur gering beeinflusst.

Wegen der hohen Vesikelfusionswerte wurde von einer Berechnung der theoretischen Transferwerte abgesehen.

4. Diskussion

Sphingolipide und andere Bestandteile der Plasmamembran von Säugetierzellen werden in zellulären sauren Kompartimenten, den Lysosomen, abgebaut (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 2005). Diese erreichen sie durch Endozytose und daran anschließenden intrazellulären Membranfluss. Der eigentliche Abbau erfolgt an intralysosomalen Vesikeln, deren Membranen durch erhöhte BMP-Konzentration und niedrigen Cholesterolgehalt charakterisiert sind, durch wasserlösliche Hydrolasen, welche die Hilfe von membranaktiven Lipidtransferproteinen, dem GM2AP und den Saposinen, benötigen (Übersichtsartikel: Kolter und Sandhoff, 2005).

Um zum Verständnis der Wirkungsweise des GM2-Aktivatorproteins an der Grenzfläche von Membran und wässrigem Medium beizutragen, wurde dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinant mit Hexahistidin-Rest exprimiert und aufgereinigt. Mit diesem Präparat sowie einem aus Gewebe gereinigtem Vergleichspräparat wurden verschiedene biophysikalische Untersuchungen durchgeführt.

4.1 Expression und Charakterisierung des GM2AP

Das GM2AP vermittelt an der Grenzfläche zwischen dem wässrigen Lysosomeninneren und der Oberfläche intralysosomaler Vesikel die Interaktion zwischen der wasserlöslichen Hexosaminidase A und ihrem membrangebundenen Substrat, dem Gangliosid GM2 (Meier et al., 1991). Das GM2AP dient hierbei als essentieller, nicht-enzymatischer Kofaktor (Conzelmann und Sandhoff, 1979). Seine genaue Funktionsweise an der Lipid-Wasser-Grenzfläche konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das GM2AP rekombinant, mit Hexahistidin-Rest, im BEVS hergestellt und charakterisiert, um ein homogenes Präparat für biophysikalische Messungen zu erhalten. Die Methode der rekombinanten Expression wurde gewählt, da die Aufreinigung des GM2APs aus Gewebe sehr zeitaufwendig ist und nur geringe Ausbeute liefert. Zusätzlich kann durch die Art der Aufreinigung, wie z.B. Hitze- und Säurefällung, die Aktivität des Proteins beeinflusst werden. Bei den aus Gewebe aufgereinigten Präparaten ist zudem trotz aller Sorgfalt bei der Darstellung eine Verunreinigung mit anderen lysosomalen, membranaktiven Proteinen nicht ausgeschlossen, da sie ähnliche physikochemische

Eigenschaften besitzen. Auch durch genaue Analytik (MALDI-MS, Elektrophorese und Anfärbung, etc.) können nur die Hauptkomponenten der Mischung detektiert werden, während sich Mengen von einigen Prozenten unterhalb der Nachweisgrenze der genannten Methoden befinden.

Dennoch dienen geringe Mengen einer aus Gewebe gereinigten Probe als Vergleichssubstanz, da das rekombinante Präparat zur Aufreinigung über NiNTA-Chromatographie einen Hexahistidin-Rest trägt.

Die heterologe Expression des rGM2AP-His6 im BEVS mittels *SF9* bzw. *SF21*-Zellen ist eine geeignete Methode für die Darstellung von aktivem Aktivatorprotein im Schüttelkolben im Maßstab von einigen mg/l (vgl. Aktivitäts-Assay Abb. 18 B).

Das Protein wird nach Infektion der Insektenzellen mit einem gentechnisch veränderten Virus über den Basic-Promotor als Fusionsprotein mit einem C-terminalen Hexahistidin-Rest (rGM2AP-His6) exprimiert und ins Medium sekretiert (Wendeler et al., 2003a). Da ausschließlich das rGM2AP-His6 exprimiert wird, können Kontaminationen mit membranaktiven, lysosomalen Proteinen ausgeschlossen werden. Eine Kontamination mit zelleigenen Proteinen wurde durch Gewinnung des proteinhaltigen Überstandes vor Einsetzen der Zellyse vermieden.

Die Sekretion des relativ sauberen, rekombinanten Proteins in den Überstand erlaubte eine effektive Reinigung in nur zwei Schritten über Kationenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie. Da das Protein nahezu vollständig glykosyliert exprimiert wurde, war keine Abtrennung von unglykosyliertem Protein über Concanavalin A-Chromatographie notwendig. Dieses wirkte sich sehr positiv auf das erhaltene Präparat aus, da im proteinhaltigen Eluat der ConA-Säule häufig Lektin gefunden wird, welches aus der Matrix gelöst wird. Dieses beeinflusst dann die mit dem Protein durchgeführten Messungen. So ist z.B. bekannt, dass das ausgeschwemmte Lektin in SPR-Messungen an die Liposomen anbindet (Mündliche Mitteilung Fr. Dr. Remmel).

Da sich während der Anfertigung dieser Arbeit herausstellte, dass der Hexahistidin-Rest die Eigenschaften des GM2APs in biophysikalischen Messungen stark beeinflusst, liegt die Idee nahe, die nahezu vollständige Glykosylierung des im BEVS exprimierten GM2APs zur Aufreinigung ohne Hexahistidin-Rest zu nutzen. Das ohne Hexahistidin-Rest exprimierte Protein könnte über eine Affinitätschromatographie über ConA gereinigt werden, so dass der Hexahistidin-Rest für die Reinigung überflüssig wäre. Nach der Con A-Chromatographie müssten jedoch noch weitere Reinigungsschritte, wie zum Beispiel Gelfiltration, durchgeführt

werden, um das aus der ConA-Säule ausgeschwemmte Lektin aus dem Eluat zu entfernen. Ferner bestünde noch die Möglichkeit, quervernetztes ConA-Material zu verwenden. Durch die Quervernetzung wird das Ausschwemmen von Lektin meist vollständig unterbunden (Thermo Scientific, Instructions, L-Photo-Leucine Number 22610 und L-Photo Methionine Number 22615).

Die Charakterisierung der beiden Proteinpräparate erfolgte über SDS-PAGE, Immuno-Blot, MALDI-Massenspektroskopie und liposomalen Aktivitätsassay. Im liposomalen Assay gelang mit beiden Präparaten die Stimulierung des GM2-Abbaus durch die HexA (Abb. 18 B bzw. 20 B). Das Protein aus Gewebe besaß mit $1 \text{ AE} = 3 \mu\text{g}$ eine etwas höhere Aktivität, als das rekombinante Protein, das eine Aktivität von $1 \text{ AE} = 3,8 \mu\text{g}$ aufwies. 1 AE ist im Falle des GM2APs definiert als die Menge an Aktivatorprotein die unter Standardbedingungen in Anwesenheit von 1 U HexA eine Steigerung der Substratspaltung (GM2 zu GM3) um 1 nmol pro Stunde bewirkt (Conzelmann und Sandhoff, 1979).

Als mögliche Ursache für die geringere Aktivität des exprimierten Proteins wurden bereits früher im Falle der Sphingolipid-Aktivatorproteine A, B, C, D die zusätzlichen N- und C-terminalen Aminosäuren vermutet (Nettersheim, 2001). Des Weiteren könnte auch ein Teil der exprimierten Proteine fehlgefaltet oder denaturiert vorliegen.

4.2 Biophysikalische Untersuchungen

Bei den Untersuchungen mittels Dynamischer Lichtstreuung, Oberflächenplasmonresonanz und FRET-BioMag-Transfer-Fusions-Assay kann die direkte Interaktion des GM2APs und des rGM2AP-His6 mit Membranen ohne Beteiligung der HexA beobachtet werden. Während die DLS in der Lage war, Größen- und Strukturänderungen der Liposomen zu charakterisieren, konnten mit der SPR und mit dem FRET-BioMag-Transfer-Fusions-Assay Faktoren untersucht werden, die für die Membranbindung des GM2APs und den Lipid-Transfer von Bedeutung sind.

4.2.1 SPR

Die Beladung des Sensorchips L1 mit Liposomen lieferte für gleiche Liposomenzusammensetzung reproduzierbare Werte im Bereich zwischen 1000-8000 RU (Resonance Units).

Werte um 2200 RU entsprechen hierbei der Beladung einer einzelnen Zelle des Chips (Fläche: 1,2 mm², Volumen: 0,02 µl) mit einer Lipid-Monoschicht (Cooper et al., 1998), so dass eine Doppelschicht ein Signal von 4400 RU erreicht. Ab ca. 6000 RU wird eine homogene Bedeckung mit intakten Liposomen erreicht (Cooper et al., 2000). Für Zwischenwerte wird eine gemischte Bindung von intakten und fusionierten Liposomen oder multilamellaren Strukturen angenommen, deren Verhältnis von der Liposomenzusammensetzung abhängig ist.

Die Beladungsdichte wird durch die elektrostatischen Abstoßung der Liposomen durch den Gehalt an geladenen Lipiden und der Membranfluidität bzw. -permeabilität beeinflusst (Anderluh et al., 2005, Baird et al., 2002). Entsprechend führte ein höherer Cholesterolgehalt zu einer höheren Insertion der Chip-gebundenen Alkylketten in die Lipiddoppelschicht der Liposomen, während die negativen Ladungen des BMPs und/oder der Ganglioside durch die gegenseitige Abstoßung der Liposomen die Beladung verringerte (Abb. 23). Die Anbindung wird zudem durch den großen Zuckerrest des GM1/GM2 behindert. Dies sieht man sehr deutlich, wenn man die Anbindung von Standardliposomen (DOPC/Cholesterol/DO-BMP: 60/20/20 mol%, Gute Anbindung) mit Liposomen vergleicht, die anstelle des BMPs 20 mol% Gangliosid beinhalten. Die Anbindung der gangliosidhaltigen Liposomen an den Chip ist fast nicht möglich (Abb. 23, Tabelle 1).

Leider lieferten daher gerade die für uns interessanten Lipidzusammensetzungen mit hohem Gangliosid- und/oder BMP-Gehalt schlechte Beladungswerte. Diese Werte ließen sich auch durch erneute Beladung derselben Zelle, Wechsel des Puffers und durch Auslassen der NaOH-Zwischenspülung (vgl. Material/Methoden) nicht verbessern. Dieses zeigt, dass die Beladungsdichte in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung der Liposomen reproduzierbar war.

Vermutlich ließe sich die Vergleichbarkeit der Messkurven verbessern, wenn der Chip mit gleichen Mengen an Liposomen beladen werden könnte. Dies wäre durch Modifizierung des Beladungsprotokolls prinzipiell möglich, da neben der Liposomenzusammensetzung auch die Konzentration der Liposomensuspension, sowie deren Injektionsdauer und -geschwindigkeit das Ergebnis der Beladung beeinflusst.

Da sich jedoch wahrscheinlich nicht nur „immobilisierte“, also über Alkylketten verankerte Liposomen auf der Chipoberfläche befinden, sondern auch unspezifisch an andere Liposomen adsorbierte, wurde die Modifizierung des Beladungsprotokolls verworfen.

Messungen bei geringer Beladungsdichte von unter 6000 RU waren sehr schlecht interpretierbar und zudem nicht mit den Standardmessungen vergleichbar. Dieses entsprach der Erwartung, da bei Beladungen unter 6000 RU das liposomale Modellsystem verlassen wird, da die Chipoberfläche nicht mehr einheitlich mit Liposomen bedeckt ist. Somit tritt bei geringer Beladung ein Nebeneffekt der Methode in den Vordergrund, der die Messung verfälscht: das Protein bindet bevorzugt an freie Stellen des Chips.

Nach der Immobilisierung der Liposomen wurde der Messwert auf Null gesetzt, um gebrauchts- und produktionsbedingte Unterschiede zwischen den Chips bzw. den einzelnen Messzellen in der Darstellung auszugleichen und die Vergleichbarkeit der Interaktionskurven zu ermöglichen.

Bindung und Lipidmobilisierung durch übergeleitete Proteine sind nicht nur von der Zusammensetzung der Liposomen abhängig, sondern auch von deren ursprünglicher Anzahl auf der Chipoberfläche. Es ist formal möglich – wenn auch unüblich - die unterschiedliche Beladung in die Abbildung der Messwerte mit einzubeziehen. Hierzu kann man die Messkurven auf die Menge an immobilisierten Liposomen „normieren“ (indem man alle Messwerte der Kurve durch den Betrag - in RU - an immobilisierten Liposomen direkt nach der Beladung teilt). Der Vorteil dieser Darstellungsform läge darin, dass der Materialverlust in Prozent leicht ablesbar wäre, da 100 % dem Wert 0 entsprechen würden und der Wert -1 dem leeren Chip, also 100 % Lipidverlust, gleichzusetzen wäre. Somit wurde die Größe der Proteinanbindung bzw. der Lipidabschwemmung leichter ablesbar.

Bei einem Vergleich beider Darstellungsformen zeigte sich jedoch, dass durch die Normierung die relative Lage der Kurven zueinander im Prinzip nicht verändert wird (Abb. 46). Daher wurde im Ergebnisteil die übliche Art der Darstellung gewählt.

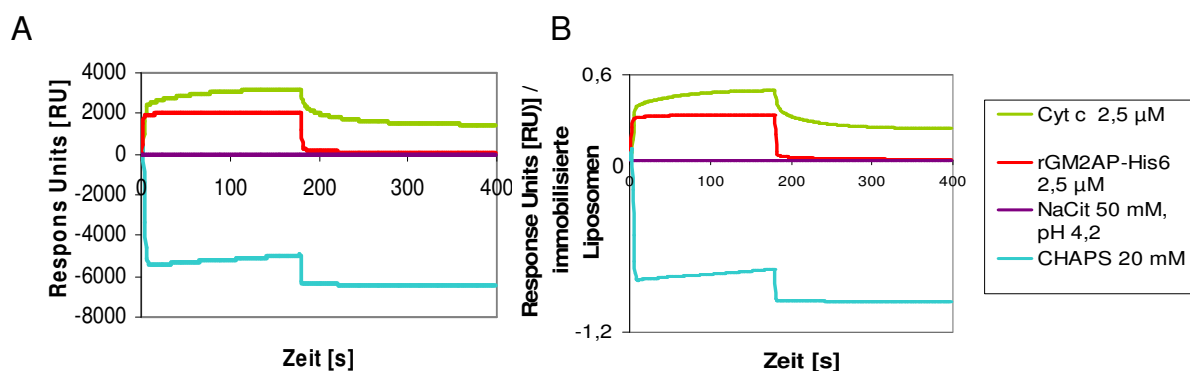


Abbildung 46: Vergleich der üblichen Darstellungsweise mit einer normierten Darstellungsform

Im Gegensatz zur üblichen Darstellung (A) bezieht sich die normierte Darstellung (B) auf die Mengen an immobilisierten Liposomen auf dem Chip - vor der Injektion des Proteins, mit ein; die abgebildeten Messkurven zeigen eine Messung auf Liposomen der Zusammensetzung PC/Cholesterol/DO-BMP 50/20/30.

Die Konzentration von 2,5 μM der eingesetzten Proteine wurde zum einen gewählt, um die Vergleichbarkeit mit anderen Messungen der Abteilung zu gewährleisten, zum anderen musste eine Konzentration im Messbereich der Methode gefunden werden, welche eine ausreichende Menge an Messungen mit einer begrenzter Proteinmenge ermöglichte.

Eine konzentrationsabhängige Messung des rGM2AP-His6 im Bereich von 0,626 μM bis 10 μM zeigte keine prinzipiellen Unterschiede im Messergebnis (Abb. 25 A/B). Jedoch stieg die Anbindung an die Liposomen ab einer Proteinkonzentration von mehr als 5 μM , während die Ablösung des rGM2APs beim spülen mit Puffer (Übergeleitetes Volumen: 80 μl) zurückging. Somit erschien es auch methodisch sinnvoll, im unteren μM -Bereich zu arbeiten.

Die verwendete Proteinkonzentration liegt mit diesen 2,5 μM wahrscheinlich noch weit unter der physiologischen Konzentration im Lumen des Lysosoms. Herrn Dr. Stefan Hepbildikler gelang in seiner Dissertation die Aufreinigung von ca. 0,5 mg GM2AP aus 320 g Nierengewebe, was 1,5 mg aus 1 kg Gewebe entspricht. Für das GM2AP mit einer molekularen Masse von 18 kD würde dieses, ohne Berücksichtigung der hohen Aufreinigerungsverluste (>80%), bei einem lysosomalen Volumen von 1% des Gewebes einer Konzentration von 8 μM entsprechen.

Es zeigte sich, dass rGM2AP-His6 bei allen verwendeten Liposomenzusammensetzungen zunächst an die Liposomen anband. Es wurde schnell eine Erhöhung des Signals auf ca. 1000 RU erreicht. Während der weiteren Überleitung des Proteins blieb dieses Signal stabil, erst mit Pufferüberleitung kam es zu einem Abfall des Signals. Das rGM2AP-His6 diffundierte wieder von den Liposomen ab.

Zum Vergleich wurde mit aus Gewebe isoliertem GM2AP ohne Hexahistidin-Rest gemessen (Abb. 30). Hier konnte bei einer Liposomenzusammensetzung von PC/DO-BMP/GM2, 85 mol% DOPC, 10 mol% DO-BMP und 5 mol% GM2 das, bereits bei lytischen Peptiden (Chen et al., 2001), für Sap-A (Locatelli-Hoops, 2006) und Sap-B (Rommel et al., 2007) beschriebene, Phänomen der „Lipidabschwemmung“ beobachtet werden. Bei Überleitung von 2,5 μg GM2AP wurden die RUs zunächst, wie auch im Falle des rGM2AP-His6, auf 1000 RU erhöht. Im Gegensatz zum rekombinanten Präparat, bei dem dieses Signal bis zur Pufferüberleitung stabil blieb, erfolgte hier jedoch sehr schnell ein Signalabfall. Noch vor der Überleitung von reinem Puffer wurde die Liposomen-Basislinie unterschritten, bei

Pufferüberleitung fiel das Signal weiter ab und erreichte einen Wert von -1200 RU. Der aus Gewebe gereinigte GM2AP band demnach kurzzeitig an die Liposomen an, diffundierte noch während der Proteinüberleitung wieder ab und löste dabei Lipidmaterial vom Chip.

rGM2AP-His6 band an die Liposomen an und blieb dort bis zur Überleitung von reinem Puffer gebunden. Erst mit Pufferüberleitung diffundierte der rGM2AP-His6, oft nur teilweise, wieder ab. Da es nicht zu einer Unterschreitung der Basislinie kam, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob der rGM2AP-His6 beim Ablösen von den Liposomen Lipidmaterial mitnimmt oder nicht. Es wäre z.B. möglich, dass Lipidmaterial vom Chip gelöst wird und die freiwerdenden Stellen des Chips sofort wieder durch rGM2AP besetzt werden.

Im Falle des rGM2AP-His6 wurde mit keiner der vermessenen Liposomenzusammensetzungen ein Signalabfall unter die Basislinie beobachtet. Diese Beobachtung war sowohl unabhängig von der Konzentration des rGM2AP-His6, als auch vom verwendeten Puffer und dessen pH-Wert. rGM2AP-His6 und GM2AP zeigten demnach bei SPR-Messungen sehr unterschiedliche Eigenschaften.

Diese Beobachtung war überraschend, da in unserer Abteilung Messungen durchgeführt worden waren, die zeigten, dass rekombinantes Sap-A mit Hexahistidin-Rest (rSap-A-His6) unter Verwendung dieser Methode, die gleichen Eigenschaften besaß wie rekombinantes Sap-A ohne Hexahistidin-Rest (rSap-A) (Locatelli-Hoops et al., 2006).

Da der Unterschied zwischen dem aus Gewebe gereinigtem GM2AP und dem rekombinant hergestelltem rGM2AP-His6 in dem Hexahistidin-Rest besteht, muss die Begründung für solch unterschiedliches Verhalten jedoch in eben diesen zusätzlichen sechs Histidinen liegen.

Der isoelektrische Punkt des GM2APs liegt bei 4,8 (Conzelmann und Sandhoff 1979 und berechnet mittels Expassy ProtParam), der des rGM2AP-His6 wurde anhand der Sequenz (mittels ExPASy ProtParam) mit 6,13 berechnet. Neben der eigenen positiven Ladung, welche durch eine Vielzahl von Lysinen bedingt ist (Abb. 47), trägt der rGM2AP-His6 bei pH 4,2 noch sechs zusätzliche positive Ladungen durch den Hexahistidin-Rest. Diese starke positive Ladung beeinflusst die eigentliche Funktion des GM2APs sehr stark, da mit GM2AP ohne Hexahistidin-Rest die Abschwemmung von Lipidmaterial beobachtet wurde, mit rGM2AP-His6 jedoch nur Anbindung an die Liposomen. Durch den Hexahistidin-Rest scheint das Ablösen des GM2APs von den Liposomen erschwert zu sein, diffundiert doch rGM2AP-His6, im Gegensatz zum GM2AP, erst bei Pufferüberleitung wieder von den Liposomen ab, und das meist nicht vollständig.

