

# Reinigung und Charakterisierung einer lysosomalen Phospholipase A1 aus Makrophagen

## DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Frau Dipl.-Biochem. Julia Kreuzeder  
geboren am 01.09.1975 in Frankfurt am Main

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Pomorski
2. Prof. Dr. Ulrich Schaible
3. Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

eingereicht am: 08.10.2007  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2007



## Abstract

Macrophages are professional phagocytic cells involved in the uptake and degradation of senescent cells, dead cell bodies and pathogenic invaders. Phagocytosed particles are subsequently processed by lysosomal hydrolases. Thereby resulting foreign antigens can be presented to T cells to induce specific immune responses. This work focuses on one of these lysosomal hydrolases, lysosomal phospholipase A1 (PLA<sub>1</sub>). It functions as a degradative enzyme for phospholipids, the building blocks of biological membranes. Thus, PLA<sub>1</sub> not only plays a mandatory role in the decomposition of phagocytosed or autophagocytosed membranes, but could also play a role in antigen processing of lipid antigens.

Nevertheless, the gene encoding this important enzyme activity is as yet unknown. Here, we used concanavalin A chromatography, isoelectric focussing, affinity purification and gel filtration to isolate the lysosomal PLA<sub>1</sub> activity from RAW B cells and identified resulting sequences by tandem mass spectrometry. This analysis revealed for the first time the presence of PLD4, a gene product not yet described as a protein, in all PLA<sub>1</sub>-positive fractions making this gene the strongest candidate responsible for the lysosomal PLA<sub>1</sub> activity. Another identified gene product, LOC71772, though not present in all PLA<sub>1</sub>-positive fractions, is a putative candidate for another lysosomal phospholipase. It was recently described as a lysosomal protein of unknown function with homology to a Phospholipase B of *Dictyostelium discoideum*. Prospective cloning studies will reveal the role of both proteins in phospholipid degradation and host response.

Using native enzyme fractions and liposomal model membranes we further characterized the enzymatic activity of the lysosomal PLA<sub>1</sub>. Lysosomal phospholipid degradation takes place on intralysosomal membranes, thus keeping the integrity of the limiting lysosomal membrane. The presented data show that the lysosomal PLA<sub>1</sub> activity is strongly influenced by the lipid composition of the interacting membrane. Whereas only marginal PLA<sub>1</sub> activity was observed when the substrate was integrated in zwitterionic model membranes, inclusion of anionic phospholipids strongly increased PLA<sub>1</sub>-mediated degradation. The data reveal that electrostatic attraction is responsible for this effect by mediating binding of PLA<sub>1</sub> to the model membrane. Hence, PLA<sub>1</sub> activity is inhibited in solutions with increased ionic strength. The optimal pH for PLA<sub>1</sub> activity is 4-4.4 which also corresponds with the optimal pH for PLA<sub>1</sub>-binding to membranes. At a pH higher than 5.5, the enzyme cannot bind to liposomes, presumably due to electrostatic repulsion. Since the lysosomal PLA<sub>1</sub> exhibits isoelectric points at <4,4 and 5.2-5.4 the enzyme carries an overall negative charge at higher pH values.

PLA<sub>1</sub> activity is strongly enhanced by anionic phospholipids with BMP, an anionic phospholipid with a special stereoconfiguration, being the strongest catalyst. BMP is synthesized and only present within lysosomes. We postulate that one of its functions may be to modulate lysosomal lipid metabolism. We further show that PLA<sub>1</sub> works in a *scotting*-mode, meaning that upon membrane binding the enzyme remains on the membrane surface for many catalytic cycles before changing the vesicle. Lysosomal

PLA<sub>1</sub> is sorted to lysosomes by the mannose-6-phosphate signal. It has a broad substrate specificity including phosphatidyl serine, cardiolipin and phosphatidylcholine. Cationic amphiphilic drugs inhibit the lysosomal PLA<sub>1</sub> activity probably by neutralizing the negative membrane surface charge, whereas  $\beta$ -cyclodextrines have an activating effect by complexing the hydrolysis products.

In summary, this work provides the first putative identity of a lysosomal PLA<sub>1</sub> and presents a detailed analysis of the catalytic properties this enzyme. The lysosomal PLA<sub>1</sub> is putatively involved in elementary biologic processes of macrophages. This work offers the essential basis for further functional studies.

**Keywords:**

Phospholipase, Macrophage, Interfacial activation, Lysosome

## Zusammenfassung

Makrophagen sind professionelle phagozytische Zellen, deren Aufgaben die Beseitigung von körpereigenen gealterten oder toten Zellen, die Elimination von in den Körper eingedrungenen Krankheitserregern und die Aktivierung des Immunsystems einschließt. Die aufgenommenen Partikel werden von lysosomalen Hydrolasen abgebaut und daraus hervorgehende Antigene an Zellen des spezifischen Immunsystems präsentiert. Die in der vorliegenden Arbeit im Mittelpunkt stehende lysosomale Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) gehört zu diesen lysosomalen Hydrolasen. Ihre Aufgabe ist der Abbau von Phospholipiden, welche das Grundgerüst biologischer Membranen bilden. Sie spielt damit nicht nur eine elementare Rolle bei dem Abbau von Phospholipidmembranen nach Phago- und Autophagozytose, sondern kann auch an der Generation von Lipidantigenen beteiligt sein. Die Sequenz des codierenden Gens dieses wichtigen Enzyms ist bis heute unbekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden mittels Concanavalin A-Chromatographie, Isoelektrischer Fokussierung, Affinitätschromatographie und Gelfiltration aus der Mausmakrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW B zum ersten Mal zwei Proteinsequenzen isoliert, PLD4 und LOC71772, welche als Phospholipasen in Frage kommen. PLD4, das in dieser Arbeit zum ersten Mal auf Proteinebene nachgewiesen wurde, wurde in allen Fraktionen mit PLA<sub>1</sub>-Aktivität massenspektrometrisch nachgewiesen und liegt deshalb sehr wahrscheinlich der PLA<sub>1</sub>-Aktivität zugrunde. Der zweite Kandidat, LOC71772, konnte nicht in allen Fraktionen gefunden werden, ist aber als mögliche Phospholipase ebenfalls von Interesse. Er ist vor kurzem als lysosomales Protein unbekannter Funktion beschrieben worden, welches Homologien zu Phospholipase B aus *Dictyostelium discoideum* aufweist. Zukünftige Klonierungsstudien werden zeigen, welche Rolle beide Kandidaten bei der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität spielen.

Anhand von nativen Enzymfraktionen und Liposomen als Modellmembranen wurde im zweiten Teil der Arbeit genauer charakterisiert, welche Parameter die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität beeinflussen. Der lysosomale Lipidabbau findet im Allgemeinen an intralysosomalen Membranen statt. Dadurch bleibt die Integrität der limitierenden Lysosomenmembran gewährleistet. Hier wird gezeigt, dass die Lipidzusammensetzung der Membran maßgeblich die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> beeinflusst. Während an zwitterionischen Membranen kaum Phospholipidabbau stattfindet, haben in die Membran integrierte anionische Phospholipide eine stark enzymaktivierende Wirkung. Wie unsere Daten zeigen, wird diese durch elektrostatische Effekte vermittelt. Eine Erhöhung der Ionenkonzentration des umgebenden Mediums reduziert die Membranbindung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> und vermindert dadurch ihre Aktivität. Das pH-Optimum des Enzyms von 4-4,4 korrespondiert ebenfalls mit seiner Bindungsfähigkeit an die Membran. Bei pH-Werten von >5,5 findet keine Membranbindung mehr statt. Dies beruht vermutlich auf einer elektrostatischen Abstoßung durch die negativ geladene Membranoberfläche. Da die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität isoelektrische Punkte bei <4,4 und 5,2-5,4 besitzt, trägt sie bei höheren pH-Werten ebenfalls eine negative Nettoladung. Anionische Phospholipide wie Bis(monoacyl)glycerolphosphat (BMP), erhöhen stark die lysosomale PLA<sub>1</sub> Aktivität. BMP hat eine besondere Stereokonfiguration. Es wird im Lysosom synthetisiert und kommt auch nur dort vor. Wir postulieren,

dass es eine seiner Funktionen ist, den Lipidmetabolismus im Lysosom zu modulieren. Die hier präsentierten Daten zeigen im Weiteren, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> im *Scooting*-Modus arbeitet. Das bedeutet, dass sie nach der Bindung an eine Membran für viele Katalysezyklen an dieser verweilt, bevor sie auf das nächste Vesikel wechselt. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> gelangt über Mannose-6-Phosphat-Signal in das Lysosom. Sie besitzt eine breite Substratspezifität unter anderem für Phosphatidylserin, Cardiolipin und Phosphatidylserin. Kationische amphiphile Substanzen wirken als Inhibitoren, während  $\beta$ -Cyclodextrine, welche die Hydrolyseprodukte der lysosomalen PLA<sub>1</sub> komplexieren, als Aktivatoren der PLA<sub>1</sub>-Aktivität fungieren.

Die vorliegende Arbeit bietet zum ersten Mal Hinweise auf die Identität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> und präsentiert ausführliche Untersuchungen zu ihren Katalyseeigenschaften. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> ist vermutlich an elementaren biologischen Prozessen durch Makrophagen beteiligt. Diese Arbeit liefert die Grundlage für ihre weitere funktionelle Analyse.

**Schlagwörter:**

Phospholipase, Makrophage, Grenzflächenaktivierung, Lysosom

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Lysosom	1
1.1.1 Transport und Prozessierung lysosomaler Proteine	2
1.1.2 Wege von abzubauenen Molekülen in das Lysosom	4
1.1.3 Lipidabbau im Lysosom	6
1.2 Makrophagen	8
1.2.1 Rolle von Makrophagen	8
1.2.2 Antigenpräsentation	9
1.2.2.1 Präsentation von Peptidantigenen	9
1.2.2.2 Präsentation von Lipidantigenen	11
1.2.3 Der Makrophage als Wirtszelle	12
1.3 Phospholipasen	14
1.3.1 Phospholipase A <sub>1</sub>	15
1.3.1.1 Extrazelluläre Phospholipase A <sub>1</sub>	16
1.3.1.2 Intrazelluläre Phospholipase A <sub>1</sub>	17
1.3.2 Phospholipase A <sub>2</sub>	17
1.3.2.1 Sezernierte Phospholipase A <sub>2</sub>	18
1.3.2.2 Zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>	18
1.3.2.3 Kalzium-unabhängige Phospholipase A <sub>2</sub>	19
1.3.2.4 Plättchen-aktivierender Faktor Acetylhydrolasen	19
1.3.2.5 Differenzierung und Rolle der einzelnen PLA <sub>2</sub>	20
1.3.3 Lysosomale Phospholipasen A	20
1.3.3.1 Lysosomale Phospholipase A <sub>1</sub>	20
1.3.3.2 Lysosomale Phospholipase A <sub>2</sub>	21
1.3.4 Phospholipase B	21
1.3.5 Phospholipase C	22
1.3.6 Phospholipase D	22
1.4 Grenzflächenaktivierung	24
1.5 Ziel der Arbeit	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1 Material	27
2.1.1 Zellkultur	27
2.1.2 Puffer und Lösungen	27

2.1.3	Chemikalien . . . . .	28
2.1.4	Radiochemikalien . . . . .	29
2.1.5	Enzyme . . . . .	29
2.1.6	Gebrauchswaren . . . . .	29
2.1.7	Geräte . . . . .	30
2.1.8	Software . . . . .	30
2.1.9	Verzeichnis der Zulieferer . . . . .	31
2.2	Methoden . . . . .	32
2.2.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	32
2.2.1.1	Zellpassage . . . . .	32
2.2.1.2	Herstellen von Zellkulturüberständen zur Enzymreini- gung . . . . .	32
2.2.1.3	Zellen einfrieren . . . . .	32
2.2.1.4	Zellen auftauen . . . . .	33
2.2.1.5	Präparation von Lysosomen . . . . .	33
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	33
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung mittels BCA . . . . .	33
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford . . . . .	34
2.2.2.3	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	34
2.2.2.4	Färbung von Proteingelen . . . . .	35
2.2.2.5	Konzentration von Proteinen . . . . .	35
2.2.2.6	Dialyse . . . . .	36
2.2.2.7	Deglykosylierung . . . . .	36
2.2.3	Liposomenherstellung . . . . .	36
2.2.4	Phospholipase-Assays . . . . .	37
2.2.4.1	HPTLC . . . . .	38
2.2.5	Methoden zur Enzymreinigung . . . . .	38
2.2.5.1	Renaturierung . . . . .	38
2.2.5.2	Triton X-114 Phasentrennung . . . . .	39
2.2.5.3	FPLC-Chromatographie . . . . .	39
2.2.5.4	Anionenaustausch-Chromatographie . . . . .	40
2.2.5.5	Kationenaustausch-Chromatographie . . . . .	40
2.2.5.6	Isoelektrische Fokussierung . . . . .	41
2.2.5.7	Concanavalin A-Chromatographie . . . . .	41
2.2.5.8	Material für Affinitätsreinigung . . . . .	42
2.2.5.9	Massenspektrometrische Analyse mittels LC/MS/MS . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Enzymreinigung . . . . .	45
3.1.1	Ausgangsmaterial . . . . .	47
3.1.2	Renaturierung . . . . .	48
3.1.3	Erfolgreiche Anreicherung und Isolierung der lysosomalen PLA <sub>1</sub> . . . . .	50
3.1.3.1	Ammoniumsulfatfällung . . . . .	50
3.1.3.2	Bindung an Concanavalin A-Sepharose . . . . .	50
3.1.3.3	Isoelektrische Fokussierung . . . . .	52
3.1.3.4	Affinitätsbindung . . . . .	55

3.1.3.5	Präparation der Proben für die Massenspektrometrie	57
3.1.3.6	Gelfiltration	58
3.1.3.7	Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS)	61
3.1.3.8	PLD-Analyse der Proben mit PL A <sub>1</sub> -Aktivität	64
3.1.3.9	Computerunterstützte Untersuchungen der gefundenen Sequenzen	65
3.1.3.10	Weitere Informationen zu PLD4	68
3.1.3.11	Weitere Informationen zu LOC71772 und LOC196463	70
3.2	Charakterisierung	72
3.2.1	Aktivität am neutralen versus anionischen Liposom	72
3.2.2	Kinetik der Enzymaktivität	73
3.2.3	Zum Effekt von $\beta$ -CD	75
3.2.4	Einfluss der Ionenkonzentration auf die PL A <sub>1</sub> -Aktivität	76
3.2.5	Enzymbindung am neutralen versus anionischen Liposom	78
3.2.6	Bestimmung des pH-Optimums	79
3.2.7	Temperaturoptimum	81
3.2.8	Effekte einzelner Lipide	82
3.2.9	BMP steigert PS und PE-Degradation	83
3.2.10	Inhibitoren der PLA <sub>1</sub> -Aktivität	84
3.2.11	Katalysemodus	84
3.2.12	Zur Substratspezifität	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
4.1	Entwicklung der Reinigungsstrategie der lysosomalen PLA <sub>1</sub>	90
4.2	Renaturierung der PLA <sub>1</sub> -Aktivität	96
4.3	Reinigung der lysosomalen PLA <sub>1</sub> -Aktivität	97
4.4	Interpretation der Massenanalysen	99
4.4.1	Vergleich unserer Daten mit bisher publizierten Ergebnissen zur lysosomalen PLA <sub>1</sub> -Aktivität	103
4.5	Zur Charakterisierung	105
4.5.1	Entwicklung eines angemessenen Assaysystems	106
4.5.2	Negative Ladung auf der Membranoberfläche verstärkt Membranbindung und damit Aktivität der lysosomalen PLA <sub>1</sub>	108
4.5.2.1	Zur Inhibition der lysosomalen PLA <sub>1</sub> -Aktivität durch CADs	111
4.5.3	Zur Ursache des sauren pH-Optimums der lysosomalen PLA <sub>1</sub>	111
4.5.4	Die Wirkung von BSA und $\beta$ -CD auf die lysosomale PLA <sub>1</sub>	114
4.5.5	Lysosomale PLA <sub>1</sub> arbeitet im <i>Scooting</i> -Modus	115
4.5.6	Zur Rolle einzelner anionischer Phospholipide	115
4.6	Zur Rolle des Enzyms	122
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>142</b>
	<b>Anhang</b>	<b>143</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>150</b>

**Selbständigkeitserklärung**

**151**

**Danksagung**

**153**

# Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
ACN	Acetonitril
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BCA	Bicinchoninsäure, 4,4-Dicarboxy-2,2-bichinolin
$\beta$ -CD	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
BMP	Bis(monoacylglycerol)phosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CADs	<i>cationic amphiphilic drugs</i> , kationische amphiphile Substanzen
CL	Cardiolipin
Con A	Concanavalin A
DAG	Diacylglycerol
DC	<i>dendritic cells</i> Dendritische Zellen
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DLCL	Dilysocardiolipin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FFS	Freie Fettsäure
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> Schnelle Protein Flüssigkeitschromatographie
FS	Fettsäure
G	Grundliposom
GA	Golgi-Apparat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPTLC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie ( <i>High Performance Thin Layer Chromatography</i> )
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IRS	( <i>Interfacial Recognition Site</i> , Grenzflächenerkennungsdomäne
K	Komplettliposom
kDA	Kilodalton
LAMP	lysosomenassoziierte Membranproteine
LC/MS/MS	Flüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LIMP	lysosomale integrale Membranproteine
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i> , Lysophosphatidsäure
LPLA2	Lysosomale PLA <sub>2</sub>
LRO	<i>lysosome related organelles</i> , dem Lysosom verwandte Organellen
LUV	Großes unilamellares Vesikel ( <i>large unilamellar vesicle</i> )
M6P	Mannose-6-Phosphat
MALDI-MS	Matrix-assoziierte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MLV	Multilamellares Vesikel
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
MPR300	kationen-unabhängiger Mannose-6-Phosphat Rezeptor, 275-300kDa
MPR46	kationen-abhängiger Mannose-6-Phosphat Rezeptor, 46kDa
MS	Massenspektrometrie
MVB	Multivesikuläres Körperchen <i>multivesicular body</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Na	Natrium
NaAc	Natrium-Acetat
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pI	Isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol
PLA1	Phospholipase A <sub>1</sub>
PLA2	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D family, member 4
PLD4	Phospholipase D family, member 4
PS	Phosphatidylserin
r.t.	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SM	Sphingomyelin
SUV	Kleines unilamellares Vesikel <i>Small unilamellar vesicle</i>
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin

TG	Triglyceride
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TLCK	N-p-Tosyl-L-lysinchloromethylketonhydrochlorid TR
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
TX-100	Triton X-100
ÜS	Überstand
VM	Vollmedium