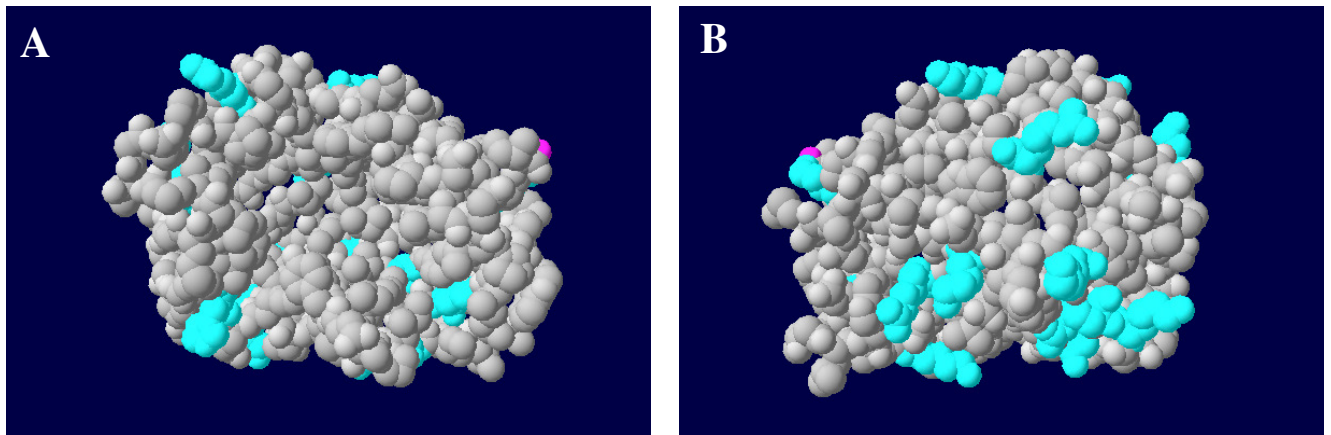


Abbildung 47: 3-D-Struktur des GM2APs nach Pdb-Protein-Datenbank. A) Gangliosidbindungsseite, B) Proteinrückseite

Türkis hervorgehoben sind die positiv geladenen Aminosäuren (Lysine und Arginine). Der C-Terminus (Ansatzpunkt des Hexahistidin-Restes) wurde pink markiert.

Auch für rGM2AP-His6 wurde unter Verwendung von Liposomenzusammensetzungen mit sehr hohem Gangliosid- und BMP-Gehalt ein lipidabschwemmendes Verhalten beschrieben Wendeler (Wendeler et al., 2006, Werth et al., 2001) Unter den dort beschriebenen Lipidzusammensetzungen mit 20 mol% GM2 in den Liposomen oder einer Liposomenzusammensetzung aus 50 mol% PC, 20 mol% BMP, 20 mol% Cholesterol und 10 mol% GM1 gelang keine ausreichende Anbindung der Liposomen an den L1-Chip (deutlich geringer als 6000 RU), so dass die dort dokumentierten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren (siehe oben).

Dass die Anbindung dieser stark negativ geladenen Liposomen, welche sich gegenseitig abstoßen und/oder durch die Zuckerstrukturen des GM1 behindern nicht gelang, kann darin begründet sein, dass in den vergangenen Jahren die Produktion der L1-Chips geändert wurde. Hierbei erfolgte auch ein Wechsel der Namensgebung der Chips von Pioneer L1 zu L1. Nähere Angaben zu den vorgenommenen Veränderungen waren jedoch vom Hersteller nicht zu bekommen. Da die Anbindung der Liposomen über Insertion von an den Chip gebundenen Alkylresten erfolgt, liegt es nahe, dass die Länge dieser Alkylreste oder die Dichte der Besetzung des Chips geändert wurde. Egal welcher Art die Veränderungen waren, sie verschlechterten nicht nur die ohnehin schon schwierige Anbindung negativ geladener und/oder gangliosidhaltiger Liposomen weiter, sondern beeinträchtigten die Anbindung aller Liposomen (mündliche Mitteilung Fr. Dr. Remmel).

Auch rSap-B-His4 zeigt trotz des Tetrahistidin-Restes eine lipidablösende Wirkung. Bei SPR-Messungen mit DO-BMP-haltigen Liposomen fiel das Signal bei Zugabe von rSap-B-His4 unter die Liposomen-Basislinie, die der vollständigen Bedeckung des Chips mit Liposomen entspricht.

Hier muss beachtet werden, dass Sap-B an sich keine so starke positive Ladung trägt wie das GM2AP (Abb. 47 und 48). Der isoelektrische Punkt des Sap-B aus Gewebe liegt bei 4,4 (Dissertation Fr. Dr. Remmel). Zudem sind hier nur vier zusätzliche positive Ladungen durch den Tetrahistidin-Rest vorhanden, wodurch die Sap-B-Wirkung weniger verändert wird. Der isoelektrische Punkt verschiebt sich durch die 4 Histidine nach 4,7-4,9 (Remmel, 2007).

Es wäre sogar denkbar, dass durch diese leichte Verschiebung des isoelektrischen Punktes die Anbindung an die Liposomen bei pH 4,2 derart begünstigt wird, dass die lipidabschwemmende Wirkung erst ermöglicht wird. Da kein Protein aus Gewebe für Vergleichsmessungen zur Verfügung stand, kann nur darüber spekuliert werden, ob dieses Protein mit seinem isoelektrischen Punkt von 4,4, dass bei pH 4,2 nahezu neutral geladen ist, die gleichen Tendenzen zur Anlagerung an negativ geladene Liposomen zeigen würde.

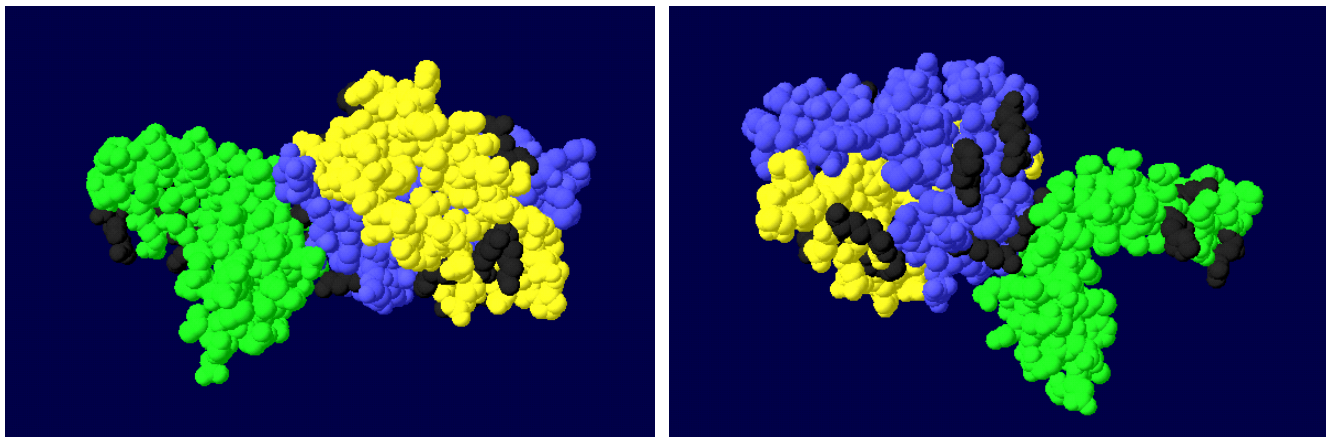


Abbildung 48: 3D-Struktur des Sap-B Trimers nach Pdb-Protein-Datenbank.

Schwarz hervorgehoben sind die positiven Aminosäuren (Lysine, Arginine, Histidine)

Im Vergleich zu rSap-B-His4 war die lipidabschwemmende Wirkung des aus Gewebe gereinigten GM2APs schwächer. Von rSap-B-His4 wurden in etwa 5 min ca. 60% der Lipidmasse, von GM2AP nur 24 % der Lipidmasse vom Chip verdrängt (Abb. 30).

Dies spricht dafür, dass entsprechend unserem Model (Wendeler et al., 2004) einzelne Lipide vom GM2AP gebunden werden. Entsprechend wird das GM2AP hier in Abwesenheit der HexA als Lipid-Transferprotein postuliert (Conzelmann et al., 1982a).

In der Assoziationsphase (Injektion des Proteins) überlagerten sich zudem, wie auch bei den Messungen mit rSap-B-His4, die gegenläufigen Prozesse – Bindung und Abschwemmung –, was Aussagen über die Bindung erschwert.

In Zukunft könnte man der Frage, ob es sich bei dem vom Chip gelösten Lipidmaterial um einzelne Lipide oder Liposomen handelt durch eine unabhängigen Methode, nämlich mit der Extraktion von radioaktiv markiertem GM1 oder GM2 aus Octylsepharose-gebundenen Liposomen, nachgehen. Diese Methode wurde bereits erfolgreich bei Untersuchungen an Sap-B eingesetzt (Locatelli-Hoops, 2006, Rimmel et al., 2007). Verschieben sich hier die Verhältnisse der Lipidkomponenten von eingesetzten Liposomen und Eluat, so spricht dieses für die Extraktion von einzelnen Lipiden.

Eine weitere Möglichkeit um die Frage zu klären, ob Liposomen oder Lipide abgelöst werden bestünde in der Beladung von magnetischen Kügelchen welche RP12-Ketten tragen. Die Vesikel könnten hier ebenfalls mit radioaktiv markiertem GM1 oder GM2 dotiert werden. Nach Überleitung des Proteins könnten durch radioaktive Vermessung des Eluates und einer Lipidanalyse entsprechend der oben beschriebenen Methode Rückschlüsse aus dem Lipidgehalt des Eluates gezogen werden.

Da das rGM2AP-His6 an Liposomen anbindet, aber unter den hier getesteten Bedingungen kein Lipid abgeschwemmt wird, sollte weder rGM2AP-His6, als auch GM2AP ganze Liposomen vom Chip abschwemmen. Dies ist der Fall, da die Anbindung an die Liposomen als Auslöser der Abschwemmung ganzer Liposomen anzusehen wäre.

Um weitere Hinweise auf die Wirkungsweise des GM2APs auf Membranen zu bekommen, wurden Untersuchungen mittels DLS durchgeführt.

4.2.2 DLS

Für Sap-A und -C wurde gezeigt, dass diese direkt mit den Enzymen interagieren, die sie beim Abbau stimulieren (Berent und Radin, 1981, Morimoto et al., 1989). Für Sap-B konnte dieses Verhalten ausgeschlossen werden (Fischer und Jatzkewitz, 1977), wohingegen es bei Sap-D noch nicht hinreichend untersucht wurde. Für das GM2AP wurde sowohl direkte Interaktion mit dem Gangliosid GM2, als auch mit der HexA nachgewiesen (Wendeler et al., 2006). Für die Funktion des Sap-B und des GM2APs sind demzufolge die Anlagerung an Membranen, sowie die Bindung bzw. die Extraktion des Enzymsubstrates und sein Transport zum Enzym oder einer anderen Membran entscheidend.

Über DLS kann die Größenänderung von Partikeln in Lösung gemessen werden. Somit können Rückschlüsse auf die Wirkungsweise der Aktivatorproteine gezogen werden. Sind die Liposomen nach Zugabe des Proteins vergrößert, so muss dieses eine fusogene oder aggregierende Wirkung besitzen.

Nach dem Topologiemodell werden GSL an intraendosomalen und intralysosomalen Vesikeln abgebaut, deren Durchmesser ca. 50-100 nm beträgt (Bradová et al., 1993). Diese Vesikel sind durch ihre Krümmung und das Fehlen einer Glykanschicht im Vergleich zur Plasmamembran oder den Organellen-limitierenden Membranen destabilisiert. Diese Verhältnisse wurden bei dieser Messmethode durch große, unilamellare Vesikel nachempfunden und deren Struktur und Größe mittels DLS vor und nach der Zugabe von rGM2AP-His6 oder Kontrollproteinen untersucht.

Um das System auf Funktion zu prüfen, wurden zunächst Messungen mit Kontrollproteinen durchgeführt. Durch die Zugabe von BSA wurde der Radius der Liposomen mit anionischen Lipiden vergrößert. Dieses konnte nur durch Vesikelfusion oder elektrostatische Aggregation geschehen (bei pH 4 sind das BSA positiv und BMP-haltige Membranen negativ geladen (Wilkening et al., 2000)). Nach Zugabe von Triton-X-100 verkleinerte sich der Radius auf unter 10 nm. Durch das Detergenz wurden die Liposomen aufgelöst und Mizellen gebildet (Klingenstein, 2002).

Die Zugabe von rSap-B-His4, führte weder bei neutralen noch bei BMP-haltigen Liposomen zu einer Veränderung der Größe (Rommel, 2007). Diese Ergebnisse wurden durch erneute Vermessung bestätigt.

Bei Zugabe von rGM2AP-His6 trat bei DO-BMP-haltigen Vesikeln wie bei BSA-Zugabe eine Vergrößerung des Vesikelradius auf etwa das Doppelte auf. Diese Vergrößerung kann sowohl auf Aggregation als auch auf Vesikelfusion beruhen.

Im Falle eines Aggregationsereignisses würde man allerdings erwarten, sehr große Partikel in der Lösung zu finden. Da hier, zum einen nur die doppelte Liposomengröße erreicht wurde und zum zweiten ein klarer Peak detektiert wurde, spricht dieses für Vesikelfusion.

Um den Beweis zu führen, dass es sich bei der beobachteten Liposomenvergrößerung um Vesikelfusion handelt, sollen in Zukunft Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Hierbei würde sich eine zeitlich gestaffelte Messung über einen längeren Zeitraum anbieten, da Aggregation die Voraussetzung für spätere Vesikelfusion bildet.

Ferner wäre die Durchführung eines weiteren Fusions-Assays, dem so genannten „Contentmixing-Assay“ möglich. Hierbei würde eine Vesikelsorte einen fluoreszierenden

Stoff (im sauren Milieu ANTS) enthalten, die zweite Vesikelsorte den zugehörigen Quencher (im Falle von ANTS DPX). Bei Fusion käme es zur Durchmischung beider Substanzen und somit zum Quench der Fluoreszenz (vgl. 2.4.2).

Des Weiteren könnte ein „Leakage Assay“ durchgeführt werden, bei dem die Vesikel sowohl den fluoreszenten Farbstoff als auch einen Quencher enthalten würden. Hier würde die Fluoreszenz erst durch Dequenchen nach Austritt der Substanzen aus den Vesikeln auftreten. Mittels dieses Assays könnte ein Aufbrechen oder eine Umstrukturierung der Vesikel nachgewiesen werden

Vom GM2AP ist bekannt, dass es in der Lage ist, GM1 und GM2 zu binden und zwischen Membranen zu transferieren (Conzelmann et al., 1982a, Schwarzmann et al., 2005). Zudem wurden 1:1 Komplexe dieser Ganglioside und des GM2APs in Lösung nachgewiesen (Conzelmann et al., 1982a, Conzelmann und Sandhoff, 1979, Ran und Fanucci, 2009). Nur ein geringer Anteil der GM2-Aktivatorproteine scheint an Membranen gebunden zu bleiben (Ran und Fanucci, 2009). Da sich der größte Teil der GM2AP-Proteine in Lösung befindet scheint die im DLS beobachtete Vesikelfusion / -aggregation nicht die Hauptaufgabe des GM2-Aktivatorproteins zu sein.

Um die Funktion des GM2APs weiter zu untersuchen, wurde daher ein neuer Assay entwickelt. Dieser beruhte auf einer Kombination aus FRET-Messung und magnetischer Separation der Donor- und Akzeptorvesikel bzw. fusionierter Vesikel über Streptavidin-Biotin-Interaktion. Hierdurch sollten Erkenntnisse über die fusogenen Eigenschaften und den Lipidtransport durch das GM2AP gewonnen werden.

4.2.3 Grundlagen und Entwicklung eines kombinierten Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay mittels FRET und magnetischer Separation

Um die Eigenschaften des GM2APs und des rGM2AP-His6 genauer zu untersuchen, wurde ein neuer Assay entwickelt. Dieser setzt sich aus einem FRET-Teil und einer anschließenden Separation der Donorvesikel und fusionierter Vesikel mittels Streptavidin-überzogener Magnetkügelchen (BioMag[®]) zusammen.

Bis dahin wurden in unserer Abteilung drei verschiedene liposomale Assays zur Untersuchung von Lipidtransfer, bzw. Membranfusion eingesetzt. Im FRET-Transfer-Assay war die Detektion von Lipidtransfer unter Beobachtung der Kinetik möglich, jedoch keine klare Unterscheidung zwischen Vesikelfusion und Lipidtransfer. Im Transfer-Assay, bzw. im Fusions-Assay mittels magnetischer Separation konnten Aussagen über die jeweiligen

Endpunkte des Lipidtransfer, bzw. der Vesikelfusion gemacht werden, jedoch nicht über beide Vorgänge oder deren Kinetiken in Kombination.

Da durch den FRET-Transfer-Assay Erkenntnisse über die Kinetik des Vorganges in Echtzeit gewonnen werden können und über den Transfer-Assay und den Fusions-Assay nach magnetischer Separation Endpunktwerte für Lipidtransfer bzw. Vesikelfusion gemessen werden können, wurden diese drei Assays in einem Assay-System kombiniert. Der kombinierte Lipidtransfer-Membranfusions-Assay soll in Zukunft weiter optimiert und auch zur Untersuchung anderer LLBP eingesetzt werden.

Im FRET-Assay wird Fluoreszenzfreisetzung (Dequench) durch das GM2AP/rGM2AP-His6 in Echtzeit gemessen, die magnetische Separation ermöglicht die Unterscheidung zwischen Lipidtransfer und Vesikelfusion bzw. Aggregation.

Sowohl Lipidtransfer als auch Vesikelfusion werden in der Literatur oft mit einem FRET-Assay untersucht. Diese Assays enthalten NBD zu Rhodamin im Verhältnis 1:1 (Abdul-Hammed et al., 2010, Mattjus et al., 1999, Schwarzmann et al., 2005, Scott et al., 2003, Struck et al., 1981). In dem hier entwickelten Assay wurden die Bedingungen im FRET-Teil so gewählt, dass durch Erhöhung des Quencheranteils (4 mol% Rhodamin-PE und 2 mol% 2-NBD-GM1) der Dequench durch Fusion nur noch ca. 5% der im FRET maximal freisetzbaren Fluoreszenz erreicht (d.h. 5% der Fluoreszenzmenge von 6/7 der Fluoreszenz der äußeren Membranschicht von Vesikeln mit 2 mol% 2-NBD-GM1 ohne Quencher). Dieser Wert wurde nach Herstellung von Vesikeln im Lipidverhältnis von vollständig miteinander, im Verhältnis 1:6, fusionierten Donor- und Akzeptorvesikeln im FRET bestimmt (vgl. 5.2.4.3.2). Daher wird unter den hier gewählten Bedingungen der größte Teil der detektierbaren Fluoreszenz beim Transfer des fluoreszenz-markierten Lipides durch das LLBP von den Donorvesikeln in die Akzeptorvesikel freigesetzt. Steigt in der FRET-Messung die Fluoreszenz über den 5%-Wert („Basislinie vollständige Fusion“), so kann dieser Dequench nur durch Transfer des NBD-markierten Lipids hervorgerufen worden sein. Daher kann bei FRET-Kurven, die die Basislinie überschreiten, die Transferrate (durch die Steigung im annähernd linearen Anfangsbereich) abgeschätzt werden.

Der Assay basiert auf Donorvesikeln, die das zu transferierende Lipid in fluoreszenzmarkierter Form enthalten, im Falle des GM2APs 2-NBD-GM1.

Im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen NBD-markierten Lipiden, bei denen die Eigenschaften des Lipides durch die Positionierung der NBD-Gruppe an der ω -Position der Acylkette oder des Sphingosinrestes beeinflusst werden, besitzt das 2-NBD-GM1 die NBD-

Gruppe in 2-Stellung der Acylkette (Abb. 15, Schwarzmann et al., 2005). D.h. die Eigenschaften des Lipids mit einer polaren Kopfgruppe und hydrophoben Ceramidanker bleiben erhalten. Es ist sehr wichtig, dass das Fluorophor die Eigenschaften des Lipides nicht verändert. Im Falle des 2-NBD-GM2 bzw. 2-NBD-GM1 konnte nachgewiesen werden, dass es durch das GM2AP entsprechend dem endogenen GM2 transferiert wird und dass die NBD-Gruppe keinen Einfluss auf den enzymatischen Abbau hat (Schwarzmann et al., 2005). Zudem besitzt 2-NBD-GM1 eine „low off rate“, d.h. es transferiert nicht spontan in andere Membranen (Schwarzmann et al., 2005).