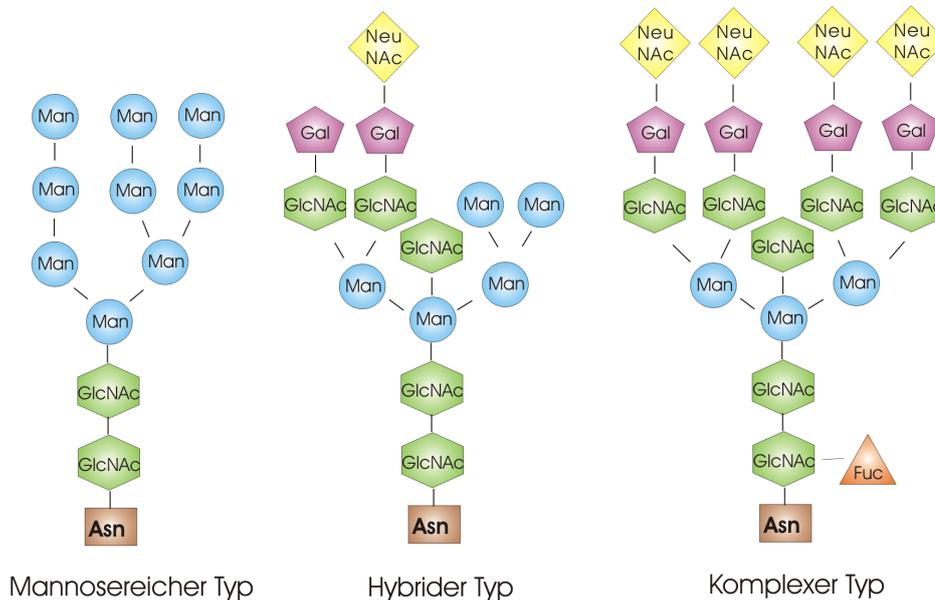
# 1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Reinigung und Charakterisierung eines lysosomalen Enzyms, der lysosomalen Phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) aus Makrophagen. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der äußeren Acylgruppe (sn-1 Position) von Phospholipiden. In den folgenden Kapiteln wird ein Überblick über den Wirkungsort dieser PLA<sub>1</sub>, das Lysosom, über den Makrophagen und über die Enzymfamilie der Phospholipasen gegeben.

## 1.1 Das Lysosom

Lysosomen wurden in der Mitte des letzten Jahrhunderts von De Duve und Mitarbeitern als membranumschlossene Kompartimente eukaryontischer Zellen beschrieben, in welchen vornehmlich katabole Stoffwechselprozesse stattfinden [48]. Für die Degradation von Makromolekülen aller Art befinden sich im Lysosom mindestens 50-60 lösliche Hydrolasen und zugehörige Helferproteine [96], welche bei sauren lysosomalen pH-Werten von 4,5-5,5 aktiv sind. Zu ihnen gehören Lipasen, Glykosidasen, Proteasen, Nukleasen, Phosphatasen, Sulfatasen und Phospholipasen, wie die in dieser Arbeit untersuchte lysosomale PLA<sub>1</sub>. Die Abbauprodukte können anschließend für ihre Wiederverwendung durch Membrantransportproteine in das Zytoplasma ausgeschleust, exozytiert oder an antigenpräsentierende Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden und damit eine Immunantwort auslösen [87, 108].

Oftmals führt der Defekt eines lysosomalen Enzyms zu der Ausbildung einer lysosomalen Speicherkrankheit. In diesem Falle kann das entsprechende Substrat im Lysosom nicht mehr abgebaut werden und reichert sich in der Zelle an. Man kennt bis heute allein über 40 lysosomale Speicherkrankheiten, welche durch den Ausfall eines lysosomalen Enzyms verursacht werden. Ursache der Enzymdefekte sind i. d. R. angeborene Mutationen in den codierenden Genen [62]. Bisher ist keine lysosomale Speicherkrankheit bekannt, welche durch den Ausfall einer lysosomalen Phospholipa-



**Abbildung 1.1: Typen von N-Glykosylierungen.** Die Abbildung zeigt beispielhaft den Aufbau von mannosereichen, komplexen oder hybriden N-Glykosylierungen. **Man:** Mannose, **Gal:** Galaktose, **GlcNAc:** N-Actetylglucosamin **NeuNAc:** Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure), **Fuc:** Fucose, **Asn:** Asparagin

se verursacht wird.

### 1.1.1 Transport und Prozessierung lysosomaler Proteine

Wie viele andere Glykoproteine gelangen auch lysosomale Proteine während der Translation in das raue Endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie an selektiven Asparaginstellen glykosyliert werden. Nach Prozessierung der übertragenen Oligosaccharidketten werden die lysosomalen Proteine über Transportvesikel in das *cis*-Kompartiment des Golgi-Apparates (GA) transportiert. Hier erfahren die N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten weitere Modifikationen, welche man in zwei grundsätzliche Typen einteilen kann: den komplexen und den mannosereichen Typ. Wie der Name andeutet, besteht letzterer ausschließlich aus Mannosemonomeren, welche in einigen Fällen noch einen N-Actetylglucosamin (GlcNAc)-Rest tragen können. Der komplexe Typ setzt sich aus mehreren verschiedenen Monomeren zusammen. Hier findet man neben GlcNAc-Resten auch Galactose, Sialinsäure (N-Acetylneuraminsäure). Beide Typen enthalten dieselbe Kernstruktur aus zwei GlcNAc- und drei Mannose-Gruppen. Neben diesen beiden Typen kennt man noch eine hybride Form, welche Merkmale von beiden Typen vereint. Abbildung 1.1 zeigt Beispiele für die Typen von N-Glykosylierungen.

Die Oligosaccharidseitenketten von lysosomalen Proteinen erhalten eine weitere

Modifikation, welche ihre Segregation<sup>1</sup> in das Lysosom erlaubt: Sie werden an einem oder mehreren Mannose-Resten in C-6 Position phosphoryliert. Der entstandene Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rest adressiert sie für den Transport in das Lysosom, indem er die spezifische Bindung an membranständige M6P-Rezeptoren (MPRs) im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) erlaubt. Jene initiieren anschließend den vesikulären Transport vom TGN in das endosomale/lysosomale Kompartimente [111]. Ein variabler Teil von 5-30% der neu-synthetisierten lysosomalen Proteine entgehen jedoch der Bindung an einen der MPRs im TGN. Sie werden stattdessen sezerniert [26, 110, 125, 163].

Säugetierzellen besitzen zwei unterschiedliche Arten von MPRs: einen Kationen-abhängigen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 46 kDa (MPR46) und einen Kationen-unabhängigen mit einem Molekulargewicht von 275-300 kDa (MPR300) [76]. Sie binden unterschiedliche Subpopulationen von löslichen lysosomalen Proteinen [163]. Der Ausfall einer der Rezeptoren kann daher nicht hinreichend durch den anderen kompensiert werden [146]. Die Bindungskapazität der MPRs ist bei pH 6-6,3, wie er im TGN herrscht, am größten. Der pH-Wert-Abfall unter 6 in späten Endosomen induziert die Dissoziation der Rezeptor-Protein-Komplexe. Nach Freisetzung der Liganden an ihrem Bestimmungsort kehren die MPRs zum TGN zurück und stehen für neue Transportrunden zur Verfügung [76].

Die MPRs zirkulieren jedoch nicht nur konstitutiv zwischen TGN und späten Endosomen, sondern gelangen auf ihrer Reise durch die Zelle auch in die Plasmamembran. Der MPR300 ist, im Gegensatz zum MPR46, in der Lage, auch beim extrazellulärem pH-Wert von 7,4 M6P-markierte lysosomale Proteine zu binden und ihre Endozytose auszulösen. Zunächst fälschlich sezernierte lysosomale Proteine können auf diese Art doch noch ihr Zielkompartiment erreichen [214]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden wird, gelangt auch die lysosomale PLA<sub>1</sub> mittels des M6P-Signals in das Lysosom.

Es sei erwähnt, dass einige wenige lysosomale Proteine alternativ sortiert werden. Ein hierfür verantwortlicher Rezeptor ist das Sortilin. Es transportiert z. B. die lysosomalen Aktivatorproteine Saposine A-D und GM2 in das Lysosom [74, 118].

Sind die lysosomalen Proteine einmal in das späte Endosom/Lysosom gelangt, müssen viele von ihnen durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Diese Hydrolasen werden im ER als inaktive Proenzyme synthetisiert und erfahren ihre Reifung zu aktiven Enzymen erst im sauren Milieu der Lysosomen [73].

---

<sup>1</sup>Segregation: von lat. *segregare* = entfernen, trennen. Hier ist die Trennung der lysosomalen Proteine von denen des sekretorischen Weges gemeint, also die Sortierung der Proteine nach ihrem Bestimmungsort.

Tabelle 1.1: Endo-/Phagosomale Reifungsmarker nach [231]

Bezeichnung	Marker	pH-Wert
frühes Endosom/Phagosom	Early endosome antigen 1 (EEA1), Rab5, Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PIP3), Transferrin, Syntaxin 13	6,0-6,5
spätes Endosom/Phagosom	Rab7, Rab9, MRP, LAMP-1/-2, v-ATPase, Bis(monoacylglycerol)phosphat, Syntaxin 7	5,5-6,0
Lysosom/Phagolysosom	LAMP-1/-2, reifes Cathepsin D, <i>kein</i> Rab7 oder MRP	4,0-5,5

### 1.1.2 Wege von abzubauenen Molekülen in das Lysosom

[b]

Abzubauenen Makromoleküle gelangen über Prozesse wie Endozytose, Autophagie oder direkten Transport in das Lysosom [108].

Der Vorgang der Endozytose beginnt auf der Zelloberfläche. Hierbei wird extrazelluläres Material durch Einstülpung der Plasmamembran und anschließendes Abschnüren eines Vesikels in das Zellinnere aufgenommen. Es entsteht ein endozytotisches Vesikel, das als „frühes Endosom“ bezeichnet wird.

Die Rezeptor-unabhängige Aufnahme von gelösten (flüssigen) Stoffen bezeichnet man als (Mikro-)pinozytose. Sie wird von allen Zellen zum Zweck der Nährstoffaufnahme verwendet („Zelltrinken“).