Der zweite Teil des Assays besteht in der magnetischen Trennung von Donorvesikeln und fusionierten Vesikeln von den Akzeptorvesikeln. Dazu enthalten nur die Donorvesikel Biotin-PE, so dass sie durch Streptavidin-überzogene Magnetkügelchen von den Akzeptorvesikeln separierbar sind. Mit Donorvesikeln fusionierte Vesikel enthalten demnach auch Biotin-PE und werden ebenfalls aus der Lösung gezogen. Die Akzeptorvesikel sind nicht pelletierbar, und verbleiben nach der magnetischen Trennung im Überstand. Sie sind durch [^{14}C]-PC, radioaktiv markiert und so im Überstand nachweisbar. Es konnte nachgewiesen werden, dass [^{14}C]-PC nicht durch GM2AP transferiert wird (Abb. 33).

Der bereits etablierte Fusions-Assay (Abdul-Hammed et al., 2010) wird im Verhältnis von 1:1 durchgeführt um eine möglichst genaue Auswertung der Fusion zu gewährleisten, da bei Verhältnissen von z.B. 1:5 die Ergebnisse dadurch beeinflusst werden, dass auch viele Akzeptorvesikel miteinander fusionieren und diese Fusion nicht in die Auswertung eingeht. Um die Vesikelfusion im Anschluss an die FRET-Messung genau bestimmen zu können, wäre es daher wünschenswert gewesen, in diesem Verhältnis auch im FRET-Assay arbeiten zu können. Jedoch zeigte sich, dass die durch rGM2AP-His6 freigesetzte Fluoreszenz beim Verhältnis von Donorvesikel zu Akzeptorvesikel von 1:1 so gering war, dass sie kaum messbar war. Im nachhinein zeigte sich, dass dies durch den Quench der NBD-Fluoreszenz in der großen Anzahl fusionierter Vesikel begründet war, da bei Gleichverteilung ohne Fusion 25% (50% der äußeren Membranhälfte) des eingesetzten 2-NBD-GM1 in den Akzeptorvesikeln vorliegen sollte und diese Fluoreszenz zwar gering, aber detektierbar wäre. Da unter diesen Voraussetzungen kein Fluoreszenzanstieg im FRET-Assay messbar war mussten Bedingungen gefunden werden, welche die Detektion der Fluoreszenz ermöglichten. Da das 2-NBD-GM1 nur in begrenzten Mengen vorlag wurde von einer Konzentrationserhöhung der 2-NBD-GM1-Menge im Vesikel abgesehen. Demnach musste das Verhältnis der Vesikel im Assay verändert werden um eine bessere Transferausbeute zu erzielen.

Das grundlegende Prinzip eines Transfer-Assays ist, dass ein Überschuss von Akzeptor gegenüber Donorvesikeln vorliegt, wodurch eine bessere Detektierbarkeit des zu transferierenden Lipids gewährleistet wird. In unserer Arbeitsgruppe hatte sich bis dato ein Verhältnis von Donor- zu Akzeptorvesikel von 1:5 als praktikabel erwiesen (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007, Schwarzmann et al. 2005). Nach diversen Kombinationsversuchen, bei denen versucht wurde einen möglichst geringen Anteil an Akzeptorvesikeln einzusetzen und gleichzeitig eine gut detektierbare Fluoreszenzstärke durch den Transfer von 2-NBD-GM1 zu erhalten, stellte sich ein Verhältnis von 1:6 als gute Voraussetzung für die Detektion von durch Transfer freigesetzter Fluoreszenz heraus.

Des Weiteren zeigte sich, dass es durch Vesikelfusion bei Verwendung von 2 mol% NBD-GM1 und 2 mol% Rhodamin-PE beim eingesetzten Verhältnis von Donorvesikeln zu Akzeptorvesikeln von 1:6 zu einem hohen Fluoreszenzanstieg durch Dequench nach Verdünnung bei Fusion kommen konnte (Daten nicht abgebildet). Dieses wurde experimentell durch Herstellung von Liposomen mit einer Lipidzusammensetzung von im Verhältnis 1:6 fusionierten Donor- und Akzeptorvesikeln ermittelt.

Da es das Ziel war einen Assay zu entwickeln, bei dem im FRET-Teil nur eine begrenzte und definierte Menge Fluoreszenz durch Vesikelfusion auftritt („Basislinie vollständige Fusion“) wurde die Konzentration des Rhodamin-PE von den bis dahin im FRET-Assay eingesetzten 2 mol% (Schwarzmann et al., 2005) auf 4 mol% erhöht. Hier wurde bei einer nachgestellten Vesikelfusion im Verhältnis von 1:6 nur sehr geringe Fluoreszenz in Folge von Dequench durch Verdünnung freigesetzt (5 % der im FRET-Assay detektierbaren Fluoreszenz = „Basislinie vollständige Fusion“). Dies bedeutet zudem, dass mit steigender Vesikelfusion die im FRET detektierbare Fluoreszenz sinkt, da z.B. Akzeptorvesikel, welche schon transferiertes 2-NBD-GM1 enthalten, mit Donorvesikeln fusionieren, wobei die gesamte NBD-Fluoreszenz durch das im Überschuss vorhandene Rhodamin gequench wird.

Nun wurde auch deutlich, dass bei den früher eingesetzten Bedingungen (2 mol% 2-NBD-GM1, 2 mol% Rhodamin-PE, Verhältnis Donor- zu Akzeptorvesikel 1:5 (Schwarzmann et al., 2005)) im FRET nicht vollständig zwischen Transfer und Vesikelfusion unterschieden werden konnte, so dass ein Teil der dort detektierten Fluoreszenz durch partiellen Dequench bei Vesikelfusion entstanden sein könnte. Rein rechnerisch erscheinen jedoch die dort gemessenen Fluoreszenzwerte durch reinen Transfer von 2-NBD-GM1 begründbar.

Die Menge an einzusetzender BioMag[®]-Lösung und die einzusetzende Menge an Biotin-PE mussten den Bedingungen angepasst werden, die sich nach Optimierung der FRET-

Messungen ergaben. Experimentell wurden 100 µl BioMag[®]-Suspension (Konzentration: 5 mg/ml) und 4 mol% Biotin-PE in den Donorvesikeln als ausreichend ermittelt, um auch im Falle von vollständiger Vesikelfusion alle Vesikel aus der Lösung ziehen zu können (Daten nicht abgebildet).

Bei ersten Messungen mit GM2AP und rGM2AP-His6 stellte sich heraus, dass die detektierbare Fluoreszenz im FRET bei Verwendung von GM2AP durch Erhöhung der Ionenstärke anstieg. Daher wurden die Messungen nicht, wie in unserer Abteilung üblich, in 50 mM Natriumcitrat, pH 4,2 durchgeführt (Locatelli-Hoops et al., 2006, Rimmel et al., 2007, Schwarzmann et al., 2005, Wendeler et al., 2003b) sondern in 50 mM Natriumcitrat + 113 mM Natriumchlorid, pH 4,2. Dieser Puffer wurde gewählt, da er in der Ionenstärke nahe an physiologischer Kochsalzlösung liegt und dieses als bestmögliche Annäherung an physiologische Bedingung angesehen wird.

Dass es im FRET-Assay nicht durch spontane Vorgänge ohne Proteinzugabe zum Auftreten von Fluoreszenz kam wurde durch eine interne Kontrolle ausgeschlossen. Donorvesikel und Akzeptorvesikel wurden zu Beginn der Messung mit Puffer zusammengegeben, vermischt und die Fluoreszenz fünf Minuten lang gemessen („Vesikelpräinkubationszeit“). Hierbei trat immer ein äußerst geringer, konstanter Fluoreszenzwert auf, der der Fluoreszenz reiner Donorvesikel in Lösung entsprach. Ohne Proteinzugabe kam es nicht zu einem Anstieg der detektierbaren Fluoreszenz, d.h. die Liposomen fusionierten nicht spontan und das 2-NBD-GM1 verließ nicht spontan die Membran. Dieses entsprach der Erwartung, da das hier eingesetzte 2-NBD-GM2 eine „*low-off-rate*“ besitzt (Schwarzmann et al., 2005). Der in der „Vesikelpräinkubationszeit“ gemessene Wert wurde als Hintergrundfluoreszenz von der eigentlichen Messung abgezogen. Im Anschluss wurde das Aktivatorprotein zugegeben (da das Volumen der Probe sehr gering war (0,5 % des Assayvolumens) wurde kein Verdünnungseffekt detektiert) und der Fluoreszenzanstieg im FRET kontinuierlich gemessen, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt, d.h. die Kurve ein Plateau erreicht hatte. Dieser Punkt war je nach Einsatz von GM2AP oder rGM2AP-His6 und je nach Vesikelzusammensetzung unterschiedlich und wurde nach 15-160 Minuten erreicht.

In dem aufgebauten kombinierten Assay könnten noch weitere Vorgänge die Auswertung der Daten erschweren. Es ist z.B. bekannt, dass das GM2AP Komplexe mit Lipiden bilden kann (Conzelmann et al., 1982a, Conzelmann und Sandhoff, 1979, Mathias et al., 2009, Ran und Fanucci, 2009). So konnte z.B. in einer Kontrollmessung gezeigt werden, dass wenn nach

Inkubation mit rGM2AP-His6 alle Vesikel aus der Lösung gezogen werden Fluoreszenz im Überstand zurück bleiben kann. Hier wurde dann auch Protein im Überstand nachgewiesen (Daten nicht abgebildet). Hierbei könnte es sich folglich um Komplexe aus GM2AP und 2-NBD-Lipid handeln. Von den reinen Mengenverhältnissen Aktivatorprotein zu 2-NBD-GM1 her wäre es möglich, dass im verwendeten Assaysystem 50% des transferierbaren 2-NBD-GM1 in 1:1 Komplexen an den Aktivator gebunden werden. Der detektierte Lipidtransfer setzt sich demnach aus 1:1 Komplexen aus Aktivator und 2-NBD-GM1 und in Akzeptorvesikel inseriertem 2-NBD-GM1 zusammen. Lösliche Aktivator-Lipid-Komplexe (Conzelmann et al., 1982a) befinden sich nach der magnetischen Separation zusammen mit den Akzeptorvesikeln im Überstand und werden als Lipidtransfer gewertet. Hier ist fraglich, ob die eventuelle Bindung an das GM2AP die Fluoreszenz des NBDs beeinflussen könnte.

Ein weiteres Phänomen ist die Aggregation von Vesikeln. Im FRET Assay dürfte eine Aggregation auf Grund der Nähe der Lipide für die Energieübertragung ($1/r^6$) keine Auswirkung haben. Jedoch werden bei der Trennung mit den magnetischen Kügelchen nicht nur die Biotin-PE enthaltenden Donorvesikel und fusionierte Akzeptorvesikel herausgezogen, sondern möglicherweise auch Aggregate aus Akzeptor- und Donorvesikeln.

Der Punkt der Gleichgewichtseinstellung wurde als Endpunkt der Messung gewählt, da ursprünglich der Endzustand der Reaktion untersucht werden sollte. Hierbei sollte die Auswirkung der Vesikelzusammensetzung, der Proteinkonzentration und die Transfereigenschaften varianter Proteine untersucht werden.

Nachdem man zunächst davon ausgegangen war, dass es sich bei dem GM2AP um ein reines Transferprotein handelte, stellte sich nach ersten Messungen heraus, dass es zudem einen erheblichen Teil Vesikelfusion vermittelt (Abb. 37 D, Abb. 39-45 F). Eigentlich hatte man gehofft, durch Einsatz geeigneter Bedingungen und Kontrollen, die Transfer- und Fusionsrate sowohl aus den FRET-Daten als auch aus den Endpunktdaten nach magnetischer Trennung bestimmen zu können. Da Vesikelfusion und Lipidtransfer nebeneinander ablaufen wurde die Auswertung erschwert. Jedoch läuft, wie sich in unseren Messungen zeigte, der Lipidtransfer offensichtlich schneller als die Vesikelfusion ab (Abb. 42 F). Daher erlaubt die „*real time*“ FRET-Messung eine Abschätzung der Transferrate aus dem annähernd linearen Anfangsverlauf, wenn der Dequench größer als 5% der absolut erreichbaren Fluoreszenz ist, d.h. die „Basislinie vollständige Fusion“ überschritten wird.

Durch den hohen Anteil an Fusion verbleiben nach der magnetischen Trennung nur wenige Akzeptorvesikel im Überstand, und somit auch nur geringe Mengen an 2-NBD-GM1. Es

muss davon ausgegangen werden, dass die detektierte Menge nur einen Teil des tatsächlich vom Aktivatorprotein transferierten 2-NBD-GM1 ausmacht. Durch erste zeitgestaffelte Messungen konnte gezeigt werden, dass der Transfer des 2-NBD-GM1 relativ schnell ist und parallel zur Vesikelfusion stattfindet (Abb. 42 F). Dieses bedeutet, dass ein Teil der Akzeptorvesikel, welche transferiertes 2-NBD-GM1 enthalten, mit Donorvesikel fusioniert und durch die BioMag[®]-Behandlung aus der Lösung gezogen wird. Das in diesen fusionierten Vesikeln enthaltene 2-NBD-GM1 kann im Überstand nicht mehr detektiert werden.

Eigentlich sollte im Endzustand immer eine Gleichverteilung des 2-NBD-GM1 zwischen den Vesikeln herrschen. Geht man davon aus, dass alle mit Donorvesikeln fusionierten Akzeptorvesikel die gleiche Menge an 2-NBD-GM1 aufgenommen hatten wie die im Überstand detektierten, und der Überstand damit repräsentativ für den Transfer ohne das Auftreten von Vesikelfusion ist, so kann man für den tatsächlich Transfervorgang von 2-NBD-GM1 einen theoretischen Annäherungswert berechnen. Hierbei werden die fusionierten Vesikel in die Rechnung mit einbezogen. Haben z.B. 40 % der Vesikel fusioniert und im Überstand wurde ein Wert von 6 pmol 2-NBD-GM1 bestimmt, so kann man davon ausgehen, dass sich diese 6 pmol in den frei vorkommenden 60 % der Akzeptorvesikel befinden. Demnach würde der theoretische Transferwert für 100% Akzeptorvesikel folgendermaßen berechnet: $6 \text{ pmol} / 60 \% \times 100 \% = 10 \text{ pmol}$.

Diese Hochrechnung macht jedoch nur Sinn, solange die Vesikelfusion 40% nicht überschreitet, da durch die Hochrechnung mit kleinen Werten das Ergebnis verfälscht werden würde.

War das Plateau im FRET-Assay erreicht, wurde der Ansatz durch Zugabe von 1M Tris-HCl pH 8 auf pH 7 eingestellt und mit den BioMag-Kügelchen auf Eis inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist ein weiterer Lipidtransfer auszuschließen. Donorvesikel und fusionierte Vesikel wurden durch Biotin-Streptavidin-Interaktion im Magnetständer aus der Lösung entfernt. Im Anschluss wurden sowohl Radioaktivität, als auch Fluoreszenz in Überstand und Pellet gemessen und über Quantifizierung der Prozentsatz der Vesikelfusion und des 2-NBD-GM1-Transfers bestimmt. Da hier die Fluoreszenzwerte des Endpunktes im FRET-Assay (Werte oberhalb der „Basislinie vollständige Fusion“ entsprechen dem Transfer von 2-NBD-GM1) teilweise nicht deckungsgleich mit der Fluoreszenz im Überstand nach der magnetischen Separation sind, sondern höher, wäre es möglich, dass die Vesikelfusion während der 20 minütigen Inkubation bei pH 7 auf Eis weiter abläuft und somit weitere Akzeptorvesikel aus dem Überstand gezogen werden. Dieses ist jedoch extrem

unwahrscheinlich, da bei den pH-abhängigen Messungen (Abb.44) bei pH 7 nach 95 minütiger Inkubation bei 28 °C und anschließender 20 minütiger Inkubation auf Eis für GM2AP nur ca. 10% Fusion und für rGM2AP-His6 23% Fusion detektiert werden (Abb. 44 F). Wahrscheinlicher ist, dass durch unspezifische Vesikelaggregation auch ein Teil der nicht fusionierte Akzeptorvesikel aus der Lösung gezogen wird. Die Aggregation von Vesikeln würde im FRET-Assay nicht zu einem Quench des transferierten 2-NBD-GM1 führen, jedoch würde das transferierte 2-NBD-GM1 in den aggregierten Vesikel bei der magnetischen Separation dem Überstand entzogen, so dass der Transfer von 2-NBD-GM1 im Überstand zu niedrig detektiert würde. Des Weiteren wäre auch ein Einfluss des pH-Wertes auf die Stärke der Fluoreszenzaussendung denkbar.

Da das Material der BioMag[®]-Kügelchen im Szintillationszähler quencht, und so den Wert der gemessenen radioaktiven Strahlung senkt, wurden die Lipide mit Chloroform/Methanol/H₂O 1:2:0,5 v:v:v von den BioMag-Kügelchen gelöst und in dieser Lösung die Radioaktivität vermessen. Die hierbei entstehenden Verluste wurden durch gleiche Aufarbeitung einer Referenzprobe gleichbehandelter Liposomen der gleichen Charge ohne Protein bestimmt.

4.2.4 Transfer und Fusionseigenschaften vom GM2AP und rGM2APs

4.2.4.1 Messungen mit GM2AP aus Gewebe

Ein hoher Gehalt von Cholesterol und das Fehlen von BMP entsprechen den an der Zellmembran und den frühen Endosomen herrschenden Gegebenheiten. Zudem sind diese Membranen durch das Vorkommen von Sphingomyelin gekennzeichnet.

Die Lipidzusammensetzung der intraendosomalen und intralysosomalen Vesikel unterscheidet sich maßgeblich von der der Plasmamembran oder äußerer Membranen der Organellen. BMP ist eine Hauptkomponente der inneren Membranen (Kobayashi et al., 1999, Möbius et al., 2003), wohingegen der Cholesterolgehalt erniedrigt ist Friedland (Friedland et al., 2003, Möbius et al., 2003)

4.2.4.1.1 Simulation der Gegebenheiten nahe der Zellmembran

4.2.4.1.1.1 Auswirkungen des hohen Cholesterolgehaltes und des Fehlen von BMP

Die Zugabe von Cholesterol zur Basisliposomenpräparation (DOPC-Liposomen + Markerlipide) wirkt sich stabilisierend auf die Liposomen aus. Dieses stimmt mit den grundlegenden Eigenschaften des Cholesterol überein: es stabilisiert die flexible Biomembran

dadurch, dass es mit den Lipiden hydrophobe Wechselwirkungen eingeht. Bei einer Cholesterolkonzentration von 20 mol% in Abwesenheit von BMP findet sowohl Transfer von 2-NBD-GM1 statt, als auch Vesikelfusion. Der Lipidtransfer bzw. die abgeschätzte Transferrate sind im Vergleich mit DOPC-Basisliposomen stark erhöht und die Vesikelfusion stark herabgesetzt (Abb. 40). Dieses scheint der Fall zu sein, da die DOPC-Basis-Vesikel nur durch die Markerlipide (Biotin-PE und 2-NBD-GM1) minimal negativ geladen sind und sich gegenseitig nicht stark abstoßen. Es handelt sich hier um eine extrem unphysiologische Lipidzusammensetzung. Da ihnen zudem die stabilisierende Wirkung des Cholesterols fehlt wird die Aggregation und Vesikelfusion begünstigt und der Lipidtransfer ist gering.

4.2.4.1.1.2 Auswirkungen des Sphingomyelins

Der Sphingomyelingehalt (10 mol%) hatte auf das GM2AP hemmende Wirkung. Die Transferrate, und somit die im FRET erreichte Fluoreszenz, wurde herabgesetzt (Abb. 45). Dies war der Fall, obwohl die Vesikel 10 mol% DO-BMP enthielten, was normalerweise zu einem Anstieg des 2-NBD-GM1-Transfers führt.

Auch die im Überstand nach magnetischer Separation detektierte 2-NBD-GM1-Menge wurde durch Sphingomyelin gesenkt (Abb. 45 E). Sphingomyelin scheint demnach eine sehr wichtige regulatorische Rolle im GM2-Abbau zu erfüllen.

Dieses entspricht den Erwartungen, da Sphingomyelin den Membranen auf dem Weg zum Lysosom durch den Abbau durch die saure Sphingomyelinase mit einem ein pH-Optimum von 5,5 (Linke et al., 2001b) entzogen wird. Durch den Abbau des Sphingomyelins scheint es zudem erst ermöglicht zu werden, dass das Cholesterol den Membranen durch NPC1 entzogen wird (Abdul-Hammed et al., 2010).