Mit Hilfe der Rezeptor-vermittelten Endozytose können extrazelluläre Liganden selektiv gebunden und anschließend in Clathrin-umhüllte Vesikel integriert werden.

Die Phagozytose ist ein Spezialfall der Endozytose. Hierbei werden in Rezeptor- und Aktin-abhängiger Weise große Partikel, wie Mikroorganismen oder tote Zellen, in das so genannte frühe Phagosom aufgenommen. Während die Pinozytose in den meisten eukaryontischen Zellarten ständig abläuft, sind nur einige spezialisierte Zellen des Immunsystems fähig zur Phagozytose. Dazu gehören unreife Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), Neutrophile und Makrophagen. Die beiden letzteren bezeichnet man auch als professionelle Phagozyten, da die Phagozytose ihre primäre Funktion darstellt.

Sowohl Endosomen, als auch Phagosomen durchlaufen im Normalfall nach ihrer Entstehung einen Reifungsprozess, durch welchen die zum Abbau bestimmten Makromoleküle oder Partikel in das Lysosom gelangen. Die Reifung geht mit einer Veränderung der Protein- und Lipidzusammensetzung und einer Erniedrigung des pH-Werts

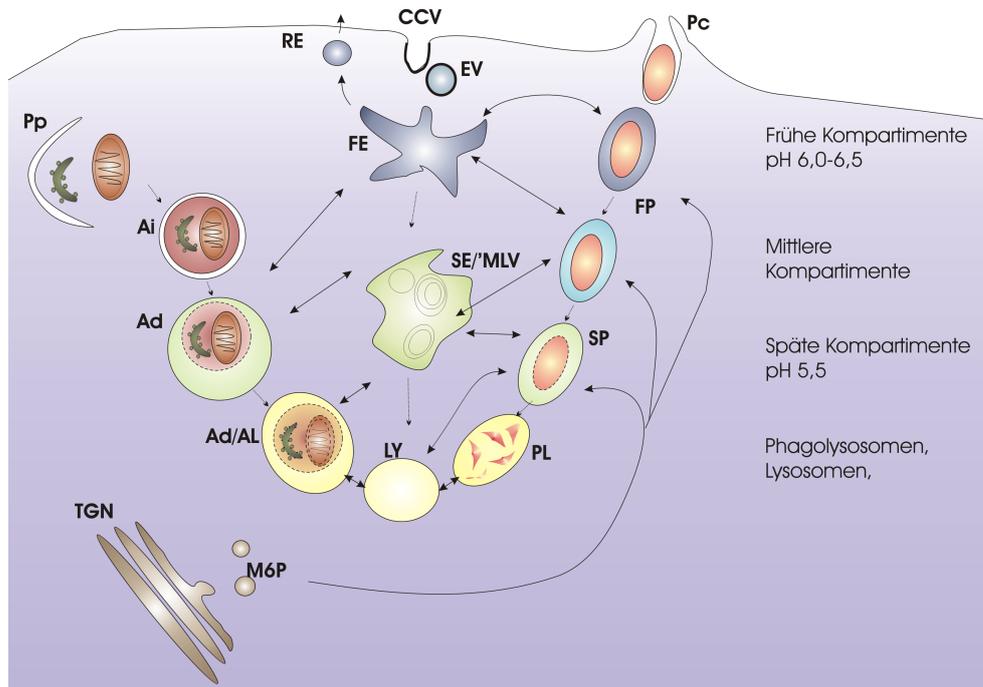
einher. Entsprechend können die Reifestadien durch typische subzelluläre Reifungsmarker differenziert werden. Einen Überblick gibt die Tabelle 1.1. Während in den frühen Endosomen mit einem pH-Wert von 6 noch keine sauren Hydrolasen zu finden sind, enthalten späte Endosomen lysosomale Enzyme und weisen einen niedrigeren pH-Wert von 5,5 oder weniger auf.

Zum Übergang von spätem Endosom zum Lysosom existieren verschiedene Modelle. Murphy *et al.* [147] gehen von einer Reifung vom spätem Endosom zum Lysosom aus, wohingegen Mellman und Warren [134] einen vesikulären Transport zwischen diesen Kompartimenten beschrieben. Mullock und Kollegen [144] vermuten, dass die späten Endosomen komplett mit Lysosomen zu einem Hybridorganell fusionieren. Aus diesem sollen dann durch Reifung wieder Lysosomen entstehen [167]. Laut der *kiss and run*-Hypothese sollen die späten Endosomen/Phagosomen vorübergehend mit Lysosomen fusionieren, Inhaltsstoffe austauschen und sich wieder abschnüren [215].

Endo- und Phagosomenreifung sind stark miteinander verknüpft und laufen in der gleichen Hierarchie ab. Makrophagen phagozytieren Pathogene und tote Zellen, um diese zu degradieren. Die phagozytische Vakuole erwirbt während der Reifung antimikrobielle und lytische Eigenschaften. Dazu bedarf es der sequenziellen Interaktion mit verschiedenen Kompartimenten des endolysosomalen Weges [222, 231]. Frühe Phagosomen fusionieren hierbei nacheinander mit frühen, mittleren und späten endosomalen Kompartimenten, übernehmen dabei deren Eigenschaften und erhalten Determinanten für weitere Reifungsschritte. Aus diesem Grund enthalten Phagosomen und Endosomen im gleichen Reifestadium die gleichen Reifemarker.

Die Autophagozytose dient, im Gegensatz zur Endozytose, dem Abbau von zelleigenem Material. Damit stellt sie für Säugerzellen u. a. einen wichtigen Überlebensmechanismus während kurzer Hungerzeiten dar und erlaubt die Wiederverwertung von zelleigenem Material [49]. Nach einem Induktionssignal formt sich eine Doppelmembran um einen Teil des Zytoplasmas oder auch um Zellorganellen. Es entsteht ein frühes Autophagosom, welches, wie Endosomen und Phagosomen, einen Reifungsprozess durchläuft, der auf der Stufe des Lysosoms endet. Auch hierbei finden Fusionen mit dem endosomalen Kompartiment statt [231]. Im Lysosom wird der eingeschlossene Inhalt schließlich degradiert.

Neben dem eben dargestellten makroautophagozytischen Prozess kennt man noch die Mikroautophagozytose und die Chaperon-vermittelte Autophagozytose. Erstere ist durch eine Invagination der Lysosomenmembran in die lysosomale Matrix gekennzeichnet, durch welche nicht-selektiv zytosolische Komponenten und eine Fraktion der limitierenden lysosomalen Membran in das Innere des Lysosoms gelangen [43]. Bei der



**Abbildung 1.2: Wege ins Lysosom: Autophagie, Endozytose, Phagozytose** Abbildung in Anlehnung an Eskelinen und Vieira [49, 231]. Die Abbildung veranschaulicht die Parallelen bei den Reifungsprozessen von Autophagosomen, Endosomen und Phagosomen. Fusionen bzw. Austauschprozesse zwischen den Komponenten des endosomalen Weges und denen der (auto-)phagosomalen Wege werden durch die verbindenden Pfeile angezeigt. **Ad**: degradierendes (spätes) Autophagosom (auch spätes autophagozytische Vakuole oder Amphisom genannt), **Ai**: initiales (frühes) Autophagosom (frühe autophagozytische Vakuole oder Amphisom genannt), **AL**: Autolysosom, **CCV**: clathrinüberzogene Einstülpung, **EV**: clathrinüberzogener Endozytosevesikel, **FE**: frühes, sortierendes Endosom, **FP**: frühes Phagosom, **LY**: Lysosom, **M6P**: M6P-Protein Transportvesikel, **MVB**: multivesikuläres Körperchen (multivesicular body), **PC**: Phagocytotic cup, **PL**: Phagolysosom, **Pp**: Phagophor, **RE**: Recycling Endosom, **SE**: spätes Endosom, **SP**: spätes Phagosom, **TGN**: Trans-Golgi-Netzwerk.

Chaperon-vermittelten Autophagozytose gelangen bestimmte Proteine durch direkten Transport aus dem Zytosol in die Lysosomen [42].

Die in diesem Kapitel erläuterten Wege, wie abzubauenende Makromoleküle in das Lysosom gelangen, und ihre Parallelen sind in Abbildung 1.2 modellhaft dargestellt.

Die aufgenommenen Partikel werden schließlich von den lysosomalen Hydrolasen degradiert. Zu ihnen gehört die hier untersuchte PLA<sub>1</sub>. Die vorliegende Arbeit wird aufzeigen, welche Parameter der Abbau von Membranen durch die lysosomale PLA<sub>1</sub> bestimmen.

### 1.1.3 Lipidabbau im Lysosom

Angesichts der aggressiven hydrolytischen Bedingungen im Lysosom stellt sich die Frage, wie die Integrität der limitierenden endosomalen/lysosomalen Membran ge-

währleistet bleibt. Die limitierende Membran muss intakt bleiben, während Lipide, welche zum Abbau bestimmt sind, hydrolysiert werden.

Das späte Endosom/Lysosom löst diese Aufgabe, indem es zwei unterschiedliche Membranfraktionen ausbildet. Die limitierende Membran wird durch eine dicke Glykokalix-Schicht geschützt, welche an integrale oder periphere Membranproteine gebunden ist [50]. Die lysosomenassoziierten Membranproteine (LAMP) -1 und -2 und die lysosomalen integralen Membranproteine (LIMP) -1 und -2 gehören zu diesen hoch glykosylierten Proteinen der limitierenden Membran. Abzubauen Lipide und Proteine werden hingegen in die intralysosomale Membranfraktion sortiert [63, 68]. Häufig werden diese Strukturen auch multivesikuläre Körperchen (MVBs) genannt. Während der endosomalen Reifung unterliegen beide Membranfraktionen einem intensiven Umbau (*remodeling*), bei welchem sowohl Membranproteine als auch Lipide umverteilt werden. Hierbei entscheidet sich auch, welche Moleküle an die Plasmamembran zurück transportiert (recycelt) und welche letztendlich degradiert werden [68].

Es ist schon seit längerem bekannt, dass Lipide bei dieser Sortierung eine aktive Rolle spielen. Cholesterol und Sphingomyelin sind zum Beispiel am Proteinrecycling während der Reifung beteiligt [129]. Damit erklärt sich auch die Abwesenheit von Cholesterol in den intralysosomalen Membranen [59, 225].

Die intralysosomalen Membranen zeichnen sich durch das Vorhandensein eines besonderen Lipids, das Bis(monoacylglycerol)phosphat (BMP)<sup>2</sup> aus [105, 149].

BMP ist ein anionisches, kegelförmiges Phospholipid, welches wahrscheinlich in der intralysosomalen Membran aus Cardiolipin (CL) und Phosphatidylglycerol (PG) synthetisiert wird und aufgrund seiner ungewöhnlichen Stereokonfiguration recht resistent gegen den Angriff lysosomaler (Phospho-)lipasen ist [8]. Es wird derzeit kontrovers diskutiert, ob BMP als Regulator an der internen Membranorganisation und -funktion beteiligt sein könnte. Einige Autoren sprechen BMP die Fähigkeit zu, Invaginationen in Liposomen auszulösen und damit interne Vesikel zu bilden [104]. Andere konnten dieses Phänomen in ihren Arbeiten nicht feststellen [82]. BMP scheint jedoch für die Aussortierung von Cholesterol aus MVBs wichtig zu sein [37]. So führen BMP-Antikörper zu einer lysosomalen Cholesterolspeicherung, wie sie auch bei Patienten mit dem Niemann-Pick Typ C-Syndrom beobachtet wird [103].

---

<sup>2</sup>Oftmals auch als *Lyso-bisphosphatidic acid*, LBPA, bezeichnet.

**Tabelle 1.2:** *Bezeichnungen von residenten Gewebsmakrophagen und DCs myeloiden Ursprungs*

Bezeichnung	Gewebe
Kupffer-Zellen	Leber
Alveolarmakrophagen	Lungenalveolen
Osteoklasten	Knochenmatrix
Mikrogliazellen	Nervensystem
Histiozyten	Bindegewebe
Pleuramakrophagen	Pleurahöhle
Peritonealmakrophagen	Peritonealhöhle
Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems	Milz, Leber, Knochenmark
Langerhans-Zellen	Haut
Myeloide DCs	Milz, Lymphknoten

## 1.2 Makrophagen

### 1.2.1 Rolle von Makrophagen

Makrophagen entwickeln sich aus Blutmonozyten, welche kontinuierlich in Gewebe und Körperhöhlen einwandern. An ihrem Bestimmungsort wandeln sich die Monozyten in langlebige residente Makrophagen um, welche sich kaum noch vermehren. Je nachdem, in welchem Gewebe sie sesshaft werden, unterscheiden sie sich in Morphologie, Physiologie und Funktion. Entsprechend haben sie unterschiedliche Bezeichnungen erhalten. Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über wichtige Makrophagentypen.

Myeloide DCs können durch Reifung aus derselben myeloiden Vorläuferzelle wie Makrophagen entstehen und können daher als mit Makrophagen verwandte Zellen betrachtet werden. Ein zweite DC Population, die plasmazytoiden DCs, entstehen aus einer anderen Vorläuferlinie [200].

Makrophagen übernehmen folgende allgemeine Aufgaben im Körper:

- Abbau von toten Zellen bzw. deren Zelltrümmer und Beseitigung von gealterten Erythrozyten
- Aufnahme und Abtötung von in den Körper eingedrungenen Pathogenen
- Abtötung von Tumorzellen
- Mitwirkung beim Aufbau der spezifischen zellulären Immunantwort gegen eingedrungene Erreger durch Prozessierung und Präsentation von Fremdartigenen und Stimulation von T-Helferzellen durch Zytokine.

Als professionelle Phagozyten nehmen Makrophagen ständig jede Art von körpereigenem Zellschrott und körperfremde Partikel auf, um diese zu abzubauen. So phagozytieren z. B. die Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems gealterte Erythrozyten und entfernen sie somit aus der Zirkulation. Auch durch apoptotische oder nekrotische Prozesse sterben im Organismus fortwährend Zellen. Zu diesen gehören z. B. Effektorlymphozyten nach Antigenkontakt und inflammatorische Zellen, die in verletzte Gewebe rekrutiert wurden. Daher besteht der größte Anteil an phagozytiertem Material aus körpereigenen Zellen und nicht etwa aus Pathogenen [216].

Je nach Art des phagozytierten Materials werden im Makrophagen unterschiedliche Antworten ausgelöst. So löst die Phagozytose von apoptotischen Zellen eine aktive, anti-inflammatorische Reaktion aus [52]. Auf diese Weise ist der Organismus vor unkontrollierten entzündlichen Prozessen und Autoimmunreaktionen geschützt. Die Phagozytose von Pathogenen hat hingegen in der Regel die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren zur Folge [216]. Bei dem Abbau der aufgenommenen Makromoleküle entstehen Bruchstücke aus Proteinen und Lipiden, welche als Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. Es ist bisher noch unklar, ob und inwiefern auch Lipide für die Präsentation prozessiert werden müssen. Die Antigene können von T-Helferzellen des Immunsystems erkannt werden und den Aufbau einer spezifischen Immunantwort auslösen. Makrophagen sind damit sowohl Teil der angeborenen (unspezifischen), als auch erworbenen (spezifischen) Immunabwehr.

Zur Erkennung des zu phagozytierenden Materials besitzen Makrophagen eine Vielzahl von mehr oder weniger spezifischen Rezeptoren, welche molekulare Muster (*molecular pattern*) binden. Dazu gehören u. a. Toll-ähnliche Rezeptoren, *scavenger*-Rezeptoren, Integrine und Lektine [216].

Entzündungsreize können die phagozytotischen und antigenpräsentierenden Eigenschaften von Makrophagen verstärken. Zusätzlich führen sie zu einer Erweiterung des Funktionsspektrums des Makrophagen, die der Elimination des Entzündungsherdes/Krankheitserregers dienen. Dazu gehört u. a. die Produktion von antimikrobiell wirkenden Sauerstoff- und Stickstoffradikalen. Diese so genannte „Aktivierung“ des Makrophagen ist essentiell für die Immunreaktion gegen viele Bakterien.

## 1.2.2 Antigenpräsentation

### 1.2.2.1 Präsentation von Peptidantigenen

T-Zellaktivierung bedarf der Erkennung von Fremdan antigenen, welche an spezielle antigenpräsentierende Moleküle gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen gehören Makrophagen, DCs und B-Zellen. Peptidantigene assoziieren mit den Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC-Komplex). Diese Peptidrezeptoren kommen in zwei Klassen, I und II, vor. Während sich die MHC-Klasse I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen befinden, werden MHC-Klasse II-Moleküle nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, wie B-Lymphozyten, Makrophagen, DCs und Langerhans-Zellen exprimiert.

Generell werden die beiden MHC-Klassen auf unterschiedlichen Wegen mit Antigen beladen. Im Zytosol synthetisierte intrazelluläre Proteine werden durch das Proteasom abgebaut und die entstehenden Peptidfragmente unter Vermittlung eines Transportkomplexes (TAP) in das ER geschleust. Hier erfolgt die Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle und der nachfolgende Transport auf die Zelloberfläche. Auf diese Art präsentiert jede Körperzelle einen Satz von Peptiden, durch den sie als „sie selbst“ erkennbar ist. Mit Viren infizierte Zellen bieten Peptide von Virusproteinen auf MHC-Klasse I-Molekülen dar und können so als befallen erkannt und von zytotoxischen T-Zellen eliminiert werden.

MHC-Klasse II-Moleküle präsentieren extrazelluläre Antigene, welche über das endosomale/phagosomale System in die Zelle gelangt sind. An diesen Molekülen befinden sich also Peptidfragmente von Partikeln, die von Phagozyten aufgenommen und abgebaut werden.

Ist man lange Zeit von einer strikten Trennung der MHC-Klasse I und II-Präsentationswege ausgegangen, so weiß man heute, dass Phagozyten manche Antigene kreuzpräsentieren können. Hierbei werden extrazelluläre Antigene an MHC-Klasse I oder zytosolische Antigene an MHC-Klasse II gebunden und auf der Zelloberfläche dargeboten. Dabei spielen Transportvorgänge zwischen Zellen eine Rolle [192, 193, 198, 241].

Warum ist es wichtig, an welcher Klasse von MHC-Molekül das Antigen präsentiert wird? Die MHC-Klasse I und II werden von unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen erkannt und lösen daher unterschiedliche Reaktionen aus. Fremdpeptide, welche an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden sind, werden von CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen erkannt. Diese sind in der Lage, die präsentierende Zelle zu lysieren und sie in Apoptose zu schicken.

An MHC-Klasse II-Moleküle gebundene Antigene werden hingegen von CD4-positiven T-Helferzellen erkannt. Diese können inflammatorische  $T_H1$ -Zellen oder  $T_H2$ -Helferzellen sein. Erstere sind auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert und produzieren zu diesem Zweck Interferon  $\gamma$  und Moleküle der Tumornekrosefaktorfami-

lie.  $T_H2$ -Helferzellen hingegen lösen die Affinitätsreifung, die klonale Expansion und Differenzierung von B-Lymphozyten aus und induzieren damit die Produktion von bestimmten Antikörper-Isotypen (humorale Immunantwort).