Die Vesikelfusion wurde durch Sphingomyelin nahezu nicht beeinflusst (Abb. 45 F).

Insgesamt stellt eine der Zellmembran ähnliche Lipidzusammensetzung mit hohem Cholesterol- und Sphingomyelingehalt keine guten Voraussetzungen für den Transfer von 2-NBD-GM1 dar. Als weiteres Hindernis für den Abbau tritt *in vitro* noch ein hoher pH-Wert von ca. 7 hinzu. In unseren Messungen zeigte sich, dass ein hoher pH sich sehr negativ auf den Transfer von 2-NBD-GM1 auswirkt (vgl. 3.4.10).

Dieses stimmt mit der Erwartungshaltung auf Grund der physiologischen Gegebenheiten in der Zelle überein, da Lipidtransfer/-extraktion nur bei bestimmten Lipidzusammensetzungen

möglich ist, und zudem über den pH der Organellen reguliert ist. Dieses wird in den nachfolgenden Punkten ausführlicher diskutiert.

4.2.4.1.2 Simulation der Gegebenheiten in den Endosomen

Das Cholesterol wird den Membranen auf dem Weg zum Lysosom auf Ebene des späten Endosoms durch NPC1 und NPC2 entzogen (Friedland et al., 2003, Wang, 2010). Der Abbau von Substraten wird so durch den Cholesterolgehalt der Membranen reguliert. Durch hohen Cholesterolgehalt werden Reaktionen, welche noch nicht stattfinden sollen, unterbunden. z.B. können Sap-A und Sap-B bei hohen Cholesterolkonzentrationen keinen Umsatz ihrer Substrate vermitteln (Locatelli-Hoops et al., 2006, Rimmel et al., 2007). Erst wenn das Cholesterol den Membranen in den Lysosomen entzogen wurde, laufen die Abbaureaktionen, und in unserem Fall der Lipidtransfer, in gewünschtem Maß ab.

Durch die membranverdichtende Wirkung des Cholesterol wird den abbauenden Enzymen und Aktivatoren die Substratbindung bzw. der Substratabbau erschwert, bzw. unmöglich gemacht. In Abb. 41 wird dieses für den GM2AP gezeigt. In Gegenwart von 20 mol% DO-BMP wird die abgeschätzte Transferrate und somit die Höhe der erreichten Endpunktfluoreszenz im FRET-Assay durch Zugabe von Cholesterol zur Vesikelpräparation stark herabgesetzt. (41 C). Zudem wird die Vesikelfusion erhöht und der Nettolipidtransfer nach der magnetischen Trennung ist verringert (Abb.41).

Dieses wird auch durch verschiedene Messungen unserer Abteilung bestätigt, welche zeigen, dass die Wirkung anderer membranaktiver Aktivatorproteine durch Cholesterol beeinträchtigt wird (Locatelli-Hoops, 2006, Rimmel et al., 2007). Zudem zeigte sich, dass bei der neuronalen Speicherkrankheit Niemann-Pick Typ C, welche auf einem Defekt des NPC2-Proteins beruht, nicht nur Cholesterol in den Lysosomen von Leber und Gehirn akkumuliert, sondern auch Ganglioside, wie z.B. GM2, angereichert werden (Kaye, 2011, Zervas, 2001).

Anhand von Vesikeln mit 20 mol% Cholesterol und DO-BMP (10-20 mol%) zeigte sich, dass die abgeschätzte Transferrate des 2-NBD-GM1-Transfers durch DO-BMP gesteigert wurde und sich demnach der zum Ende der FRET-Messung erreichte Fluoreszenzwert erhöht (Abb. 42). Diese Beobachtung wurde durch vorhergegangene Experimente unterstützt, bei denen beobachtet wurde, dass das Vorhandensein von BMP in den Vesikeln den GM2-Abbau durch HexA in Anwesenheit von GM2AP massiv steigert (Werth et al., 2001)

Der nach der magnetischen Separation im Überstand gemessene Transfer von 2-NBD-GM1 wurde im Falle des GM2APs aus Gewebe durch Zugabe von DO-BMP erhöht (Abb. 42 E).

DO-BMP führt demnach zu einer Erhöhung der 2-NBD-GM1-Transferrate. Dies wurde durch unabhängige Messungen bestätigt, bei denen der Transfer von GM2 aus Cholesterol-haltigen Vesikeln durch BMP erhöht wurde, BMP für den Transfer von GM2 durch GM2AP jedoch nicht essentiell notwendig war (Ran und Fanucci, 2009).

Da BMP aber gehäuft in den intralysosomalen Membranen auftritt und in den sonstigen zellulären Membranen nicht nachweisbar ist (Möbius et al., 2003), kann davon ausgegangen werden, dass es intralysosomal eine essentielle Rolle für den hydrolytischen Abbau von Gangliosiden spielt.

4.2.4.1.3 Simulation der Gegebenheiten beim intralysosomalen Gangliosid-Abbau

Niedriger Gehalt an Cholesterol und Sphingomyelin aber eine hohe Konzentration von BMP zeichnet die Membranen der intralysosomalen Vesikel aus. Zudem sind die lysosomalen Kompartimente durch einen niedrigen pH gekennzeichnet.

Die bei den Messungen mit DOPC-Liposomen bei pH 4,2 beobachteten elektrostatischen Wechselwirkungen wurden durch die Zugabe des, bei pH 4,2 negativ geladenen BMPs ((Wilkening et al., 2000), pKa BMP: 1-3, (Marouf, 2008)), verstärkt. Eine BMP-Konzentration von 20 mol% (vgl. Abb. 40) erhöht in Abwesenheit von Cholesterol und Sphingomyelin die Transferrate. Dies wird durch die verstärkte Interaktion des anionischen BMPs und des bei pH 4,2 kationischen GM2APs bedingt (experimentell bestimmter isoelektrischer Punkt: 4,8 (Conzelmann und Sandhoff, 1979) oder anhand der Aminosäuresequenz berechnet: 4,88 (ExpASy ProtParam), vgl. Abb. 49).

Im Vergleich zu DOPC-Vesikeln reduziert ein DO-BMP-Gehalt von 20 mol% die durch GM2AP vermittelte Vesikelfusion stark (von 90 auf 40 %). BMP wirkt demnach stabilisierend auf die Liposomen. In der Literatur wird zudem die membranverdichtende Wirkung des BMPs beschrieben. Demnach sind BMP-haltige Vesikel immer kleiner als 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin-Vesikel (POPC-Vesikel), die durch gleich große Poren hergestellt wurden (Frederick et al., 2009) und besitzen eine abgeflachte Form (Rommel, 2007). Zudem verändert sich die Größe von POPC-Vesikeln mit pH-Änderung. Ihre Größe nimmt mit sinkendem pH zu, während die von BMP-haltigen Vesikeln nahezu unverändert bleibt (Frederick et al., 2009).

Dies lässt vermuten, dass die durch das GM2AP hervorgerufene Vesikelfusion unter physiologischen Bedingungen durch den hohen BMP-Gehalt der intralysosomalen Membranen nicht begünstigt wird.

Der im Überstand nach der magnetischen Separation gemessene Nettotransfer von 2-NBD-GM1 wird durch das Vorhandensein von DO-BMP mehr als verdoppelt.

Wie zu erwarten wurde der höchste durch GM2AP (1,5 µg) vermittelte Transfer von 2-NBD-GM1 in DO-BMP-haltigen (20 mol%) und Sphingomyelin- und Cholesterol-freien Liposomen gemessen (Abb. 39).

4.2.4.1.4 pH-Abhängigkeit

Von der Plasmamembran kommend steigt während der Endozytose in den intraendosomalen und intralysosomalen Vesikeln der Gehalt an BMP an, während der Gehalt von Sphingomyelin und Cholesterol sinkt. Parallel dazu werden die Organellen azidifiziert, die pH-Werte verändern sich von ca. pH 7,0 an der Plasmamembran bis hin zu pH 4,2 im Lysosom.

Parallel dazu steigen sowohl der GM2AP-vermittelte 2-NBD-GM1 Transfer als auch die Vesikelfusion an. Mit steigendem pH verliert das GM2AP langsam seine bei pH 4,2 stark positive Oberflächenladung (experimentell bestimmter isoelektrischer Punkt: 4,8 (Conzelmann und Sandhoff, 1979)), was seine Interaktion mit den Vesikeln stört.

Der pH-Wert des Lysosoms liegt zwischen 4 und 5,5 (Coffey und De Duve, 1968, Mellman et al., 1986). Dies gilt auch für die pH-Optima der lysosomalen Exohydrolasen, z.B. pH 4,7 für die GM1-β-Galaktosidase (Hanada und Suzuki, 1979), pH 4,5 für die Arylsulfatase A (Stinshoff und Jatzkewitz, 1975) oder pH 3,8-4,3 für die saure Ceramidase (Bernardo et al., 1995). Diese Enzyme, deren Reaktionen von Sap-B oder -D stimuliert werden, sind demnach bei dem in Anlehnung an frühere Experimente (z.B. Wilkening et al., 2000) gewählten „lysosomalen“ pH-Wert von 4,2 aktiv. Der niedrige pH-Wert ist z.B. für die Membranbindung und für die Lipidextraktion durch rSap-B-His4 essentiell. Lipidextraktion konnte bei rSap-B-His4 bei neutralen Liposomen bei pH 5,5 und bei BMP-haltigen bei pH 7,0 nicht mehr beobachtet werden (Rommel, 2007).

Für die HexA liegt das pH-Optimum bei 4,4 (Grebner et al., 1986). Die Umsetzung von GM2 zu GM3 erfolgte in Anwesenheit von HexA und GM2AP am besten bei pH 4,2 (Conzelmann und Sandhoff, 1979). Demnach ist es nicht verwunderlich dass bei pH 4,2 die höchste Transferrate von 2-NBD-GM1 gemessen wurde und bei pH 7 die geringste.

4.2.4.1.5 Einfluss der Ionenstärke auf die Eigenschaften des GM2AP

Eine Erniedrigung der Ionenstärke bewirkte bei GM2AP verstärkte Vesikelfusion und setzte die Transferrate herab. Die niedrige Ionenstärke sollte die elektrostatische Anziehung zwischen positiv geladenem GM2AP und der negativen, BMP-haltigen Membran fördern.

Da es bekannt ist, dass zweiwertige Ionen wie Ca^{2+} die Vesikelfusion fördern wurden diese in den eingesetzten Puffern nicht verwendet.

4.2.4.1.6 Zusammenfassung der Beobachtungen am GM2AP aus Gewebe

GM2AP wurde ursprünglich als essentieller Faktor für den durch die HexA katalysierten Abbau des Gangliosids GM2 entdeckt (Conzelmann und Sandhoff, 1978). Seine erbliche Defizienz führt beim Menschen zu einer bereits im Kindesalter tödlichen, neurodegenerativen Gangliosid Speicherkrankheit (GM2-Gangliosidose).

Die hier durchgeführten „*in vitro*“ Analysen zeigten, dass das GM2AP nicht nur an der Phasengrenzfläche der intralysosomalen Membranen der HexA den Abbau ermöglicht (Conzelmann und Sandhoff, 1978), sondern unter lysosomalen Bedingungen Lipidvesikel desintegrieren (Plasmonresonanzmessungen, Abb. 30), Lipidvesikel fusionieren und Ganglioside wie 2-NBD-GM1 zwischen Lipidvesikel transferieren kann (Abb. 37-45). Diese Eigenschaften werden durch pH-Wert (Abb. 44), Ionenstärke (Abb. 43) und die Lipidzusammensetzung der Vesikelmembranen entscheidend beeinflusst. DO-BMP stimuliert den Lipidtransfer (Abb. 39 / 42), Sphingomyelin hemmt ihn (Abb. 45). Steigender Cholesterolgehalt in DO-BMP-haltigen Vesikeln senkt die Transferrate und erhöht die Vesikelfusion (Abb. 41).

Die höchste Transferrate wird mit 20 mol% DO-BMP, 0 mol% Cholesterol und 0 mol% Sphingomyelin bei pH 4,2 gemessen, was den physiologischen Abbaubedingungen entspricht.

4.2.4.2 Auswirkungen des Hexahistidin-Restes

Verschiedene Plasmonresonanzmessungen zeigten, dass das rGM2AP-His6 im Gegensatz zum endogenen GM2AP - unabhängig von seiner Konzentration, der Lipidzusammensetzung der verwendeten Vesikel, des Puffersystems und des pH-Wertes - die Fähigkeit zur Desintegration von Vesikeln verloren hat. Der im sauren stärker kationische rGM2AP-His6 scheint verstärkt an die anionischen Vesikel anzubinden.

Beim ersten Vergleich der beiden Proteinpräparationen (GM2AP und rGM2AP-His6) im kombinierten Lipidtransfer-Membranfusions-Assay mit Basisvesikeln, die nur aus DOPC und den Markerlipiden bestanden bei pH 4,2 (vgl. Abb. 39) zeigte sich dass rGM2AP-His6 im FRET-Assay eine höhere Transferrate besitzt, d.h. eine schnellere und höhere Fluoreszenzfreisetzung erfolgt, als bei GM2AP.

Bedingt durch die eingesetzten Markerlipide sind die DOPC-Basis-Vesikel leicht negativ geladen. Neben dem zu 2 mol% in den Donorvesikeln vorhandenem Gangliosid GM1, besitzt auch das Biotin-PE, welches zu 4 mol% in den Donorvesikeln enthalten ist bei pH 4,2 eine leicht negative Ladung.

Die bei rGM2AP-His6 erhöhte Transferrate lässt sich dadurch begründen, dass die Interaktion zwischen den leicht negativ geladenen Vesikeln und dem Protein durch den bei pH 4,2 sechsfach positiv geladenen Hexahistidin-Rest beschleunigt wird.

Diese ersten Messungen an Liposomen mit einer einfachen, aber unphysiologischen Lipidzusammensetzung zeigten bereits, dass die Präparationen des rGM2AP-His6 und des GM2APs sich in ihren Eigenschaften auch in diesem Assay-System stark unterschieden.

Um sich den Gegebenheiten der Plasmamembran anzunähern, Vesikel mit hohem Cholesterolgehalt (20 mol%) ohne BMP verwendet, so zeigte sich, dass die Vesikelfusion nicht – wie im Falle des Proteins aus Gewebe – herabgesetzt wurde. Die Vesikelfusion wird demnach durch den Hexahistidin-Rest begünstigt (Abb. 40). Unter Verwendung des membranstabilisierenden Lipides Sphingomyelin, welches ebenfalls in der Plasmamembran vorkommt, verhielt sich rGM2AP-His6 ähnlich dem GM2AP aus Gewebe (Abb. 45). Die Transferrate im FRET wurde gesenkt. Die durch rGM2AP-His6 vermittelte Vesikelfusion war jedoch weiterhin etwas stärker als die durch GM2AP.

4.2.4.2.2 Messungen mit rGM2AP-His6 unter Bedingungen, welche die Gegebenheiten der späten Endosomen simulierten

Bei Messungen mit DO-BMP- (20 mol%) und Cholesterol-haltigen (0-20 mol%) zeigte sich, dass der Hexahistidinrest die Fluoreszenzfreisetzung im FRET-Assay stark beschleunigte (25 min. statt 150 min) (Abb. 41). Ansonsten verhielt sich der rGM2AP-His6 ähnlich den GM2AP. Dieser starke Einfluss des BMPs schien auf einer zusätzlichen elektrostatischen Interaktion des bei pH 4,2 sechsfach positiv geladenen Hexahistidin-Restes mit dem bei pH 4,2 negativ geladenen BMP begründet. Der isoelektrische Punkt des rGM2AP-His6 wurde mittels Internettool (ExpASy ProtParam) mit 6,13 berechnet. Somit wird der isoelektrische Punkt des GM2-Aktivatorproteins durch die angefügten Histidin-Reste stark verändert und seine positive Ladung bei pH 4,2 erhöht.

Zudem konnte anhand von Liposomen mit 20 mol% DO-BMP bei pH 4,2 gezeigt werden, dass es bei der Zugabe eines synthetischen Hexahistidin-Peptides zur Anlagerung dieses Peptides an die Vesikel kommt (Abb. 38). Diese zusätzliche elektrostatische Interaktion addiert sich im Falle des GM2AP-His6 zu der Interaktion des bei pH 4,2 anionischen DO-BMPs mit dem kationischen GM2AP und führt zu einer beschleunigten Anlagerung an die Lipidvesikel. Ein Transfer von 2-NBD-GM1 oder Vesikelfusion wurde durch das Hexahistidin-Peptid nicht vermittelt.

Wurden Vesikel mit 20 mol% Cholesterol und DO-BMP (0-20 mol%) verwendet, so zeigte sich der Einfluss des BMPs bei rGM2AP-His6 deutlicher als bei GM2AP. Die abgeschätzte Transferrate wurde durch DO-BMP stark erhöht (Abb. 42). Dies scheint wiederum auf der zusätzlichen elektrostatischen Interaktion des Hexahistidin-Restes mit dem BMP zu beruhen. Auf die Vesikelfusion durch rGM2AP-His6 hatte die DO-BMP-Zugabe keine signifikante Wirkung. Dieses ist nicht verwunderlich, da die Vesikelfusion mit 20 mol% Cholesterol ohne BMP nach 25 Minuten schon bei 90 % liegt.

Bei magnetischen Trennungen nach 5 und 10 Minuten (Abb. 42 F) stellte sich heraus, dass nach 5 und nach 25 Minuten die im Überstand detektierte Menge an 2-NBD-GM1 gering ist, nach 10 Minuten jedoch 2-NBD-GM1-Mengen im Überstand detektiert wurden, die nahe an den Mengen liegen, die mit dem aus Gewebe isolierte GM2AP nach 155 min gemessen wurden. Entsprechend war die Vesikelfusion nach 10 Minuten geringer als nach 25 Minuten

Bei längerer Inkubation des Versuchsansatzes verstärkt der Hexahistidin-Rest die fusogene Eigenschaft des GM2APs, so dass der Lipidtransfer, welcher zwischenzeitlich die Werte des aus Gewebe gereinigten Proteins erreicht, bei den durchgeführten Messungen in den Hintergrund tritt. Demnach könnte besonders für rGM2AP-His6 die Wahl eines früheren

Endpunktes von Interesse sein. In Zukunft sollen mit rGM2AP-His6 weitere zeitabhängige Messungen durchgeführt werden, um seine Wirkungsweise weiter zu untersuchen.

Die Bilanzierung der Messungen legt nahe, dass neben Lipidtransfer und Vesikelfusion noch weitere Prozesse wie z.B. Aggregation stattfinden könnten. Während durch Aggregation die FRET-Kurven nicht beeinflusst werden sollten, wäre es jedoch möglich, dass bei der magnetischen Separation aggregierte Vesikel zusammen mit fusionierten Vesikeln aus der Lösung gezogen werden. Wäre dieses der Fall, so würde der 2-NBD-GM1-Transfer nach magnetischer Trennung zu niedrig detektiert und die Vesikelfusion würde im Gegenzug höher erscheinen.

4.2.4.2.3 Messungen mit rGM2AP-His6 unter Bedingungen welche die Gegebenheiten an den intralysosomalen Membranen simulieren

In Abwesenheit der membranstabilisierenden Lipide Cholesterol und Sphingomyelin erhöhten 20 mol% DO-BMP in den Vesikeln die durch rGM2AP-His6 initiierte Fluoreszenzfreisetzung massiv. Der Fluoreszenzanstieg fand mit DO-BMP sehr viel schneller statt (Abb. 39). Dieses liegt wiederum in der zusätzlichen elektrostatischen Anziehung von Hexahistidin-Rest und DO-BMP bei pH 4,2 begründet.

Die durch rGM2AP-His6 vermittelte Vesikelfusion nimmt auch bei Einsatz DO-BMP-haltiger Vesikel nur leicht ab (von 90 auf 85%). Somit wird die Vesikelfusion von DO-BMP-haltigen Vesikeln durch die zusätzliche elektrostatische Interaktion – im Vergleich zu GM2AP aus Gewebe (85% im Vergleich zu 40%) - stark begünstigt, da die Anlagerung des Proteins an die Vesikel beschleunigt wird. Dennoch wurde auch die Transferrate des rGM2AP-His6 im Vergleich mit DOPC-Liposomen stark erhöht.

4.2.4.2.4 pH-Abhängigkeit der durch rGM2AP-His6 vermittelten Vorgänge

Da mit pH-Erhöhung die negative Ladung des Hexahistidin-Restes sukzessive verloren geht, wird die Annäherung der Liposomen an das Protein nicht mehr so stark gefördert. Dadurch sinkt die Vesikelfusionsrate des rGM2AP-His6 mit steigendem pH (4,2-7) und die Detektion des 2-NBD-GM1-Transfers wird zunehmend ermöglicht (Abb.44).