### 1.2.2.2 Präsentation von Lipidantigenen

Neben den Peptid-präsentierenden Molekülen des MHC-Komplexes gibt es eine weitere Familie antigenpräsentierender Moleküle: die Moleküle des CD1-Komplexes. Sie sind auf die Präsentation von Lipid-, Glykolipid- und Lipoprotein-Antigenen spezialisiert, welche endogenen oder exogenen Ursprungs sein können [30]. CD1-Moleküle ähneln in ihrer Tertiär- und Quartärstruktur stark der Organisation der MHC-Klasse I-Moleküle. Ihre  $\alpha$ -Kette bildet drei Immunglobulin-ähnliche Domänen auf der extrazellulären Seite, eine Transmembrandomäne und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Zusätzlich assoziiert sie auf der extrazellulären Seite nicht-kovalent mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin [18].

Aufgrund von Sequenzhomologien ordnet man die CD1-Moleküle zwei Gruppen zu: Die Gruppe I umfasst die CD1-Moleküle CD1a, CD1b, CD1c. Alle drei Moleküle dieser Gruppe werden von DCs exprimiert, jedoch nicht von Makrophagen [30]. Die Gruppe II wird von CD1d gebildet. CD1d wurde auf einer Reihe von Zelltypen gefunden, darunter neben DCs auch Makrophagen, B-Zellen, Hepatozyten und Darmepithelzellen [30]. Ein weiteres Molekül, CD1e, ist trotz seiner Homologie zu CD1a-d kein antigenpräsentierendes Molekül, da es die Zelloberfläche nicht erreicht. Es scheint vielmehr an der Beladung von CD1b-Molekülen mit Lipidantigenen im Lysosom beteiligt zu sein und somit als Lipidtransfermolekül zu agieren [10, 120, 183].

Zur Bindung der Lipidantigene besitzen alle CD1-Isoformen tiefe hydrophobe Bindungstaschen, in welchen die lipophilen Alkylketten der Lipidantigene verankert werden. Auf diese Weise ragen die hydrophilen Kopfgruppen an der Moleküloberfläche hervor und können dort von den T-Zellrezeptoren der T-Lymphozyten erkannt werden [70].

Sowohl die Größe, als auch die Anzahl der Bindungstaschen variieren zwischen den einzelnen CD1-Isoformen, wodurch das Bindungsvermögen für bestimmte Lipidtypen beeinflusst wird. So besitzt z. B. CD1b drei Taschen, wovon zwei nochmals über eine vierte Tasche miteinander verbunden sind. Dies erlaubt die Bindung von Lipiden mit sehr langen Alkylketten. CD1a hingegen enthält nur zwei Taschen, wovon eine einen offenen Trichter zur Moleküloberfläche formt [250].

Einige Lipide, darunter Phospholipide und Sphingolipide, können auch von meh-

reren CD1-Isoformen gebunden werden. Somit scheinen die Bindungskapazitäten der einzelnen CD1-Moleküle teilweise zu überlappen [196].

Die meisten Lipide, welche stabil mit CD1-Molekülen assoziieren, besitzen zwei Fettsäure- (FS) Ketten von mehr als 10 C-Atomen. Die Art der Kopfgruppe spielt für die Bindung an CD1 keine Rolle. Da sie jedoch das Epitop bildet, welches vom T-Zellrezeptor erkannt wird, entscheidet die Kopfgruppe über die Immunogenität des präsentierten Lipids.

CD1-Moleküle durchwandern alle Reifungsstadien des endosomalen/phagosomalen Kompartiments und können dort mit Antigenen beladen werden. Dabei gelangen die verschiedenen Isoformen der CD1-Moleküle in unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente. Während CD1a in frühen Endosomen/Phagosomen Antigene bindet, nehmen CD1b, CD1c und CD1d vor allem in späten Endosomen/Lysosomen Antigene auf. Gesteuert wird die intrazelluläre Route der einzelnen CD1-Isoformen dabei durch die Aminosäuresequenz im zytoplasmatischen Schwanz [70].

Die Präsentation von Glykolipidantigenen auf DCs über CD1b, CD1c und CD1d kann durch Blockierung der Ansäuerung von Endosomen durch lysosomotrophe Basen unterdrückt werden. Dies deutete darauf hin, dass einige Lipidantigene prozessiert werden müssen, wie es bei Proteinantigenen der Fall ist [91, 138, 201].

### 1.2.3 Der Makrophage als Wirtszelle

Makrophagen sind Teil der ersten Phase der angeborenen zellulären Immunabwehr. Um diese Aufgabe zu erfüllen, phagozytieren sie eingedrungene Fremdkörper. Durch Reifung der gebildeten Phagosomen werden die aufgenommenen Partikel schließlich von lysosomalen Hydrolasen abgebaut und dabei entstehende Abbauprodukte den T-Lymphozyten des Immunsystems präsentiert.

Einige Mikroorganismen sind jedoch in der Lage, sich dem Transport in das Lysosom zu entziehen. Stattdessen haben sie sich auf das Überleben und die Vermehrung innerhalb des Makrophagen spezialisiert. Zu diesem Zweck verändern manche Bakterien das Phagosom so, dass dieses nicht mehr normal reifen und mit Lysosomen verschmelzen kann. Andere hingegen zerstören das Phagosom in einer frühen Reifungsstufe, um sich im Zytosol der Wirtszelle zu vermehren (Beispiele hierfür sind *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri*).

Pathogene Mykobakterien, wie der Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), verwenden die zuerst genannte Strategie. Sie lassen sich von nicht-aktivierten Makrophagen über Muster-erkennende Rezeptoren (*pattern recogni-*

*tion receptors*) phagozytieren [131] und verhindern dann auf bisher nur unvollständig verstandene Weise die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom [44]. Ihr Phagosom behält die Charakteristika von frühen endosomalen Vesikeln. Entsprechend bleibt der pH-Wert fast neutral (pH 6,5).

Es hat sich gezeigt, dass manche mykobakteriellen Lipide aus dem Phagosom selektiv an das vesikuläre System der Wirtszelle abgegeben werden [21, 55, 174, 188]. Des Weiteren können mit Mykobakterien infizierte Makrophagen in Apoptose gehen. Die apoptotischen Vesikel, welche ebenfalls mykobakterielle Lipide enthalten, können von DCs phagozytiert werden [190, 241]. Diese Lipide akkumulieren in der Zelle in späten Endosomen/Lysosomen, wo sie auf CD1-Moleküle treffen und von diesen gebunden werden können. Anschließend werden CD1 und Cargo an die Zelloberfläche transportiert, wo die Komplexe von T-Zellen bzw. NKT-Zellen<sup>3</sup> erkannt werden [28, 55, 139].

Mittlerweile wurde für manche Glykolipide gezeigt, dass sie erst nach partieller Degradation ihrer Zuckerketten durch lysosomale Hydrolasen immunogen wirken, also T-Zellantworten auslösen können [166, 183, 251].

In anderen Fällen bedarf es der partiellen Degradation der Lipidstruktur. Wie unsere Gruppe zeigen konnte, ist dieses bei dem mykobakteriellen Lipid Cardiolipin (CL) der Fall, welches vier Acylketten besitzt. CL kann erst an CD1d gebunden und – in geringem Maße – von CD1d-restringierten T-Zellen erkannt werden, nachdem zwei seiner FS-Ketten durch eine Kalzium-unabhängige lysosomale PLA abgespalten wurden [54]. Dabei kann es sich um eine PLA<sub>1</sub> oder eine PLA<sub>2</sub> handeln (siehe Seite 15).

Dies kann dadurch erklärt werden, dass CD1-Moleküle bevorzugt Lipide mit zwei Acylketten binden. So binden z. B. Phospholipide, welche zwei FS-Ketten besitzen, an alle CD1-Isoformen. Nach Einwirkung der lysosomalen PLA auf Phospholipide, welche eine FS-Kette entfernt, verlieren sie hingegen ihre Bindungsfähigkeit an CD1. Die Prozessierung eines Lipids durch die lysosomale PLA kann somit über dessen Präsentation auf der Zelloberfläche bestimmen.

CD1-Moleküle binden und präsentieren sowohl Selbst-, als auch Fremdlipide. Damit könnten verschiedene Funktionen erfüllt werden. Die Präsentation von Fremdlipiden kann über Stimulation entsprechender T-Zellen zur Immunabwehr des eingedrungenen Erregers beitragen. So wurden mittlerweile eine Reihe von mikrobiellen Lipidantigenen beschrieben [120, 224].

Die Präsentation von Selbstlipiden kann möglicherweise zur Pathogenese von Au-

---

<sup>3</sup>NKT-Zellen tragen sowohl den Marker NK1.1 der Natürlichen Killerzellen, als auch einen T-Zellrezeptor. Sie erkennen Lipidantigene, die an CD1d präsentiert werden.

toimmunerkrankungen beitragen. Dafür gibt es bereits einige Hinweise. In Patienten mit Multipler Sklerose ist eine erhöhte Anzahl von T-Zellen gefunden worden, die das Gangliosid GM1 in Zusammenhang mit CD1b erkennen. GM1 ist ein wichtiger Bestandteil des Myelins, welches die Axone von Neuronen elektrisch isoliert und bei Patienten mit Multipler Sklerose abgebaut wird. Daher wird vermutet, dass die GM1-erkennenden CD1b-restringierten T-Zellen dieser Patienten zum Fortschreiten der Krankheit beitragen [195]. CD1a und CD1c-reaktive T-Zellen scheinen zudem an Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse beteiligt zu sein [180].