4.2.4.2.5 Einfluss der Ionenstärke auf die Eigenschaften des rGM2AP-His6

Auf Fusions- und Transfereigenschaften des rGM2AP-His6 hatte eine Veränderung der Ionenstärke annähernd keinen Einfluss (Abb.43). Ähnliches wurde auch schon zuvor in ersten Messungen beobachtet (Ran und Fanucci, 2009). Dieses kann über die kooperative Bindung

der in einem Punkt konzentrierten sechsfach positiven Ladung des Hexahistidin-Restes begründet werden. Geht durch die Ionenstärke eine der durch elektrostatische Interaktion bestehenden Verbindungen zum Liposom verloren, so bleiben fünf weitere elektrostatische Verbindungen zwischen Hexahistidin-Rest und Liposom bestehen. Während die nächste Bindung gestört wird, wird die zunächst gelockerte wieder hergestellt. Die Bindung des Proteins an das Liposom wird somit durch den Hexahistidin-Rest begünstigt und die Abhängigkeit von der Ionenstärke geht verloren.

Die Vesikelfusion ist auch bei hoher Ionenstärke durch die zusätzliche positive Ladung des Hexahistidin-Restes sehr hoch.

4.2.4.2 6 Zusammenfassung der Auswirkungen des Hexahistidin-Restes

Das Verhalten des GM2AP wird demnach, wie auch bei den Plasmonresonanzstudien, in diesem Assay-System durch den Hexahistidin-Rest stark beeinflusst. Da Anlagerungs- und Fusions- und Transferverhalten beeinflusst werden, die Abhängigkeit von der Ionenstärke verloren geht, und der Einfluss des pH-Wertes im Bezug auf den Transfer dem Protein aus Gewebe konträr ist, sollte, falls möglich, im Falle von membranaktiven Proteinen von der Expression mit Hexahistin-Rest Abstand genommen werden.

Diese Beobachtung bestätigt erste Vermutungen, in denen zum Ausdruck kam, dass ein Rest aus zehn Histidinen an einem rekombinanten GM2AP aus *E.coli* nicht nur Veränderungen in der TRP-Fluoreszenz des GM2APs hervorruft, sondern auch die Lipidextraktionsfähigkeiten bzgl. DDHPE (2-Dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) im pH-Profil beeinflusst (Ran und Fanucci, 2009). Hier wird des Weiteren die Vermutung geäußert, dass der Histidin-Rest mit den sauren Aminosäureresten des GM2APs selbst wechselwirken könnte und so dessen Funktion beeinträchtigt (Ran und Fanucci, 2009).

Nach unserer Vermutung liegt die störende Eigenschaft des Hexahistidin-Restes in der Summe seiner positiven Ladung und, besonders im Falle des GM2APs, in seiner Positionierung am C-Terminus. In Abb. 49 ist der C-Terminus pink markiert. Es zeigt sich, dass der C-Terminus, und somit der Hexahistidin-Rest des rekombinanten Proteins, nicht nahe an den positiven Ladungen des Proteins liegt. Somit wäre es gut möglich, dass der Hexahistidin-Rest mit seiner Anlagerung an die Membran die korrekte Anbindung der Lipidbindungsstelle an die Membran behindert. Des Weiteren scheint es durch die Positionierung des Hexahistidin-Restes wahrscheinlich, dass der Hexahistidin-Rest nicht an das gleiche Liposom anlagert wie das Protein selbst. Somit würde die Annäherung von

Liposomen zueinander begünstigt, was die erhöhte Fusogenität des rGM2AP-His6 erklären könnte.

Da eine Abspaltung des Hexahistidin-Restes durch Proteinase K im Falle des vorliegenden rGM2AP-His6 nicht gelang (Daten nicht gezeigt) erscheint eine neue Klonierung mit Tev-Schnittstelle zur Abspaltung des Hexahistidin-Restes, eine neue Klonierung mit abweichender Aufreinigungssequenz oder eine Expression ohne Hexahistidin-Rest sinnvoll. Des Weiteren wäre ein Präparat aus Gewebe für biophysikalische Messungen zu bevorzugen.

Falls eine Aufreinigung aus Gewebe, oder eine rekombinante Expression ohne Hexahistidin-Rest zu schwierig ist, erscheint es ratsam, bei allen membranaktiven Proteinen vor Durchführung einer neuen Versuchsmethode zu prüfen, ob die rekombinant exprimierten Präparate mit Histidin-Resten im eingesetzten Assay-System gleiches Verhalten zeigen wie die aus Gewebe gewonnenen, auch wenn diese in den entsprechenden Abbau-Assays Aktivität zeigen.

4.3 Ausblick

Da der Hexahistidin-Rest insbesondere die Plasmonresonanzmessungen beeinflusst, sollte von einer weiteren Verwendung von Hexahistidin-markierten Proteinen in diesem System Abstand genommen werden. Hier scheint die Expression eines rekombinanten GM2APs ohne Hexahistidin-Rest sinnvoll, da über rekombinante Expression eine Verunreinigung mit anderen membranaktiven Proteinen ausgeschlossen werden kann, die die Messungen verfälschen könnten (z.B. tritt SapB als Dimer auf, das in der Größenordnung des GM2APs liegt, strukturelle Ähnlichkeiten aufweist und befähigt ist GM1 zu transportieren (Ahn et al., 2003, Wilkening et al., 2000)).

Hier könnte der Versuch der Aufreinigung über die Glykosylierung (High-Mannose-Typ bei Expression im BEVS) mittels ConA erfolgen.

Trotz der Schwierigkeiten bei der Aufreinigung aus Gewebe wird in unserem Labor bereits an einer neuen Präparation gearbeitet, um weitere vergleichende SPR-Messungen durchführen zu können.

Die Messungen mittels Dynamischer Lichtstreuung, welche in unseren Untersuchungen hauptsächlich als Kontrollen am Ende des FRET-Assays durchgeführt wurden, könnten ausgeweitet werden. So wäre es z.B. möglich nach Proteinzugabe durch längere Messungen über die Zeit weitere Erkenntnisse über die Vorgänge zu gewinnen, besonders was Aggregation und Vesikelfusion betrifft. So konnte man z.B. in unserem Labor anhand von Vesikeln, welche mit Polylysin zusammengegeben wurden, die Abfolge von Aggregation und darauf folgender Vesikelfusion beobachten (nicht veröffentlichte Daten). Die fusogene Wirkung von Polylysin wurde im Vorfeld bereits beschrieben (Walter et al., 1986), was dafür spricht, dass weitere Messungen mit DLS Aufschluss über die Wirkungsweise des GM2AP geben könnten.

Für die weitere Zukunft erscheint es sinnvoll, neben den zeitabhängigen Messungen den Lipidtransfer-Membranfusions-Assays weiter zu optimieren. Zum Beispiel soll versucht werden, Versuchsbedingungen zu finden, bei denen die Vesikelfusion 30% nicht überschreitet. Würde dieses gelingen, so wäre neben der Bestimmung des Nettotransfers die Berechnung des theoretischen Transfers unter Berücksichtigung der Vesikelfusion möglich. Ein möglicher Ansatz hierzu läge, neben der Verkürzung der Reaktionszeit und somit einer früherer Trennung der Vesikel, in der Verwendung von Donor- und Akzeptorvesikeln mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung.

In unserer Abteilung wird zudem aktuell an der Herstellung radioaktiv-, fluoreszenz- und Biotin-markierter membrandurchspannender Lipide gearbeitet. Unter Zuhilfenahme dieser Lipide sollen in Zukunft Messungen im Lipidtransfer-Membranfusions-Assay durchgeführt werden. So kann z.B. ein Transfer dieser markierten Lipide grundsätzlich ausgeschlossen werden, da sie die Doppelmembran nicht verlassen können.

Zum Beispiel wäre es möglich, die Akzeptorvesikel mit einem radioaktiv markiertem Transmembranlipid zu versehen und den Donor mit einem fluoreszenzmarkierten. Würden beide im BioMag[®]-Pellet gefunden so hätte man einen 100%igen Nachweis für Vesikelfusion. In der Literatur wird von so genannten Archaeosomen berichtet. Diese Vesikel bestehen aus in Archeabakterien vorkommenden Ether-Lipiden und weisen eine hohe Stabilität und nahezu keine Fusionsneigung auf (Patel und Sprott, 1999). Hier bestünde ein möglicher Versuchsansatz darin Lipidvesikel mit Etherlipiden zu stabilisieren (Lohner et al., 1991).

Ein weiterer Ansatz um ausschließlich den Transfer von Lipiden zu untersuchen läge in der Verwendung von „*lipid coated beads*“. Hier soll versucht werden Lipide über RP12-Ketten an Kügelchen im Durchmesser von 100 nm zu binden und diese als Modellsystem für Vesikel einzusetzen. Da in diesem Modellsystem keine Fusion stattfinden kann könnte so reiner Lipidtransfer beobachtet werden.

Des Weiteren wäre es interessant herauszufinden, ob es bei den vesikulären Vorgängen neben Transfer, Vesikelfusion und Aggregation auch zur Zerstörung von Liposomen kommt, wie z.B. der Bildung von Mizellen, multilamellaren Strukturen oder Poren.

Neben der bekannten Methoden des „Contentmixing-Assays“ und des „Leakage-Assays“ könnte hier eine in der Pharmazie verwendete Methode von Nutzen sein, welche es ermöglicht die Integrität von Vesikeln in kosmetischen Formulierungen zu untersuchen (Blume und Schlüchtern, 2006). Hierbei findet die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) Verwendung.

Hierbei wird in die Vesikelmembran ein paramagnetischer ESR-aktiver Stoff eingebaut, welcher hohe Ähnlichkeit mit PC besitzt. In der komplex strukturierten Lipidmembran besitzt dieser Stoff nur sehr eingeschränkte Mobilität. Wird die Membran zerstört, so ändert sich durch die Strukturänderung der Umgebung auch die Mobilität der ESR-aktiven Substanz (Schwarzmann et al., 1983), was durch ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann.

Dieses System erscheint viel versprechend, da an Lipiddoppelschichten bereits ESR-Messungen durchgeführt wurden, um das Anbindeverhalten des GM2APs zu untersuchen (Mathias et al., 2009).

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Gerät	Typ/Hersteller/Vertreiber	Sitz
Abdampfanlage	React-Vap III; Pierce/Perbio Science	Rockford/IL/USA
Autoklav	Varioklav 50050; H+P Labortechnik	Oberschleißheim
Biacore 3000	Biacore	Freiburg
Blotting- Apparatur	Mini-Transblot; BioRad-Laboratories	Richmond/USA
Densitometer	CS-9301PC; Shimazu	Kyoto/Japan
	Carmag	Berlin
Feinwaage	Explorer; Ohaus	Giessen
Fluorimeter	Fluoroskan II , Labsystems	Helsinki/Finnland
Flüssigszintillationszähler	TriCarb 1900 CA; Canberra Packard	Dreieich
FPLC-Anlage Pharmacia	Biotech	Freiburg
Fraktionssammler	Advantec Sf2120; Advantec Toyo	Kaisha/Japan
ESI-Massenspektrometer	Q-TOF2; Micromass	Manchester/GB
Elektrophoreseapparatur	Mini-Protean II; BioRad	München
Heizblock	Tri-block DB3; Techne	Cambridge/GB
	Reacti-therm III; Pierce/PerbioScience	Rockford/IL/USA
Heitzrührer	Ikamag-Ret; Ika-Werk	Staufen
HPTLC-Anlage, präparativ	BIOCAD Sprint System; Applied Biosystems/Aplera	Darmstadt
Inkubator	Model OB-3; Rechne	Cambridge/GB
LiposoFast low pressure homogenizer	Avanti Polar Lipids	Alabaster/Alabama/ USA
	Avestin	Ottawa/Ontario/ Kanada
MALDI- Massenspektrometer	TOFSpec E; Micromass	Manchester/GB
pH-Meßgerät	pH 537; WTW	Weilheim
Peristaltikpumpe	P1; Pharmacia Biosystems	Freiburg
Phosphoimager	Fujix BAS 1000; Raytest	Straubenhardt

Photometer	UV-110-02; Shimadzu	Düsseldorf
	Ultrospec III; Pharmacia	Uppsala/Schweden
Photometer	Multiscan Plus MK II; Labsystems	Helsinki, Finnland
Pipetten	Gilson Pipetman P20, P200, P1000; Abimed	Langenfeld
	Ripette; Ritter-Med	Schwabmünchen
	Multipette; Eppendorf	Hamburg
Reinstwasseranlage	Super Q; Millipore	Molsheim, Frankreich
Radioscanner	Fuji BAS 100 Imaging Analyser; Fuji Photo Film Co.	Tokyo/Japan
Reinstwasseranlage	EasypureUV/UF; Werner	Leverkusen
Röntgenfilmkassette	Chronex; Du-Pont	Nemours/Frankreich
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific	New Brunswick
Schüttelwasserbad	1083; Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Spannungsquelle	Macrodrive 5, Pharmacia-LKB	Freiburg
	250/2,5; BioRad	München
Spectrofluorophotometer	Shimadzu RF-5000	Kyoto/Japan
Sterilbänke	LaminAir HB 2448, LaminAir HA 2472GS; Hereaus	Düsseldorf
Sterilisator, Heißluft-	U50ü; Memmert	Schwabach
Ultraschallgerät	Sonifier 250; Branson	Danbury/USA
Ultraschalbad		
Vortexgeräte	Retsch GmbH	Haan
Zentrifugen	Megafuge 2.0 R; Hereaus	Düsseldorf
	Superspeedzentrifuge RC 5B; DuPont	
	Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge J2-21 M/E; Ultrazentrifuge L8-80 M, Beckman Instruments	Bad Homburg
	Modell 5412, 5414; Eppendorf	München
		Hamburg
Zentrifugenrotoren	SS 34, GS3, GSA; DuPont	Bad Homburg

5.1.2 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller/Vertreiber	Sitz
Botteltop-Filter	SFCA 0,2 µm und PES 0,2 µm; Nalgene	Roskilde/Dänemark
DC-Fertigplatten (Glas)		
Kieselgel G60 20x20 cm	Merck	Darmstadt
HPTLC-Platten G60, 10x20 cm, 20x20 cm	Merck	Darmstadt
Einwegspritzen	Beckton/Dickinson	Bedford/USA
Mikrotiterplatten	Falcon/Becton Dickinson	Bedford/USA
Parafilm	American National Can/Roth	Karlsruhe
pH-Papier	Machery-Nagel	Düren
Pipettenspitzen	Greiner	Nürtingen
PVDF-Membran Porablot	Macherey-Nagel	Düren
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Röntgenfilme	X-OmatS, BioMax; Eastman Kodak	Rochester/USA
Pionier L1-Chip	Biacore	Freiburg
Pipettenspitzen	Ambimed	Langenfeld
	Greiner	Frickenhausen
Polycarbonatmembran	Avestin	Ottawa/Ontario/ Kanada
(Porendurchmesser 100nm)	Milch Equipment	Laudenbach
Schüttelkolben	Costar	Cambridge, USA
Sialinisierte Glasfaserwatte	Macherey-Nagel	Düren
Spritzenvorsatzfilter	Millipore	Molsheim, Frankreich
Szintilationsvials:		
Super Polyethylen Vials	Packard	Meriden/USA
Zellkulturflaschen		
25, 75, 175 cm ²	Costar	Cambridge, USA
Zellkultur-Einwegpipetten	Stripette 1ml, 5ml, 10 ml, 25 ml; Costar/Corning B.V.	Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen 50 ml,	Falcon;	Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 25 ml	Greiner	Frickenhausen

ZipTips C18/P10

Milipore Corporation

Bedford/USA

5.1.3 Chemikalien

Acrylamidmix 37,5:1 40%ige Lsg.	Roth	Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fluka	Neu-Ulm
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma	Taufkirchen
Essigsäure	Riedl-de Haen	Seelze
Ethanol 100%	Baker	Deventer, Niederlande
Fötale Kälber Serum	Sigma	Taufkirchen
Formaldehyd	Merck	Darmstadt
Glycerin	Merck	Darmstadt
Hefeextrakt	Gibco-BRL	Freiburg
IPL 41 Pulvermedium	Gibco-BRL	Freiburg
Kupfersulfat, 4%ige Lsg.	Sigma	Taufkirchen
Lipidmix (1000x)	Sigma	Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Sigma	Taufkirchen
Natriumazid	Riedl-en Haen	Seelze
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen	Hilden
Octyl-Sepharose4 Fast Flow	Sigma	Taufkirchen
Phosphatidsäure	Sigma	Taufkirchen
Rinderserumalbumin delipidiert	Sigma	Taufkirchen
Salze, sonstige	Merck	Darmstadt
Salzsäure (37%)	Riedel-de-Haen	Seelze
Säuren, sonstige	Merck	Darmstadt
SDS <i>molecular biology grade</i>	Sigma	Taufkirchen
Serva Blau G	Serva	Heidelberg
Szintillationsflüssigkeit:		
Ultima Gold	Packard	Dreieich
TEMED	Sigma	Taufkirchen
Tricin ultra pure	ICN	Eschwege
Tris (ultra pure)	ICN	Eschwege

Alle Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad und wurden nicht weiter gereinigt. Das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde über eine Hochreinigungsanlage der Firma Millipore (Molsheim, Frankreich) mittels Vorfilter, Ionenaustauscher-Säule und Ultrafilter aufgereinigt.

5.1.4 Lipide und Substrate

1,2-Dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DOPC), Bis(monomyristoylglycero)phosphat (C14:0-BMP) und Bis(monooleoylglycero)phosphat (C18:1-BMP) wurden bei Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) erworben. Cholesterol war von Sigma (Taufkirchen). *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamin-triethyl-ammoniumsalz (NBD-PE) und *N*-((6-(biotinoyl)amino)hexanoyl-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanol-amin, triethyl Ammoniumsalz (Biotin-PE) waren von Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA. C18-Sphingomyelin (SM) and D-erythro-C18-Ceramid (Cer) wurden von Matreya (Pleasant Gap, PA, USA) bezogen. Rhodamin-PE war von Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. 4-[¹⁴C]-Cholesterol (58 Ci/mol) war von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). 1-[¹⁴C]-Dioleoyl-L- α -phosphatidylethanolamin (55 Ci/mol) und 1-[¹⁴C]-dioleoyl-L- α -phosphatidyl-choline (80 Ci/mol) kamen von American Radiolabelled Chemicals (St. Louis, MO, USA). BioMag/ Streptavidin Lösung (5 mg/ml) und der magnetische Separationsständer (MagneSphere) wurden von Qiagen (Hilden) bezogen.

[¹⁴C]-Sulfatid, [¹⁴C]-GM3, [¹⁴C]-GM1, [¹⁴C]-Galaktosylceramid und [¹⁴C]-Ceramid wurden ausgehend von ihren korrespondierenden Lyso-Lipiden, Sphingosin, und [1-¹⁴C]-Stearinsäure (2.15 GBq/mmol von GE Healthcare), von Herrn Dr. Schwarzmann synthetisiert (Schwarzmann et al., 2005).

5.1.5 Enzyme, Antikörper und Proteine

Die aus Gewebe gereinigte humane saure β -Hexosaminidase A (Liessem et al., 1995) wurde von Dr. C. Schütte und Dr. H. Gallala zur Verfügung gestellt.

Das rekombinante, in *Spodoptera frugiper*a (Sf21-Zellen) exprimierte rGM2AP-His6 wurde teilweise von Fr. Dr. Wendeler zur Verfügung gestellt und zum Teil selbst exprimiert. Die rekombinanten Baculoviren wurden mir von Fr. Dr. Wendeler zur weiteren Verwendung überlassen.

Das aus postmortaler humaner Niere gereinigte humane GM2AP wurde von Dr. Stefan Hepbildikler zur weiteren Verwendung überlassen.

Das Hexahistidin-Peptid wurde von Abbiotec bezogen, das Polylysin (15.000 Da) war von Sigma.

Das rekombinante, in *Pichia pastoris* exprimierte Sap-B wurde freundlicher Weise von Fr. Dr. Remmel zur Verfügung gestellt.

Der Antikörper gegen das GM2AP lag aus eigener Herstellung im Labor vor. Es handelt sich um einen, im Kaninchen hergestellten, anti-Ziege Antikörper. Das HSRP-G-Protein Konjugat wurde von Biorad bezogen.

5.1.6 Lösungen, Medien und Puffer

APS-Lösung

Ammoniumperoxidsulfat 25 mM

Aufbewahrungslösung (Silbergel)	MeOH	30% (v/v)
	Glycerol	3% (v/v)
BCA-Lösung	Bicinchoninsäure	1% (v/v)
	Natriumcarbonat x H ₂ O	2%
	Natriumtartrat x H ₂ O	0,15%
	Natriumhydroxid	0,4%
	Natriumhydrogencarbonat	0,95%
BioMag Waschpuffer	FRET-Standard-Puffer	88,8%
	1 M Tris/HCL pH8	12,2%
Blockierlösung (Western-Blot)	Rotiblock 1:10 mit TBST	
EDTA-Lösung	EDTA (Dinatriumsalz)	500 mM
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	Na ₂ CO ₃	60 g/l
	Na ₂ S ₂ O ₂ x 5H ₂ O	4 mG/l
	Formaldehyd, 37%	0,5 ml/l
Ethidiumbromid-Lösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	10 mg/ml
Fixier-Lösung (Silberfärbung)	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	12 % (v/v)
	Formaldehyd, 37%	0,5 ml/l
FRET-Standard-Puffer für GM2AP	Natriumcitratpuffer + 113 mM NaCl, pH 4,2	50 mM
Gangliosidlaufmittel	Chloroform/Methanol/	55:45:10 (v/v/v)
	0,22% CaCl ₂ inH ₂ O	
Gelbeladungspuffer (10x, Agarosegele)	Glycerol	20% (v/v)
	Bromphenolblau	0,4% (w/v)
	Xylencyanol	0,4% (v/v)
Gelbeladungspuffer (5x, SDS-PAGE)	Tris-HCl, pH 6,8	50 mM
	Glycerol	12% (v/v)
	SDS	4% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	2% (v/v)
	Serva Blau G	0,01% (w/v)
Hepespuffer + NaCl pH7	50 mM HEPES + 113 mM NaCl	
Inkubationslösung (Silberfärbung)	Na ₂ S ₂ O ₂ x 5 H ₂ O	0,2 g/l
IPL41-Medium	Pulvermedium Gibco	

ISFMG	IPL 41-Medium,	1x
	Hefeextrakt	1%
	Pluronic F 68	1%
	Lipidmix	0,1%
	Gentamycin	50 mg/l
Kationenaustausch-Bindungspuffer pH 4	Natriumphosphat	50 mM
Kationenaustausch-Elutionspuffer pH 4	Natriumphosphat	50 mM
	NaCl	1 M
Laufpuffer SDS-PAGE	Tris/HCl	6 g/l
	Glycin	30,1 g/l
	SDS	2 g/l
Natriumcitratpuffer pH 4,2; 5,0; 6,0	NaCit	50 mM
Natriumcitratpuffer+NaCl pH 4,2; 5,0; 6,0	NaCit	50 mM
	NaCl	113 mM
Ni-NTA-Bindungspuffer, 1x, pH 8,0	Na ₂ HPO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
Ni-NTA-Waschpuffer, pH 7,0 , pH 6,0	Bindungspuffer, 1x	
NiNTA-Elutionspuffer, pH 4,0	Bindungspuffer, 1x	
PBS-Puffer,	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	16 mM
	KCl	3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Pluronic-F68-Lösung	10% Lösung von Sigma	
SDS-Stammlösung	SDS	10% (w/v)
Silberlösung (Silberfärbung)	Silbernitrat	2 g/l
	Formaldehyd, 37%	0,75 ml/l
Stopplösung (Silberfärbung)	Methanol	30% (v/v)
	Essigsäure	12% (v/v)
TAE-Puffer (50x), pH 8	Trisacetat	2 M
	EDTA	50 mM

TBS-Puffer, pH 7,5	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	500 mM
TBS-T-Puffer	TBS + Tween-20	0,05%
Transferpuffer (Western-Blot)	Methanol	20 % (v/v)
	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,04%

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser hergestellt und je nach Zusammensetzung autoklaviert oder sterilfiltriert. Auf die Verwendung von Natriumazid (in den Puffern zur Proteinreinigung) wurde verzichtet.

5.1.7 Säulen und Säulenmaterialien

5.1.7.1 Fertigsäulen

Fertigsäulen	Hersteller	Sitz
Kationentauschersäule Poros HS, 10 x 100 mm	Applied Biosystems / Applera	Freiburg

5.1.7.2 Säulenmaterialien

Material	Hersteller	Sitz
Ni-NTA-Agarose Superflow POROS HS 20	QIAGEN Applied Biosystems / Applera	Hilden Freiburg

5.1.8 Insektenzelllinien und Viren

5.1.8.1 Sf21-Zellen

Immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen von *Spodoptera frugiperda*, einer Nachtfalterart, die zur Familie der Eulenfalter (Noctuidae) und zur Ordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera) zählt. Diese Zelllinie kann sowohl in Adhäsionskultur als auch in Suspensionskultur wachsen und gedeiht auch in serumfreiem Medium. Die Kultivierungstemperatur liegt bei 38°C, der optimale pH bei 6,2. Sie werden zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt, wobei man sich die leichte Infizierbarkeit mit Baculoviren zu nutze macht.

5.1.8.2 Sf9-Zellen

Unterstamm der aus Sf21-Zellen entwickelt wurde und der gleiche Eigenschaften wie Sf9-Zellen aufweist.

Beide Zelllinien wurden bei der Firma Invitrogen erworben.

5.1.8.3 Baculoviren

Die Familie Baculoviridae (Baculoviren) umfasst doppelsträngige, filamentöse DNA-Viren. Ihr Hauptwirt sind Mottenlarven, jedoch sind an die 600 Wirte beschrieben. Sie werden in der Gentechnologie zur Erzeugung von rekombinanten Proteinen in Zellkulturen sowie zur Vektorklonierung verwendet.

Die rekombinanten Baculoviren zur Expression des rGM2AP-His6 wurden von Fr. Dr. Wendeler zur Verfügung gestellt (Wendeler et al., 2003a).

5.2. Methoden

5.2.1 Arbeiten mit Insektenzellen

5.2.1.1 Kultivierung von Insektenzellen

a) Medienherstellung

Für die Expression des rGM2AP-His6 wird serumfreies ILP-41-Medium (Inlow et al., 1989) verwendet. Das käufliche Pulvermedium wird in 80% des Endvolumens unter Rühren in Reinstwasser gelöst. Nach Zugabe von 0,35 g/l NaHCO₃, 0,662 g/l CaCl₂·2H₂O und 20 ml/l Hefeextrakt wird der pH mit KOH auf 6,1 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml Lipidmix und 10 ml Pluronic-F68-Lösung wird das Volumen mit Reinstwasser aufgefüllt und das Medium in zuvor sterilisierte Flaschen sterilfiltriert.

b) Adhäsionskulturen

Spodoptera frugiperda (Sf9 und Sf21) Zellen werden als adhärenente Monolayerkulturen in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm²-Zellkulturflaschen bei 27°C kultiviert. Je nach Zelldichte müssen die Zellen jeden zweiten Tag im Verhältnis 1:3 bis 1:6 umgesetzt werden. Hierzu werden die Zellen mit einer Glaspipette von der Gefäßwand gespült und entsprechende Aliquots in Zellkulturschalen mit frischem Medium überführt. Während der Kultivierung sollten Morphologie und eventuelle Kontamination durch Mikroskopie überprüft werden.

c) Suspensionskultur

Die Zellen werden in einer Dichte von 5x10⁵ Zellen im Fernbachkolben ausgesät und bei 135 rpm und 27°C kultiviert. Die Kolben sollten nur zu 50% des angegebenen Volumens befüllt werden um einen ausreichenden Gasaustausch zu gewährleisten. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt mittels Neubauerkammer.

d) Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum schnellen Auftauen von Insektenzellen wurde ein Einfrierröhrchen mit ca. $1,5 \times 10^7$ Zellen vorsichtig in der Hand angetaut und dann in einen sterilen Fernbachkolben (50 ml) mit vorgewärmtem ILP-41-Medium gegeben.

Zum Einfrieren wurden Insektenzellen einer Suspensionskultur in der mittleren log-Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und anschließend in einem Gemisch aus frischem und gebrauchtem Medium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Anschließend wurden die Zellen in Einfrierröhrchen aliquotiert und in Stickstoff eingefroren.

5.2.1.2 Virusamplifikation

Zur Amplifikation der rekombinanten Baculoviren werden *Sf9* oder *Sf21* Zellen in einer 25 cm^2 -Zellkulturflasche in einer Dichte von 3×10^6 ausgesät. Nach einer Stunde wird das Medium gegen 1,5 ml frisches Medium ersetzt und 0,5 ml Virenlösung ersetzt. Die Zellen werden bei 27°C inkubiert und während der ersten 4 Stunden mehrfach geschüttelt, um eine gleichmäßige Verteilung des Virus zu erreichen. Nach 4 Stunden werden 4 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen weiter bei 27°C inkubiert. Nach 6 Tagen erfolgt die Virenenernte durch Zentrifugation (2000 rpm, 10 min). Von dem so gewonnenen Virenüberstand wird 1 ml für die nächste Amplifikationsrunde eingesetzt. Hierzu werden die Insektenzellen in einer Dichte von 9×10^6 Zellen in einer 75 cm^2 -Zellkulturflasche ausgesät und infiziert. Nach 6 Tagen wird erneut der Virenüberstand gewonnen und mit diesem eine weitere Infektion durchgeführt. Diese erfolgt in einer 175 cm^2 -Zellkulturflasche bei einer Zelldichte von 20×10^6 . Die Viren dieser Amplifikationsrunde können nach Titerbestimmung mittels Plaque-Assay (vgl. 5.2.1.3) ohne weitere Reinigung für die Proteinexpression eingesetzt werden.

Zur Gewinnung größerer Virusmengen werden Suspensionskulturen bei einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ mit Viren der dritten Amplifikationsrunde bei einem MOI (multiplicity of infection / Verhältnis Virenmenge zu Zellzahl) von 0,05-0,1 infiziert. Nach sechstägiger Inkubation wird der Virenüberstand durch Zentrifugation (2000 rpm, 10 min, 4°C) gewonnen. Die Viruslösung wird bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Virusüberstände sollten nicht öfter als fünfmal amplifiziert werden, um die Anreicherung von Deletionsmutanten zu vermeiden.

5.2.1.3 Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay

In die Vertiefungen einer 6-Well-Platte werden *Sf21*- oder *Sf9*-Zellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen ausgesät. Dies entspricht einem 50% konfluenten Monolayer. Von der Viruslösung wird eine Verdünnungsreihe erstellt (10^{-1} bis 10^{-10}). Nach Entfernung des Mediums wird jeweils 1 ml der Virussuspension auf eine Vertiefung gegeben. Die Viruslösung bleibt für eine Stunde bei 28°C auf den Zellen.

Zur Herstellung eines Agarose-Overlays wird Agarose (low melting point, 4% in Medium) nach Autoklavieren im Wasserbad bei 70°C flüssig gehalten. 12,5 ml der Agarose werden unter sterilen Bedingungen mit 12,5 ml sterilem Reinstwasser und 25 ml doppelt konzentriertem Medium gemischt und auf 40°C temperiert.

Die Viruslösung wird von den Zellen entfernt und diese mit je 2 ml Agarose übergossen. Nachdem die Agarose ausgehärtet ist (nach ca. 20 min), wird diese mit 1 ml Medium

überschichtet. Nach 4-10 Tagen Inkubation bei 27°C werden Plaques im Zellrasen sichtbar. Diese werden gezählt und der Virustiter nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{pfu/ml} = 1/(\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Anzahl Plaques})$$

5.2.1.4 Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression

Die Zellen werden zur Infektion in Suspensionskultur im Schüttelkolben angezogen. Die Infektion erfolgt bei einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml durch Zugabe der Viruslösung. Die multiplicity of infection (MOI-Wert) muss im Vorfeld experimentell ermittelt werden (Plaque-Assay). Die Viren wurden von Fr. Dr. Wendeler zur Verfügung gestellt (Wendeler et al., 2003a).

Für die Expression des rGM2AP-His6 wurden die Insektenzellen in serumfreiem IPL-41-Medium kultiviert und mit einer MOI von 3 infiziert. Nach 3-4 Tagen (vor dem Einsetzen der Zellyse) wird das sekretierte Protein aus dem Zellüberstand isoliert (vgl. 5.2.2.1).

5.2.2 Arbeiten mit Proteinen

5.2.2.1 Reinigung des in Insektenzellen exprimierten rekombinanten GM2-Aktivatorproteins (rGM2AP-His6)

Da die Bestandteile des Insektenmediums die Bindungskapazität des Ni-NTA-Materials stark verringern, wird vor Metallionen-Affinitätschromatographie eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt.

Ein Liter der Insektenzellen wird nach der Expression zunächst durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert. Im Anschluss wird der Überstand in ein Gefäß abdekantiert und sein pH mit HCl auf 3,8 eingestellt. Durch diese Acidifizierung fällt ein Großteil der Mediumproteine aus, welche dann durch erneute Zentrifugation (8000 rpm, 20 min) abgetrennt werden. Der klare Überstand wird mit einer Flussrate von 5 ml/min auf eine mit Bindungspuffer (50 mM Na-Phosphat, pH 4) äquilibrierte Kationentauschersäule (Poros 20HS) aufgetragen. Nach dem Auftrag wird die Säule mit 10 Säulenvolumina (SV) Bindungspuffer gewaschen. Im Anschluss wird das Protein mit 10 SV Bindungspuffer + 1M NaCl von der Säule eluiert. Die den rGM2AP-His6 enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und mit 1/10 des 10-fach Ni-NTA-Bindungspuffers versetzt. Der pH-Wert wird auf 7,5 eingestellt. Die Lösung wird nun auf eine mit 10 Säulenvolumen (SV) Ni-NTA-Bindungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wird dann mit je 10 SV Ni-NTA-Puffer mit sinkendem pH gewaschen (pH 8, pH7, pH6). Im Anschluss erfolgt die Elution des Proteins mit 10 SV Ni-NTA-Puffer pH 3,8.

5.2.2.2 Proteinchemische Methoden

5.2.2.2.1 Proteinquantifizierung mit Hilfe der Bicinchoninsäure-Methode

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

5.2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in diskontinuierlichen SDS-Tricin-Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970; Schägger und Jagow, 1987). Für die elektrophoretische Untersuchung des GM2APs findet ein 12,5%iges (w/v) Trenngel Verwendung.

Für ein 100 x 70 x 0,75 mm großes Minigel werde nacheinander die folgenden Gemische eines 12,5 %-igen (w/v) Trenngels und eines 4 %-igen (w/v) Sammelgels in den Gelträger gegossen.

	Trenngel	Sammelgel
Gelpuffer (3-fach)	2,5 ml	0,75 ml
H ₂ O	0,95 ml	1,72 ml
Glycerin	1 ml	-
Acrylamid (30%)	3,21 ml	0,384 ml
TEMED	4 μl	2,4 μl
10% APS	38 μl	25 μl

Tabelle 2: Zusammensetzung des SDS-Geles

Die Proteinproben werden mit 5-fach Gelbeladungspuffer versetzt und durch aufkochen denaturiert (10 min, 95 °C). Anschließend werden die Proben und ein Protein-Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die Stromstärke wird für das Sammelgel auf 30 mA und für das Trenngel auf 80 mA festgelegt. Das Gel wird angehalten bevor der blaue Farbstoff das Ende des Gels erreicht hat.

5.3.2.2.3 Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Silberfärbung

Zunächst müssen die Proteine im Gel fixiert werden. Hierzu wird eine Lösung aus 50 % Methanol (v/v), 12% Essigsäure (v/v) und 500 $\mu\text{l}/\text{l}$ Formaldehyd, 37 % verwendet. Der Fixiervorgang sollte mindestens eine Stunde betragen. Danach wird das Gel dreimal je 20 min mit 50%igem (v/v) Ethanol (technisch) gewaschen und anschließend mit 200 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ imprägniert. Nach dreimaligem Waschen für je 20 s mit H₂O (bidest) erfolgt die

Behandlung mit Silberlösung. Hierbei wird das Gel für 20 min mit einer Lösung aus 2 g/l AgNO₃ und 750 µl/l Formaldehyd, 37% belassen. Im Anschluss wird das Gel erneut dreimal 20 s mit H₂O (bidest) gewaschen und daraufhin in die Entwicklerlösung (60 g/l Na₂CO₃; 500 µl/l Formaldehyd 37 %; 4 mg/l Na₂S₂O₃ x 5 H₂O) gegeben. Der Entwickler wird nach Erscheinen der ersten Bande abgenommen, das Gel kurz mit H₂O (bidest) gewaschen und danach in die Stopplösung (50% Methanol, 12% Essigsäure) gegeben. Nach 10min wird das Gel in eine Waschlösung aus 30% Methanol und 3% Glycerin überführt und mindestens 20min gewaschen. Danach wird das Gel zur Dokumentation fotografiert oder eingescannt werden.

5.2.2.2.4 Immunochemischer Nachweis des GM2-Aktivatorproteins

Eine PVDF-Membran in Gelgröße wird für 5 min in Methanol und anschließend 5 min in Blot-Puffer äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wird entsprechend Apparaturanleitung zusammen mit der Membran in eine Transferkammer gegeben. Anschließend erfolgt unter Eiskühlung die Übertragung der Proteine auf die Membran bei einer Stromstärke von 400 mA für 30 min.

Nach beendetem Transfer wird die Membran unter leichtem Schütteln eine Stunde in RotiBlock 1:10 mit TBST bei RT abgesättigt um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wird die Membran über Nacht mit dem spezifischen Antikörper (1:1000 in RotiBlock[®] 1:10 mit TBST) inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran 3 mal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen und anschließend bei RT 1h mit einem G-Protein-HRP-Konjugat (BioRad, 1:1000 in TBST) inkubiert.

Im Anschluss wird die Membran erneut 3 mal 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Membran wird nun vorsichtig abgetupft und mit einer 1:1-Mischung der Chemolumineszenz-Reagentien für eine Minute inkubiert. Die Peroxidase des G-Proteins katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Luminolreagenz, was von Chemolumineszenz begleitet ist.

Danach wird die Membran wieder vorsichtig trocken getupft, in eine Folie eingeschlagen und in eine Entwicklungskassette gelegt. Im Dunkeln erfolgt die Detektion der Lumineszenz mittels Autoradiographie.

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

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

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

5.2.2.2.6 Bestimmung der β -Hexosaminidase A (Hex A) Aktivität mittels fluorogenen synthetischen Substraten

Die Aktivitätsbestimmung der Hex A erfolgt unter Verwendung von 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (MUG) als Substrat. Die Umsetzung erfolgt in einem Volumen von 40 μ l in 10 mM Citratpuffer, pH 4,2, unter Verwendung von 2 mM Substrat, 6 μ g BSA und geeignet verdünnter Enzymlösung.

Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37°C inkubiert und mit fünf Volumenteilen einer Stopplösung (0,2 M Na₂CO₃; 0,2 M Glycin) abgestoppt. Die bei der Reaktion abgespaltene Menge 4-Methylumbelliferon wird im Fluorimeter (Fluoroskan II, Labsystems) bei 440 nm (Anregung bei 364 nm, Hg-Lampe) gemessen.

Eine Unit β -Hexosaminidase A ist als die Enzymmenge definiert, die unter diesen Standardbedingungen 1 μ mol/min 4-Methylumbelliferon freisetzt.

5.2.2.2.7 *In vitro*-Aktivitätsmessung des GM2APs im liposomalen Testsystem

Zunächst wird eine 0,5 mM Liposomensuspension mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

Radioaktiver Assay: 70 mol% DOPC, 10 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 9 mol% GM2, 1 mol% [¹⁴C]-GM2

Fluoreszenter Assay: 70 mol% DOPC, 10 mol% DO-BMP, 10 mol% Cholesterol, 10 mol% 2-NBD-GM2

Für den Assay werden 25 μ l Liposomensuspension + 1 U HexA + 0,2 μ g GM2AP in einem Endvolumen von 50 μ l zusammen gegeben, so dass die Lipidkonzentration pro Ansatz 0,25 mM beträgt.

Als Puffer dient 50 mM NaCit, pH 4,2.

Neben dem eigentlichen Ansatz werden die folgenden Kontrollen angesetzt:

- nur Liposomen und Puffer
- Liposomen + Puffer + 1U HexA
- Liposomen + Puffer + 0,2 μ g GM2AP
- Liposomen + Puffer + TDC
- Liposomen + Puffer + TDC + 1U HexA
- Liposomen + Puffer + TDC + 1U HexA + 0,2 μ g GM2AP

Die Reagenzien werden ohne GM2-Aktivator und Enzym zusammengegeben, geschüttelt und kurz zentrifugiert. In einem Eisbad werden anschließend der Aktivator und das Enzym zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 40 μ l Methanol gestoppt. Das Gemisch wird Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Das Lipid-Protein-Gemisch wird in 20 μ l Chloroform/Methanol 1:1 aufgenommen und 15 Minuten sonifiziert. Die nun gelösten Lipide werden auf eine HPTLC-Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Gefäße werden mit 20 μ l Chloroform/Methanol nachgespült, die Lösung sonifiziert und auch auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in Gangliosidlaufmittel. Die Detektion des gebildeten GM3 wird je nach ein gesetztem GM2-Substrat über Fluoreszenz oder Radioaktivität vorgenommen und daraus die Aktivität des GM2APs berechnet.