Wie erwähnt werden CD1d-Moleküle, im Gegensatz zu CD1a, -b und -c, von NKT-Zellen erkannt. Diese speziellen T-Zellen können Immunantworten bei einer Vielzahl von Krankheiten modulieren. Dazu gehören Infektionen, Tumor- und Transplantatabwehr, aber auch Autoimmunkrankheiten und Entzündungsprozesse [224].

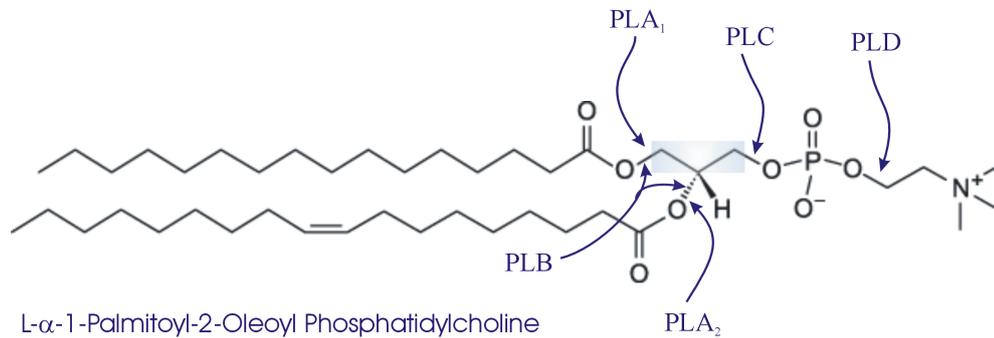
Interessanterweise sind viele NKT-Zellen autoreaktiv, d. h. sie antworten funktionell auf die Präsentation von Selbstlipiden an CD1d. So reagieren sie z. B. auf das Lipid Isoglobotrihexosylceramid (iGb3), welches im Lysosom beim Abbau von Globosiden entsteht. Diese Tatsache führte zu der mittlerweile umstrittenen Vermutung, dass iGb3 als endogener Ligand die Positivselektion von NKT-Zellen im Thymus erlaubt. Aber auch zelleigene Phospholipide können als Selbstantigene NKT-Zellen stimulieren. Dazu gehören Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylethanolamin (PE) [22, 69, 169], beides Substrate für die lysosomale PLA.

Wir vermuten, dass die lysosomale PLA-Aktivität des Makrophagen nicht nur eine wichtige Funktion bei der Degradation von phagozytiertem Cargo übernimmt, sondern möglicherweise auch eine Rolle bei der Generation (mykobakterielles CL) und/oder Elimination (PE, PI) von Lipidantigenen spielt. Aus diesem Grund wurde die Isolation der lysosomalen PLA<sub>1</sub> in dieser Arbeit aus Makrophagen vorgenommen – und nicht etwa aus kompletten Organen – vorgenommen. Zusätzlich wurden die molekularen Grundlagen dieses Enzyms näher untersucht.

Die folgenden Kapitel sollen einen Überblick über die Enzymklasse der Phospholipasen und ihre katalytischen Grundeigenschaften geben.

### 1.3 Phospholipasen

Phospholipasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, welche 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospholipide (bisher und im folgenden einfach „Phospholipide“ genannt) spalten können. Phospholipide machen nicht nur den größten Teil der Lipide in biologischen Membranen aus und sind damit wesentliche Bauteile für die Strukturhaltung von



**Abbildung 1.3: Angriffspunkte der verschiedenen Phospholipasen am Phospholipid.**  $PLA_1$  und  $PLA_2$ , sowie  $PLB$  sind Acylhydrolasen, welche die Esterbindung zwischen Glycerin-Rückgrad (hier blau unterlegt) und Acylresten spalten.  $PLC$  und  $PLD$  hydrolysieren als Phosphodiesterasen die Bindungen zum Phosphatrest.

Zellen, sondern dienen auch als Vorstufen für Signalmoleküle in den verschiedensten zellulären Prozessen. Phospholipasen nehmen daher ein breites Spektrum an Aufgaben wahr, von rein katabolischen Vorgängen über regulatorische Prozesse durch die Generation von Signalmolekülen, bis hin zur Zerstörung von Membranen, seien sie eukaryontischen oder bakteriellen Ursprungs.

Phospholipasen werden nach ihrem Angriffspunkt am Phospholipid in vier Typen eingeteilt, wie Abbildung 1.3 veranschaulicht.

$PLA_1$  ( $PLA_1$ ) und die Phospholipasen  $A_2$  ( $PLA_2$ ) und B ( $PLB$ ) sind Acylhydrolasen, welche spezifisch die Esterbindung zwischen FS-Resten und dem Glycerin-Rückgrat absplalten. Dabei greift die  $PLA_1$  an der sn-1-Position und die  $PLA_2$  an der sn-2-Position an.

Die  $PLB$  vereint die  $PLA$ -Aktivität mit einer Lysophospholipase-Aktivität, wodurch beide FS-Ketten entfernt werden.

Phospholipase C ( $PLC$ ) und Phospholipase D ( $PLD$ ) schließlich gehören zu der Gruppe der Phosphodiesterasen und haben ihre Angriffspunkte in der hydrophilen Kopfgruppe, vor oder hinter dem Phosphatrest.

Im folgenden soll ein Überblick über die Charakteristika und Bedeutung der verschiedenen Phospholipasetypen gegeben werden.

### 1.3.1 Phospholipase $A_1$

Im Gegensatz zu der  $PLA_2$ -Superfamilie (s. u.) sind erst wenige  $PLA_1$ s aus Säugern sequenziert (und kloniert) und es ist wenig über ihre physiologische Funktion bekannt. Nichtsdestotrotz wurde ihre Aktivität in vielen Zellen und Geweben verschiedener Organismen, wie in Säugern, Pilzen, Insektengiften und Protozoen, gefunden [11]. In

Säugetern sind seit kurzem mehrere Isoenzyme strukturell bekannt. Einige von ihnen kommen extrazellulär vor und bilden die Genfamilie „Typ I PLA<sub>1</sub>s“, die anderen sind intrazelluläre Enzyme und gehören dem „Typ II PLA<sub>1</sub>s“ an [90].

Schon seit Jahrzehnten wurde eine lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität beschrieben und untersucht. Die dafür verantwortliche Proteinsequenz ist jedoch bis heute unbekannt. Die lysosomalen Phospholipasen werden weiter unten in einem gesonderten Kapitel behandelt.

### 1.3.1.1 Extrazelluläre Phospholipase A<sub>1</sub>

Diese Enzymgruppe gehört zu der hoch konservierten Genfamilie der Pankreas-Lipasen. Sie beinhaltet die von aktivierten Thrombozyten sezernierte Phosphatidylserin- (PS-) PLA<sub>1</sub> und die mPA-PLA<sub>1</sub>  $\alpha$  und  $-\beta$  (Membran-assoziierte *PA-selektive* PLA<sub>1</sub>s) [90]. In der Lipase-Familie sind u. a. auch die Lipoproteinlipase, die Leber- und die Endothel-assoziierte Lipase zu Hause [4]. Die Hauptaufgabe der letztgenannten Lipasen ist der Abbau von Triglyceriden (TG), sie zeigen jedoch auch geringe PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Die eigentlichen PLA<sub>1</sub>s dieser Genfamilie haben hingegen keine TG-Aktivität, vielmehr zeichnen sie sich sogar durch eine extrem hohe Substratspezifität für PS einerseits, oder PA andererseits aus. Diese Tatsache schlägt sich in ihrer Benennung nieder [90].

Die meisten Mitglieder der Lipase-Genfamilie bestehen aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne ist für die katalytische Aktivität verantwortlich und bedient sich dafür einer katalytischen Triade aus Serin, Aspartat und Histidin. Das katalytische Serin befindet sich in einer hochkonservierten GxSxG-Sequenz. Die Domänenstruktur wird von drei ebenfalls konservierten Disulfidbrücken stabilisiert. Charakteristisch sind auch drei so genannte „Loops“ (Schleifen) auf der Enzymoberfläche, welche das aktive Zentrum bedecken und die Substratspezifität zu bestimmen scheinen [4, 11].

Die Aufgabe der C-terminalen Domäne ist weniger gut verstanden. Man schreibt ihr eine regulatorische Funktion zu [11].

Bei der Hydrolyse von Phosphatidsäure (PA) durch die mPA-PLA<sub>1</sub>s entsteht das bioaktive Lipid Lysophosphatidsäure (*lysophosphatidic acid*, LPA), welches als Lipidmediator an G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren bindet und somit in der Signaltransduktion u. a. Einfluss auf die Zellproliferation, Differenzierung und Migration der Zelle nimmt.

### 1.3.1.2 Intrazelluläre Phospholipase A<sub>1</sub>

Auch unter den intrazellulären PLA<sub>1</sub>s findet sich ein zytosolisches PA-bevorzugendes Enzym (*PA-preferring* PLA<sub>1</sub>), welches jedoch keine Homologie zu der extrazellulären Variante aufweist [75, 90]. Die sequenzhomologen Proteine KIAA01725 und p125 sind zwei weitere Vertreter der intrazellulären PLA<sub>1</sub>-Familie. Für p125, welches eine Rolle im frühen sekretorischen Stoffwechselweg zu spielen scheint, konnte jedoch bisher keine katalytische Aktivität nachgewiesen werden [150].

Es ist noch unbekannt, ob sich diese Enzymklasse auch einer katalytischen Triade bedienen. Sie besitzen ein katalytisches SxSxG-Motiv, haben aber wahrscheinlich keine *Loops* [90].