Eine Aktivatoreinheit ist definiert als die Menge Aktivatorprotein die in Anwesenheit von 1 U HexA in einer Stunde 1 nmol GM2 umsetzt.

5.2.3 Arbeiten mit Lipiden / Liposomen

5.2.3.1 Darstellung von Liposomen (MacDonald et al., 1991)

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

Die Liposomen werden jedes Mal frisch angesetzt, indem man die aufgetaute Suspension dreimal für je 20 s mit Ultraschall (200 W, Sonifier 250, Branson) behandelt und dann 21-mal durch eine Polycarbonatmembran (Porengröße 100 nm) presst, die in einen Extruder (LiposoFast, Avanti Polar Lipids / Avestin) eingespannt ist.

5.2.3.2 Bestimmung des Lipidgehalts der Liposomen

Aliquots der Lipidstammlösung und der Liposomensuspension werden im Stickstoffstrom getrocknet, in 50 μl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen und für 1 min im Ultraschallbad sonifiziert, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (Chloroform/Methanol/Wasser, 60:25:4, v/v/v) und mit einer wässrigen Lösung von 8% (w/v) H_3PO_4 und 10% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ bei 180°C für 10 min entwickelt. Die Quantifizierung der Lipide erfolgt in Dreifachbestimmungen über photometrische Untersuchung mittels Densitometrie (Densitometer, Shimadzu) bei 595 nm.

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

5.2.4 Biophysikalische Methoden

5.2.4.1 Dynamische Lichtstreuung, DLS

Das DLS-Gerät (ALV-NIBS/HPPS High sensitivity version, ALV-GmbH, jetzt Malvern Instruments) misst bei 633 nm (Helium-Neon-Laser) mit automatisch angepasster Leistung und detektiert bei einem Winkel von 172° . Dies ermöglicht eine kurze Wegstrecke des Messlichts durch die Lösung, um Mehrfachstreuung und Artefakte durch Verunreinigungen zu minimieren. Die Zuverlässigkeit der Daten wurde durch die Vermessung von Latexkugeln bekannter Größe und Mehrfachmessungen kontrolliert. Der Messbereich des Gerätes liegt bei 0,6-6000 nm oder 1-1000 kDa.

In einer UV-Küvette (1,5 ml) wird die Liposomensuspension (0,5 mM Lipidgesamt-konzentration in 50 mM NaCit-Puffer, pH 4,2) vorgelegt und vermessen, dann die Proteinlösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Proteinendkonzentration beträgt zwischen 0,5 und 50 μM in 300 μl Küvetteninhalt. Die Messungen im DLS-Gerät erfolgen bei 25°C , für jeweils 30-60 s über einen Zeitraum von 30 min.

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

5.2.4.2 Oberflächen-Plasmonresonanzspektroskopie, SPR

5.2.4.2.1 Interaktion des GM2APs mit immobilisierten Liposomen

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem BiaCore 3000 Gerät (Biacore / GE-Healthcare) mit einem Pioneer-L1-Sensorchip (Biacore / GE-Healthcare) durchgeführt. Zur Beladung wird eine Liposomensuspension, 0,5 mM Lipide in PBS-Puffer, verwendet. Davon werden 60 µl mit einer Flussrate von 5 µl/min injiziert, dann wird mit 10 µl NaOH (25 mM) gewaschen und noch einmal 20 µl der Liposomensuspension zugegeben, um alle Bindungsstellen vollständig abzusättigen. Zuletzt wird, zur Entfernung unspezifisch gebundener Liposomen, ein zweites Mal gewaschen, diesmal mit 10 µl NaOH (50 mM) und einer erhöhten Flussrate von 100 µl/min.

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

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

5.2.4.3 Transfer- / Fusions-Assays

5.2.4.3.1 Transfer-Assay (Abdul-Hammed et al., 2010, Babalola et al., 2007)

Das zu transferierende Lipid ist radioaktiv markiert und befindet sich in einer Konzentration von 1 mol% in den Donorvesikeln. Zudem beinhalten die Donorvesikel Biotin-PE (4 mol%), welches nach dem durchgeführten Assay zur Separation der Donorvesikel von den Akzeptorvesikeln dient. Die Akzeptorvesikel sind durch NBD-PE (2 mol%) fluoreszenzmarkiert und nicht separierbar um sie nach erfolgter Separation der Donorvesikel im Überstand nachweisen zu können. Das Verhältnis von Donorvesikeln zu Akzeptorvesikel ist 1:5.

Zur Trennung von Donorvesikeln und Akzeptorvesikeln wird der Ansatz nach der Reaktionszeit mit TrisHCl 1M auf neutralen pH-eingestellt, mit Streptavidin-überzogenen BioMag-Kügelchen vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Separation der über Biotin-Streptavidin-Interaktion gebundenen Vesikel in einem Magnetständer. Der Akzeptor bleibt im Überstand zurück.

Der Überstand wird bezüglich vorhandener Radioaktivität und Fluoreszenz vermessen.

Wird das radioaktiv markierte Lipid von einem LLBP vom Donor zum Akzeptor transferiert, so wird im Überstand zusätzlich zur Fluoreszenz auch Radioaktivität nachgewiesen. Ein Verlust von Fluoreszenz im Überstand wird als Vesikelfusion gewertet.

5.2.4.3.2 Kombiniertes Lipidtransfer- und Membranfusions-Assay

Der Assay basiert auf Donorvesikeln (I) in welchen sich das zu transferierende Lipid in fluoreszenzmarkierter Form befindet. Im Falle des GM2APs findet 2-NBD-GM1 (2 mol%) Verwendung. Die Fluoreszenz wird durch das Vorhandensein von Rhodamin-PE (4 mol%) in den Donorvesikeln gequenchet. Zudem ist der Donor über Biotin-PE (4 mol%) durch BioMag® Streptavidin-Magnetkugeln pelletierbar.

Die Akzeptorvesikel (II) sind radioaktiv durch [¹⁴C]-PC markiert um sie nach erfolgter BioMag-Trennung im Überstand nachweisen zu können. Sie sind nicht pelletierbar.

Die Präparation der Donorvesikel und der Akzeptorvesikel erfolgt separat. Die Donorvesikel werden in einer Endkonzentration von 0,1 mM, die Akzeptorvesikel in einer Konzentration von 0,2 mM nach der Methode von MacDonald (vgl. 5.3.1), hergestellt. Als FRET-Basis-Puffer dient 50 mM Natriumcitrat + 113 mM NaCl, pH 4,2.

Für den FRET-Assay werden 80 µl Donorvesikel mit 240 µl Akzeptorvesikeln und 80 µl Puffer in einer Küvette zusammengegeben, vermischt und in das Fluorospektrometer gestellt. Vor Zugabe des Proteins wird zur Kontrolle, dass ohne Proteinzugabe kein Lipidtransfer stattfindet fünf Minuten die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Schließlich wird das Aktivatorprotein zugegeben und die Fluoreszenzaussendung im FRET kontinuierlich detektiert.

Im FRET-Assay kann Fluoreszenz in zwei Fällen detektiert werden. Zum größten Teil wird die Fluoreszenz durch den Transfer von 2-NBD-GM1 zu den Akzeptorvesikeln (II) freigesetzt. Im zweiten Fall kommt es zum partiellen Dequench durch Verdünnung bei Vesikelfusion (III) von Donorvesikeln (I) mit Akzeptorvesikeln (II). Dieser Teil ist sehr gering (5% der im FRET-Assay detektierbaren Fluoreszenz).

Mittels FRET wird der Anstieg der Fluoreszenz so lange detektiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt, und die Kurve ein Plateau erreicht hat. Dieser Punkt ist nach Einsatz von GM2AP oder rGM2AP-His6 und je nach Vesikelzusammensetzung unterschiedlich und wird nach 15-160 Minuten erreicht. Ist das Plateau erreicht wird der Ansatz durch Zugabe von 1M Tris-HCl pH 8 neutralisiert und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl dreifach mit Waschpuffer vorgewaschener BioMag-Kugeln überführt. Der Reaktionsansatz wird mit den BioMag®-Kugeln vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Unter diesen Bedingungen ist ein weiterer Lipidaustausch auszuschließen.

Donorvesikel (I) und fusionierte Vesikel (III) werden nun durch Biotin-Streptavidin-Interaktion im Magnetständer aus der Lösung entfernt. Im Anschluss werden sowohl Radioaktivität, als auch Fluoreszenz in Überstand und Pellet gemessen und über Quantifizierung der Prozentsatz der Vesikelfusion und des 2-NBD-GM1-Transfers bestimmt.

Um die Fluoreszenz im Pellet bestimmen zu können, und bei der Radioaktivitätsmessung den Einfluss der Magnetkugeln zu unterbinden, werden die Lipide mit Chloroform/Methanol/H₂O 1:2:0,5 (v/v/v) von den BioMag-Kugeln gelöst und diese Suspension vermessen.

Kontrolle der Vesikelgröße erfolgt mittels DLS (vgl. 5.5.1).

Literatur

- Abdul-Hammed, M. Breiden, B. Adebayo, M. A. Babalola, J. O. Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. 2010. Role of endosomal membrane lipids and NPC2 in cholesterol transfer and membrane fusion. *Journal of Lipid Research* 51: 1747-1760.
- Ahn, V. E. Faull, K. F. Whitelegge, J. P. Fluharty, A. L. und Prive, G. G. 2003. Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 38-43.
- Amidon, B. Brown, A. und Waite, M. 1996. Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemistry* 35: 13995-14002.
- Anderluh, G. Besenicar, M. Kladnik, A. Lakey, J. H. und Macek, P. 2005. Properties of nonfused liposomes immobilized on an L1 Biacore chip and their permeabilization by a eukaryotic pore-forming toxin. *Anal Biochem* 344: 43-52.
- Ardhammar, M. Lincoln, P. und Norden, B. 2002. Invisible liposomes: refractive index matching with sucrose enables flow dichroism assessment of peptide orientation in lipid vesicle membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15313-15317.
- Babalola, J. O. Wendeler, M. Breiden, B. Arenz, C. Schwarzmann, G. Locatelli-Hoops, S. und Sandhoff, K. 2007. Development of an assay for the intermembrane transfer of cholesterol by Niemann-Pick C2 protein. *Biol Chem* 388: 617-626.
- Baird, C. L. Courtenay, E. S. und Myszka, D. G. 2002. Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions. *Anal Biochem* 310: 93-9.
- Berent, S. L. und Radin, N. S. 1981. Mechanism of activation of glucocerebrosidase by co-beta-glucosidase (glucosidase activator protein). *Biochim Biophys Acta* 664: 572-582.
- Berne, B. J. und Pecora, R. 2000. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Dover Publications Inc., Mineola, NY.
- Bierfreund, U. Lemm, T. Hoffmann, A. Uhlhorn-Dierks, G. Childs, R. A. Yuen, C. T. Feizi, T. und Sandhoff, K. 1999. Recombinant GM2-activator protein stimulates in vivo degradation of GA2 in GM2 gangliosidosis AB variant fibroblasts but exhibits no detectable binding of GA2 in an in vitro assay. *Neurochem Res* 24: 295-300.
- Birkelè, S. Zeng, G. Gao, L. Y. R. K. und Aubry, J. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85: 455-463.
- Bleistein, J. Debuch, H. und Gunawan, J. 1980. Metabolism of phosphatidylglycerol by liver lysosomes of chloroquine-pretreated rats. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 361: 1445-1448.
- Blume, G. und Schlüchtern. 2006. Liposom ist nicht gleich Liposom. *Pharmazeutische Zeitung* 06/2006.
- Body, D. R. und Gray, G. M. 1967. The isolation and characterization of phosphatidylglycerol and a structural isomer from pig lung. *Chem Phys Lipids* 1: 253-263.
- Bradová, V. Šmíd, F. Ulrich-Bott, B. Roggendorf, W. Paton, B. C. und Harzer, K. 1993. Prosaposin deficiency: further characterization of the sphingolipid activator protein-deficient sibs. Multiple glycolipid elevations (including lactosylceramidosis), partial enzyme deficiencies and ultrastructure of the skin in this generalized sphingolipid storage disease. *Hum Genet* 92: 143-152.
- Brady, R. O. 2003. Enzyme replacement therapy: conception, chaos and culmination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 915-919.
- Bremer, E. G. Schlessinger, J. und Hakomori, S. I. 1986. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosin phosphorylation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 261: 2434-2440.

- Brotherus, J. und Renkonen, O. 1977. Subcellular distributions of lipids in cultured BHK cells: evidence for the enrichment of lysobisphosphatidic acid and neutral lipids in lysosomes. *J Lipid Res* 18: 191-202.
- Burkhardt, J. K.Hüttler, S.Klein, A.Möbius, W.Habermann, A.Griffiths, G. und Sandhoff, K. 1997. Accumulation of sphingolipids in SAP-precursor (prosaposin)-deficient fibroblasts occurs as intralysosomal membrane structures and can be completely reversed by treatment with human SAP-precursor. *Eur J Cell Biol* 73: 10-18.
- Cachon-Gonzalez, M. B.Wang, S. Z.Lynch, A.Ziegler, R.Cheng, S. H. und Cox, T. M. 2006. Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10373-10378.
- Chalfant, C. E. und Spiegel, S. 2005. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci* 118: 4605-4612.
- Chang, M. H.Bindloss, C. A.Grabowski, G. A.Qi, X.Winchester, B.Hopwood, J. J. und Meikle, P. J. 2000. Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin Chem* 46: 167-174.
- Chen, H. M.Clayton, A. H.Wang, W. und Sawyer, W. H. 2001. Kinetics of membrane lysis by custom lytic peptides and peptide orientations in membrane. *Eur J Biochem* 268: 1659-1669.
- Clarke, C. J.Snook, C. F.Tani, M.Matmati, N.Marchesini, N. und Hannun, Y. A. 2006. The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry* 45: 11247-11256.
- Conzelmann, E.Burg, J.Stephan, G. und Sandhoff, K. 1982a. Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM2. *Eur J Biochem* 123: 455-464.
- Conzelmann, E.Burg, J.Stephan, G. und Sandhoff, K. 1982b. Degradation of glycolipids by water-soluble lysosomal glycosidases. *Adv Exp Med Biol* 152: 227-233.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. 1978. AB variant of infantile GM2 gangliosidosis: deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside GM2 and glycolipid GA2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 3979-83.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. 1979. Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 360: 1837-1849.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. 1983. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 6: 58-71.
- Conzelmann, E. und Sandhoff, K. 1987. Glycolipid and glycoprotein degradation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 60: 89-216.
- Cooper, M. A. 2004. Advances in membrane receptor screening and analysis. *J Mol Recognit* 17: 286-315.
- Cooper, M. A.Hansson, A.Löfås, S. und Williams, D. H. 2000. A Vesicle Capture Sensor Chip for Kinetic Analysis of Interactions with Membrane-Bound Receptors. *Analytical Biochemistry* 277: 196-205.
- Cooper, M. A.Try, A. C.Carroll, J.Ellar, D. J. und Williams, D. H. 1998. Surface plasmon resonance analysis at a supported lipid monolayer. *Biochim Biophys Acta* 1373: 101-111.
- Doering, T.Holleran, W. M.Potratz, A.Vielhaber, G.Elias, P. M.Suzuki, K. und Sandhoff, K. 1999a. Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation. *J Biol Chem* 274: 11038-11045.
- Doering, T.Proia, R. L. und Sandhoff, K. 1999b. Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* 447: 167-170.
- Düzgünes, N. 2003. Fluorescence Assay for Liposom Fusion. *Methods in Enzymology* 372.

- Düzgünes, N. und Bronner, F. 1988. Membrane Fusion in Fertilisation, Cellular transport and Viral Infection. Pages xviii/384. *Academic Press, New York*.
- Ellens, H. Bentz, J. und Szoka, F. C. 1985. H⁺- and Ca²⁺-Induced Fusion and Destabilization of Liposomes. *Biochemistrie* 24: 3099-3106.
- Eskelinen, E. L. Tanaka, Y. und Saftig, P. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol* 13: 137-145.
- Fasshauer, D. Schütte, C. und Jahn, R. 2001. Mechanisms of membran fusion. *B. I. F. Futura* 16: 13-23.
- Fischer, G. und Jatzkewitz, H. 1977. The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein. *Biochim Biophys Acta* 481: 561-572.
- Frederick, T. E. Chebukati, J. N. Mair, C. E. Goff, P. C. und Fanucci, G. E. 2009. Bis(monoacylglycero)phosphate forms stable small lamellar vesicle structures: insights into vesicular body formation in endosomes. *Biophys J* 96: 1847-1855.
- Friedland, N. Liou, H. L. Lobel, P. und Stock, A. M. 2003. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2512-2517.
- Fürst, W. Machleidt, W. und Sandhoff, K. 1988. The precursor of sulfatide activator protein is processed to three different proteins. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: 317-328.
- Fürst, W. und Sandhoff, K. 1992. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim Biophys Acta* 1126: 1-16.
- Fürst, W. Schubert, J. Machleidt, W. Meyer, H. E. und Sandhoff, K. 1990. The complete amino-acid sequences of human ganglioside GM2 activator protein and cerebroside sulfate activator protein. *Eur J Biochem* 192: 709-714.
- Gahmberg, C. G. und Hakomori, S. I. 1973. Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3329-3333.
- Geiger, B. Arnon, R. und Sandhoff, K. 1977. Immunochemical and biochemical investigation of hexosaminidase S. *Am J Hum Genet* 29: 508-522.
- Giehl, A. Lemm, T. Bartelsen, O. Sandhoff, K. und Blume, A. 1999. Interaction of the GM2-activator protein with phospholipid-ganglioside bilayer membranes and with monolayers at the air-water interface. *Eur J Biochem* 261: 650-658.
- Gieselmann, V. 1995. Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta* 1270: 103-136.
- Glombitza, G. J. Becker, E. Kaiser, H. W. und Sandhoff, K. 1997. Biosynthesis, processing, and intracellular transport of GM2 activator protein in human epidermal keratinocytes. The lysosomal targeting of the GM2 activator is independent of a mannose-6-phosphate signal. *J Biol Chem* 272: 5199-5207.
- Gravel, R. A. Clarke, J. T. Kaback, M. M. Mahuran, D. Sandhoff, K. und Suzuki, K. 1995. The GM2 Gangliosidosis. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* 7th Edition: 2839-2879.
- Grebner, E. E. Mansfield, D. A. Raghavan, S. S. Kolodny, E. H. D'Azzo, A. Neufeld, E. F. und Jackson, L. G. 1986. Two Abnormalities of Hexosaminidase A in Clinically Normal Individuals. *Am J Hum Genet* 38: 505-518.
- Hakomori, S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50: 733-764.
- Hakomori, S. 2004. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj J* 21: 125-37.
- Hama, Y. Li, Y. T. und Li, S. C. 1997. Interaction of GM2 activator protein with glycosphingolipids. *J Biol Chem* 272: 2828-2833.
- Hanada, K. 2005. Sphingolipids in infectious diseases. *Jpn J Infect Dis* 58: 131-148.

- Hanai, N. Nores, G. A. MacLeod, C. Torres-Mendez, C. R. und Hakomori, S. I. 1988. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 and lyso-GM3 in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 10915-10921.
- Hepbildikler, S. T. Sandhoff, R. Kölzer, M. Proia, R. L. und Sandhoff, K. 2002. Physiological substrates for human lysosomal beta-hexosaminidase S. *J Biol Chem* 277: 2562-2572.
- Hepbildikler, S. T. Wendeler, M. Sandhoff, R. und Sandhoff, K. 2003. Interaction of the GM2 activator protein with sulfated and sialylated glycosphingolipids. *Methods Enzymol* 363: 207-222.
- Hirschfeld. 1967. Procedures for Attenuated Total Reflection Study of Extremely Small Samples. *Appl Optics* 6: 715-718.
- Ho, M. W. und Light, N. D. 1973. Glucocerebrosidase: reconstitution from macromolecular components depends on acidic phospholipids. *Biochem J* 136: 821-823.
- Holmgren, J. Lönnroth, I. Mansson, J. F. und Svennerholm, L. 1975. Interaktion of cholera toxin and membran GM1 ganglioside of small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 2520-2524.
- Jatzkewitz, H. 1978. Existence, localization and some properties of the activators of sphingolipid hydrolases. *Adv Exp Med Biol* 101: 561-571.
- Jeyakumar, M. Thomas, R. Elliot-Smith, E. und Smith, D. A. 2003. Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126: 974-987.
- Jönsson, U. Fägerstam, L. Ivarsson, B. Johnsson, B. Karlsson, R. Lundh, K. Läfas, S. Persson, B. Roos, H. Rönnberg, I. und et al. 1991. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 11: 620-627.
- Karlsson, K. A. 1989. Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu Rev Biochem* 58: 309-350.
- Kaye, E. M. 2011. Niemann-Pick C disease: Not your average lysosomal storage disease. *Neurology* 76: 316-317.
- Kitamura, M. Iwamori, M. und Nagai, Y. 1980. Interaction between clostridium botulinum neurotoxin and gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 628: 328-335.
- Klima, H. Klein, A. van Echten, G. Schwarzmann, G. Suzuki, K. und Sandhoff, K. 1993. Overexpression of a functionally active human GM2-activator protein in Escherichia coli. *Biochem J* 292: 571-576.
- Klima, H. Tanaka, A. Schnabel, D. Nakano, T. Schröder, M. Suzuki, K. und Sandhoff, K. 1991. Characterization of full-length cDNAs and the gene coding for the human GM2 activator protein. *FEBS Lett* 289: 260-264.
- Klingenstein, R. 2002. Sphingolipid-Aktivatorproteine: Expression in *Pichia pastoris* und Untersuchungen ihrer Wechselwirkungen mit Modellmembranen. *Dissertation*. Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kobayashi, T. Beuchat, M. H. Chevallier, J. Makino, A. Mayran, N. Escola, J. M. Lebrand, C. Cosson, P. und Gruenberg, J. 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* 277: 32157-32164.
- Kobayashi, T. Beuchat, M. H. Lindsay, M. Frias, S. Palmiter, R. D. Sakuraba, H. Parton, R. G. und Gruenberg, J. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1: 113-118.
- Kobayashi, T. Stang, E. Fang, K. S. de Moerloose, P. Parton, R. G. und Gruenberg, J. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392: 193-197.
- Kolter, T. Magin, T. M. und Sandhoff, K. 2000. Biomolecule function: no reliable prediction from cell culture. *Traffic* 1: 803-804.

- Kolter, T. und Sandhoff, K. 1998. Glycosphingolipid degradation and animal models of GM2-gangliosidose. *J Inher Metab Dis* 21: 548-563.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. 1999. Sphingolipids - Their Metabolic Pathways and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. *Angewandte Chemie International Edition* 38: 1532-1568.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 81-103.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. 2006. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* 1758: 2057-2079.
- Kolter, T. Winau, F. Schaible, U. E. Leippe, M. und Sandhoff, K. 2005. Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J Biol Chem* 280: 41125-41128.
- Kytzia, H. J. und Sandhoff, K. 1985. Evidence for two different active sites on human beta-hexosaminidase A. Interaction of GM2 activator protein with beta-hexosaminidase A. *J Biol Chem* 260: 7568-7572.
- Laine, R. A. 1994. A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* 4: 759-767.
- Ledeen, R. W. Wu, G. Lu, Z. H. Kozireski-Chuback, D. und Fang, Y. 1998. The role of GM1 and other gangliosides in neuronal differentiation. Overview and new finding. *Ann N Y Acad Sci* 845: 161-175.
- Lefrancois, S. Zeng, J. Hassan, A. J. Canuel, M. und Morales, C. R. 2003. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J* 22: 6430-6437.
- Leinekugel, P. Michel, S. Conzelmann, E. und Sandhoff, K. 1992. Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum Genet* 88: 513-523.
- Liessem, B. Glombitza, G. J. Knoll, F. Lehmann, J. Kellermann, J. Lottspeich, F. und Sandhoff, K. 1995. Photoaffinity labeling of human lysosomal beta-hexosaminidase B. Identification of Glu-355 at the substrate binding site. *J Biol Chem* 270: 23693-23699.
- Linke, T. Wilkening, G. Lansmann, S. Moczall, H. Bartelsen, O. Weisgerber, J. und Sandhoff, K. 2001a. Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biol Chem* 382: 283-290.
- Linke, T. Wilkening, G. Sadeghlar, F. Moczall, H. Bernardo, K. Schuchman, E. und Sandhoff, K. 2001b. Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J Biol Chem* 276: 5760-5768.
- Locatelli-Hoops, S. 2006. Der Sap-Vorläufer und Saposin A: Darstellung und biophysikalische Charakterisierung. *Dissertation*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Locatelli-Hoops, S. Remmel, N. Klingenstein, R. Breiden, B. Rossocha, M. Schoeniger, M. Koenigs, C. Saenger, W. und Sandhoff, K. 2006. Saposin A mobilizes lipids from low cholesterol and high bis(monoacylglycerol)phosphate-containing membranes: patient variant Saposin A lacks lipid extraction capacity. *J Biol Chem* 281: 32451-32460.
- Lohner, K. Balgavy, P. Hermetter, A. Paltauf, F. und Lagner, P. 1991. Stabilization of non-bilayer structures by the etherlipid ethanolamine plasmalogen. *Biochim Biophys Acta* 1061: 132-140.

- Lui, Y. Wada, R. Kawai, H. Sango, K. Deng, C. Tai, T. McDonald, M. P. Araujo, K. J. N., C. Bierfreund, U. Sandhoff, K. Suzuki, K. und Proja, R. L. 1999. A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. *J. Clin. Invest.* 103: 497-505.
- Maceyka, M. Milstien, S. und Spiegel, S. 2005. Sphingosine kinases, sphingosine-1-phosphate and sphingolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77: 15-22.
- Mahuran, D. und Lowden, J. A. 1980. The subunit and polypeptide structure of hexosaminidases from human placenta. *Can J Biochem* 58: 287-294.
- Markwell, M. A. Svennerholm, L. und Paulson, J. C. 1981. Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5406-5410.
- Marouf, A. 2008. Untersuchung zum Wirkungsmechanismus pH-sensitiver Liposomen mit Bis(monoacylglycerophosphat (BMP) als Membranlipid. *Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br., Germany.*
- Martino, S. Cavalieri, C. Emiliani, C. Dolcetta, D. Cusella De Angelis, M. G. Chigorno, V. Severini, G. M. Sandhoff, K. Bordignon, C. Sonnino, S. und Orlacchio, A. 2002. Restoration of the GM2 ganglioside metabolism in bone marrow-derived stromal cells from Tay-Sachs disease animal model. *Neurochem Res* 27: 793-800.
- Mathias, J. D. Yong Ran Carter, J. D. und Fanucci, G. E. 2009. Interactions of the GM2 Activator Protein with Phosphatidylcholine Bilayers: A Site-Directed Spin-Labeling Power Saturation Study. *Biophys J* September 2: 1436-1444.
- Matsuzawa, Y. und Hostetler, K. Y. 1979. Degradation of bis(monoacylglycero)phosphate by an acid phosphodiesterase in rat liver lysosomes. *J Biol Chem* 254: 5997-6001.
- Mattjus, P. Molotkovsky, J. G. Smaby, J. M. und Brown, R. E. 1999. A fluorescence resonance energy transfer approach for monitoring protein-mediated glycolipid transfer between vesicle membranes. *Anal Biochem* 268: 297-304.
- Maxfield, F. R. und McGraw, T. E. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 121-132.
- Maxfield, F. R. und Yamashiro, D. J. 1987. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* 225: 189-198.
- Meier, E. M. Schwarzmann, G. Fürst, W. und Sandhoff, K. 1991. The human GM2 activator protein. A substrate specific cofactor of beta- hexosaminidase A. *J Biol Chem* 266: 1879-1887.
- Miljan, E. A. Meuillet, E. J. Mania-Farnell, B. George, D. Yamamoto, H. Simon, H. G. und Bremer, E. G. 2002. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* 277: 10108-10113.
- Möbius, W. Herzog, V. Sandhoff, K. und Schwarzmann, G. 1999. Gangliosides are transported from the plasma membrane to intralysosomal membranes as revealed by immunoelectron microscopy. *Biosci Rep* 19: 307-316.
- Möbius, W. van Donselaar, E. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, Y. Heijnen, H. F. Slot, J. W. und Geuze, H. J. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 4: 222-231.
- Morimoto, S. Kishimoto, Y. Tomich, J. Weiler, S. Ohashi, T. Barranger, J. A. Kretz, K. A. und O'Brien, J. S. 1990. Interaction of saposins, acidic lipids, and glucosylceramidase. *J Biol Chem* 265: 1933-7.
- Morimoto, S. Martin, B. M. Yamamoto, Y. Kretz, K. A. O'Brien, J. S. und Kishimoto, Y. 1989. Saposin A: second cerebroside activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3389-3393.
- Nakano, T. Sandhoff, K. Stumper, J. Christomanou, H. und Suzuki, K. 1989. Structure of full-length cDNA coding for sulfatide activator, a Co-beta- glucosidase and two other

- homologous proteins: two alternate forms of the sulfatide activator. *J Biochem (Tokyo)* 105: 152-154.
- Nettersheim, M. 2001. Die humanen Sphingolipidaktivatorproteine A, B, C, D und ihr gemeinsamer Vorläufer - Analyse der heterologen Expression im Baculovirusexpressionsvektorsystem. *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.
- Neufeld, E. F. 2004. Enzyme Replacement Therapie. Pages 327-338. *Lysosomal disorders of the brain*. Oxford university press, NY.
- O'Brien, J. S.Kretz, K. A.Dewji, N.Wenger, D. A.Esch, F. und Fluharty, A. L. 1988. Coding of two sphingolipid activator proteins (SAP-1 and SAP-2) by same genetic locus. *Science* 241: 1098-101.
- Patel, G. B. und Sprott, G. D. 1999. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol* 19: 317-357.
- Phillips, M. L.Nudelman, E.Gaeta, F. C. A.Perez, M.Sigal, A. K.Hakomori, S. I. und J.C., P. 1990. ELAM-1 mediates cell-adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. *Science* 250: 1130-1132.
- Platt, F. M. und Butters, T. D. 2004. Inhibition of substrate synthesis: a pharmacological approach for glycosphingolipid storage disease therapy. Pages 381-408. *Lysosomal Disorders of the Brain*. Oxford University Press, NY.
- Posse de Chaves, E. I. 2006. Sphingolipids in apoptosis, survival and regeneration in the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1995-2015.
- Powell, C. J. und Swan, J. B. 1959. Origin of the Characteristic Electron Energy Losses in Aluminium. *Phys Rev* 115: 869-875.
- Ran, Y. und Fanucci, G. E. 2009. Ligand extraction properties of the GM2 activator protein and its interactions with lipid vesicles. *Biophys J* 97: 257-266.
- Rommel, N. 2007. Saposin B und D: Heterologe Expression in *Pichia pastoris* und biophysikalische Charakterisierung. *Dissertation*. Universität Bonn.
- Rommel, N.Locatelli-Hoops, S.Breiden, B.Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. 2007. Saposin B mobilizes lipids from cholesterol-poor and bis(monoacylglycero)phosphate-rich membranes at acidic pH. Unglycosylated patient variant saposin B lacks lipid-extraction capacity. *Febs J* 274: 3405-3420.
- Riboni, L.Viani, P.Bassi, R.Prinetti, A. und Tettamanti, G. 1997. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* 36: 153-95.
- Ritchie, R. H. 1957. *Phys. Rev.* 106: 874-881.
- Salamon, Z.Brown, M. F. und Tollin, G. 1999. Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions within membranes. *Trends Biochem Sci* 24: 213-219.
- Salamon, Z.Macleod, H. A. und Tollin, G. 1997. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1331: 131-152.
- Salvioli, R.Tatti, M.Ciaffoni, F. und Vaccaro, A. M. 2000. Further studies on the reconstitution of glucosylceramidase activity by Sap C and anionic phospholipids. *FEBS Lett* 472: 17-21.
- Sandhoff, K. 1977. The biochemistry of sphingolipid storage diseases. *Angew Chem Int Ed Engl* 16: 273-285.
- Sandhoff, K. 2001. The GM2-gangliosidoses and the elucidation of the beta-hexosaminidase system. *Adv Genet* 44: 67-91.
- Sandhoff, K. und Christomanou, H. 1979. Biochemistry and genetics of gangliosidoses. *Hum Genet* 50: 107-143.

- Sandhoff, K., Harzer, K. und Fürst, W. 1995. Sphingolipid Activator Proteins. Pages 2427-2441 in C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, und D. Valle, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York.
- Sandhoff, K., Harzer, K., Wassele, W. und Jatzkewitz, H. 1971. Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease. *J Neurochem* 18: 2469-2489.
- Sandhoff, K. und Kolter, T. 1996. Topology of glycosphingolipid degradation. *Trends Cell Biol* 6: 98-103.
- Sandhoff, K. und Quintern, L. 1988. Sphingolipid storage diseases of the central nervous system: bases of biochemical and clinical heterogeneity. *Naturwissenschaften* 75: 123-131.
- Sandhoff, K., van Echten, G., Schröder, M., Schnabel, D. und Suzuki, K. 1992. Metabolism of glycolipids: the role of glycolipid-binding proteins in the function and pathobiochemistry of lysosomes. *Biochem Soc Trans* 20: 695-699.
- Sarmientos, F., Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. 1986. Specificity of human glucosylceramide beta-glucosidase towards synthetic glucosylsphingolipids inserted into liposomes. Kinetic studies in a detergent-free assay system. *Eur J Biochem* 160: 527-535.
- Schuck, P. 1997. Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26: 541-566.
- Schütte, C., G. Lemm, T., Glombitza, G. J. und Sandhoff, K. 1998. Complete localization of disulfide bonds in GM2 activator protein. *Protein Sci* 7: 1039-1045.
- Schwarzmann, G., Hoffmann-Bleihauer, P., Schubert, J., Sandhoff, K. und Marsh, D. 1983. Incorporation of ganglioside analogues into fibroblast cell membranes. A spin-label study. *Biochemistry* 22: 5041-5048.
- Schwarzmann, G., Wendeler, M. und Sandhoff, K. 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: 1302-1311.
- Scott, B. L., Van Komen, J. S., Liu, S., Weber, T., Melia, T. J. und McNew, J. A. 2003. Liposome fusion assay to monitor intracellular membrane fusion machines. *Methods Enzymol* 372: 274-300.
- Sillence, D. J. und Platt, F. M. 2003. Storage diseases: new insights into sphingolipid functions. *Trends Cell Biol* 13: 195-203.
- Smith A.E., L. H. u. H. A. 2003. Ganglioside-dependent cell attachment and endocytosis of murine polyomavirus-like particles. *FEBS Lett* 555: 199-203.
- Stern und Farell. 1960. *Phys. Rev.* 120: 130-136.
- Stremmel, W. und Debusch, H. 1976. Bis(monoacylglycero)phosphate-a marker lipid of secondary lysosomes? *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 357: 803-810.
- Struck, D., Hoekstra, D. und Pagano, R. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* 20: 4093-4099.
- Sun-Wada, G., H. Wada, Y. und Futai, M. 2003. Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Struct Funct* 28: 455-463.
- Svennerholm, L. 1962. The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 9: 436-441.
- Svennerholm, L. 1963. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* 10: 613-623.
- Taha, T. A., Hannun, Y. A. und Obeid, L. M. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol* 39: 113-131.

- Thompson, T. E. und Tillack, T. W. 1985. Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 14: 361-386.
- Tsai B., G., J.M., Stele T., Lencer W., Benjamin T.L. und Rapoport T.A. 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo J* 22: 4346-4355.
- Vaccaro, A. M.Tatti, M.Ciaffoni, F.Salvioli, R.Barca, A. und Scerch, C. 1997. Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. *J Biol Chem* 272: 16862-16867.
- Varki, A. P. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3: 97-130.
- Varki, A. P.Reitman, M. L. und Kornfeld, S. 1981. Identification of a variant of mucopolidosis III (pseudo-Hurler polydystrophy): a catalytically active N-acetylglucosaminylphosphotransferase that fails to phosphorylate lysosomal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7773-7777.
- Vellodi, A. 2005. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 128: 413-431.
- von Figura, K.Gieselmann, V. und Hasilik, A. 1984. Antibody to mannose 6-phosphate specific receptor induces receptor deficiency in human fibroblasts. *Embo J* 3: 1281-1286.
- Vunnam, R. R. und Radin, N. S. 1980. Analogues of ceramide that inhibit glucocerebrosidase in mouse brain. *Chem Phys Lipids* 26: 265-278.
- Walter, A.Steer, C. J. und Blumenthal, R. 1986. Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. *Biochim Biophys Acta* 861: 319-330.
- Walz, G.Aroffo, A.kolanus, W.Bevilacqua, M. und Seed, B. 1990. Recognition by ELAM-1 of sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science* 250: 1132-1135.
- Wang, M. 2010. Identification of surface residues on niemann-pick C2 essential for hydrophobic Handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes *Cell. Cell Metab.* 12 (2): 73-166.
- Wendeler, M.Hoernschemeyer, J.Hoffmann, D.Kolter, T.Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. 2004. Photoaffinity labelling of the human GM2-activator protein. Mechanistic insight into ganglioside GM2 degradation. *Eur J Biochem* 271: 614-627.
- Wendeler, M.Lemm, T.Weisgerber, J.Hoernschemeyer, J.Bartelsen, O.Schepers, U. und Sandhoff, K. 2003a. Expression of recombinant human GM2-activator protein in insect cells: purification and characterization by mass spectrometry. *Protein Expr Purif* 27: 259-266.
- Wendeler, M.Reilaender, H.Hoernschemeyer, J.Schwarzmann, G.Kolter, T. und Sandhoff, K. 2003b. Recombinant ganglioside GM2 synthase--expression in insect cells and enzyme assay. *Methods Enzymol* 363: 476-489.
- Wendeler, M.Werth, N.Maier, T.Schwarzmann, G.Kolter, T.Schoeniger, M.Hoffmann, D.Lemm, T.Saenger, W. und Sandhoff, K. 2006. The enzyme-binding region of human GM2-activator protein. *Febs J* 273: 982-991.
- Werth, N.Schuette, C. G.Wilkening, G.Lemm, T. und Sandhoff, K. 2001. Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by beta -hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J Biol Chem* 276: 12685-12690.
- Wherrett, J. R. und Huterer, S. 1972. Enrichment of bis-(monoacylglyceryl) phosphate in lysosomes from rat liver. *J Biol Chem* 247: 4114-4120.
- Wiegandt, H. 1995. The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav Brain Res* 66: 85-97.
- Wilkening, G.Linke, T. und Sandhoff, K. 1998. Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. *J Biol Chem* 273: 30271-30278.

- Wilkening, G.Linke, T.Uhlhorn-Dierks, G. und Sandhoff, K. 2000. Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2- AP. *J Biol Chem* 275: 35814-35819.
- Winau, F.Schwierzeck, V.Hurwitz, R.Rommel, N.Sieling, P. A.Modlin, R. L.Porcelli, S. A.Brinkmann, V.Sugita, M.Sandhoff, K.Kaufmann, S. H. und Schaible, U. E. 2004. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat Immunol*.
- Wood, R. W. 1912. *Phil. Mag.* 23: 310-315.
- Wright, C. S.Li, S. C. und Rastinejad, F. 2000. Crystal structure of human GM2-activator protein with a novel beta-cup topology. *J Mol Biol* 304: 411-422.
- Wright, C. S.Zhao, Q. und Rastinejad, F. 2003. Structural analysis of lipid complexes of GM2-activator protein. *J Mol Biol* 331: 951-64.
- Wu, P. und Brand, L. 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal Biochem* 218: 1-13.
- Yates, A. T. und Rampersaud, A. 1998. Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann.NY Acad.Sci.* 845: 57-71.
- Yu, R. K. 1994. Development regulation of ganglioside metabolism. *Prog Brain Res* 101: 31-44.
- Yuan, W.Qi, X.Tsang, P.Kang, S. J.Illarionov, P. A.Besra, G. S.Gumperz, J. und Cresswell, P. 2007. Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5551-5556.
- Zarghooni, M.Bukovac, S.Tropak, M.Callahan, J. und Mahuran, D. 2004. An alpha-subunit loop structure is required for GM2 activator protein binding by beta-hexosaminidase A. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 1048-1052.
- Zervas, M., Dobrenis, K., and Walkley, S. U. 2001. Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 49-64.
- Zhou, D.Mattner, J.Cantu, C., 3rdSchrantz, N.Yin, N.Gao, Y.Sagiv, Y.Hudspeth, K.Wu, Y. P.Yamashita, T.Teneberg, S.Wang, D.Proia, R. L.Leverly, S. B.Savage, P. B.Teyton, L. und Bendelac, A. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306: 1786-1789.