### 1.3.2 Phospholipase A<sub>2</sub>

Die PLA<sub>2</sub>-Superfamilie besteht aus einer Vielzahl von Enzymen, die nach strukturellen Gesichtspunkten 15 verschiedene Gruppen und etlichen Untergruppen beinhalten. Sie können im Wesentlichen in fünf Enzymklassen unterteilt werden [191]:

1. sezernierte PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>)
2. zytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)
3. Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>)
4. Plättchen-aktivierender Faktor (*Platelet Activating Factor*) Acetylhydrolasen (PAF-AH)
5. lysosomale PLA<sub>2</sub>

Die Produkte ihrer Katalyse sind, wie bei den PLA<sub>1</sub>s, eine freie FS und das entsprechende Lysophospholipid. Beide Produkte können Vorstufen für Mediatoren der Signaltransduktion darstellen. Dies ist z. B. der Fall, wenn Arachidonsäure (AA) als FS frei wird. Sie dient als Substrat bei der Synthese von Eikosanoiden (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene), welche für eine große Anzahl physiologischer und pathologischer Prozesse verantwortlich sind. Dazu zählen u. a. die Immunantwort, Entzündungsreaktionen, das Schmerzempfinden und die Regulation des Schlafes [61].

Lysophospholipide sind am Phospholipid-Umbau (*Phospholipid remodeling*), an der Übertragung von Zellsignalen und bei der Zerstörung von Zellmembranen beteiligt [13, 14, 114].

### 1.3.2.1 Sezernierte Phospholipase A<sub>2</sub>

Unter allen PLA<sub>2</sub>s macht die Klasse der sPLA<sub>2</sub>s den größten Teil aus. Sie sind weit verbreitet in der Natur. Man findet sie in fast allen Geweben von Säugern, bei Pflanzen, Viren, Bakterien und nicht zuletzt in einer Vielzahl von Giften (Schlangen, Insekten, Reptilien), wo sie toxische Wirkungen ausüben. Diese können neurotoxischer, myotoxischer, hämorrhagischer oder kardiotoxischer Natur sein. Es überrascht daher nicht, dass die erste sPLA<sub>2</sub> schon Ende des 19. Jahrhunderts aus dem Giften von Kobras isoliert wurde [203].

Bis auf eine Ausnahme sind alle sPLA<sub>2</sub>s kleine Proteine von 12-19 kDa Größe. Weitere Gemeinsamkeiten sind der Bedarf an Kalziumionen im unteren millimolaren Bereich als Kofaktor, ein pH-Optimum im (leicht) alkalischen Bereich und große strukturelle Homologie, u. a. im Bezug auf die konservierten Disulfidbrücken. Als Katalysemechanismus nutzen sie alle eine so genannte katalytische Diade, welche aus den Aminosäuren Histidin und Aspartat besteht und H<sub>2</sub>O als dritten Partner hinzuzieht [191].

Generell bevorzugen sie anionische Phospholipide als Substrate und zeigen das Phänomen der Grenzflächenaktivierung [202]. Dazu mehr auf Seite 24.

Nach oder während ihrer Sekretion können sie in parakriner oder autokriner Weise wirken, indem sie AA freisetzen und damit die Eikosanoid-Synthese vorbereiten [237]. Damit erklärt sich ihre entzündungsfördernde Eigenschaft. Bei vielen Krankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis und Morbus Crohn [152, 194], tragen sie zum Krankheitsbild bei und gelten daher als Zielenzyme in der therapeutischen Behandlung. Auch bei der Entstehung von Artherosklerose sollen sie eine Rolle spielen [234, 244].

Dank ihrer antibakteriellen und antimykotischen Wirkung könnten einige Vertreter dieser Klasse eine Funktion bei der Immunabwehr haben, indem sie Bakterienmembranen lysieren [106, 186]. Weitere Funktionen sind die Hemmung der Blutgerinnung, die Förderung von Exozytose und selbstverständlich die Verdauung von Phospholipiden aus der Nahrung.

### 1.3.2.2 Zytoplasmatische Phospholipase A<sub>2</sub>

Die cPLA<sub>2</sub>s (*cytosolic*) sind große (61-144 kDa) Proteine, die sich strukturell und in ihrem Katalysemechanismus deutlich von den sPLA<sub>2</sub>s unterscheiden. cPLA<sub>2</sub>s bestehen aus mehreren Domänen. Ihre Aktivität verdanken sie, im Gegensatz zu den sPLA<sub>2</sub>s, einem katalytischen Serin im aktiven Zentrum und gehören damit zu den Serin-Hydrolasen. Während der Katalyse bildet sich ein Acyl-Enzym-Intermediat. Sie

arbeiten bei neutralem pH-Wert am besten und benötigen Kalziumionen im mikromolaren Bereich. Letzteres wird nicht für die Katalyse selbst gebraucht, sondern für die Translokation<sup>4</sup> des Enzyms an perinukleare Membranen, wie an das ER und den GA. Dieses geschieht, indem das Kalziumion an die regulatorische C2-Domäne bindet. C2-Domänen finden sich auch in verschiedenen anderen Phospholipid-bindenden Proteinen [51, 77, 151, 213]. Ihnen allen gemeinsam ist eine ausgeprägte Präferenz für die Hydrolyse von AA.

### 1.3.2.3 Kalzium-unabhängige Phospholipase A<sub>2</sub>

Erst 1994 entdeckte man die erste PLA<sub>2</sub>, welche für ihre Aktivität kein Kalzium benötigt [2]. Wie die cPLA<sub>2</sub>s benutzen auch die iPLA<sub>2</sub>s Serin als katalytisch aktiven Rest, welcher in der Lipase-Konsensussequenz GxSxG eingebettet ist. Sie besitzen ein ATP-Bindungsmotiv, wobei die Anwesenheit von ATP sich vor allem positiv auf ihre Stabilität auswirkt [122].

Die als erstes entdeckte iPLA<sub>2</sub> ist zugleich auch die am besten charakterisierte. Sie besitzt acht Ankyrinwiederholungen, die wahrscheinlich ihrer Oligomerisierung dienen und liegt in mehreren Spleissvarianten vor.

Eine ihrer Funktionen liegt in der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase durch die Vermittlung des *Phospholipid remodeling*s. Dabei handelt es sich um einen Zyklus („Lands Zyklus“) von Abbau und Neubildung von Membranphospholipiden [16]. Die iPLA<sub>2</sub> entfernt hierbei die an die sn-2 Position gebundene FS und die entstandenen 2-Lysophospholipide werden im Anschluss mit einer anderen freien FS verestert. Auf diese Weise werden neue (andere) Phospholipide mittels eines energieärmeren Stoffwechselwegs gebildet, als dies bei der Neusynthese der Fall wäre.

Bei der neu eingebauten FS handelt es sich häufig um AA. Somit reguliert die iPLA<sub>2</sub> den AA-Level in der Phospholipidfraktion und spielt damit eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Eicosanoidsynthese [191].

### 1.3.2.4 Plättchen-aktivierender Faktor Acetylhydrolasen

PAF-AHs verdanken ihren Namen der Tatsache, dass der Plättchen-aktivierende Faktor ihr primäres Substrat ist. PAF ist ein Etherlipid und löst bereits in einer geringen Konzentration die Aggregation von Thrombozyten aus. Neben dieser Wirkung ist er als Mediator an Entzündungsreaktionen beteiligt, sowie an der Regulation des Blutdrucks. Dabei kann er auch pathologische Prozesse wie Arteriosklerose und Asthma

---

<sup>4</sup>Translokation: Ortsveränderung, Versetzung; hier: Bindung an die/Assoziation mit der Membran

begünstigen [97].

Die Inaktivierung von PAF durch PAF-AHs stellt demzufolge eine Signaltermination dar [20].

PAF-AHs werden von Makrophagen sezerniert, kommen aber auch intrazellulär vor. Wie bei den beiden vorangegangenen PLA<sub>2</sub>-Klassen, vermittelt auch hier Serin die Katalyse, welche kalziumunabhängig stattfindet. Neben PAF akzeptieren sie auch Diacylglycerole (DAG) mit kurzen oder mittellangen FS-Ketten und Triacylglycerole. Zudem besitzt sie PLA<sub>1</sub>-Aktivität.

### 1.3.2.5 Differenzierung und Rolle der einzelnen PLA<sub>2</sub>

Zwischen den verschiedenen PLA<sub>2</sub>s existieren nicht nur strukturelle Unterschiede, sondern sie differieren auch bezüglich ihres Bedarfs an Kalziumionen, ihrer pH-Optima, ihrer Substratspezifität und ihrer Sensibilität gegenüber pharmakologischer Inhibitoren. Welchen Anteil jede einzelne PLA<sub>2</sub> an den verschiedenen physiologischen Prozessen einnimmt, ist noch nicht geklärt. Ihre unterschiedlichen Eigenschaften erlauben es aber zu gewissem Grad, sie durch entsprechende Anpassung der Assaybedingungen oder Einsatz von Inhibitoren *in vitro* voneinander abzugrenzen [191].

Im letzten Jahrzehnt ist das Feld der PLA<sub>2</sub>-Forschung durch die Entdeckung immer neuer Enzyme rasend schnell expandiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass noch immer nicht alle bekannt sind. Molekularbiologische Methoden wie *small interfering* RNAs und die Generation von Knock-out-Mäusen dienen zunehmend dazu, die Relevanz einzelner Enzyme aufzuklären.

## 1.3.3 Lysosomale Phospholipasen A

### 1.3.3.1 Lysosomale Phospholipase A<sub>1</sub>

Eine Reihe von Publikationen in den 1980er und 90er Jahren berichteten von einer lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität in unterschiedlichen Zellen. Die Autoren haben teilweise dem Anreicherungsfaktor nach beeindruckende Enzymreinigungen durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen unterschiedlichen biochemischen Tests unterzogen. Sie verwendeten vor allem Leber, Niere oder Gehirn als Ausgangsmaterialien. Leider kam es im Zuge dieser Arbeiten nie zu Sequenzanalysen und somit sind die zugrunde liegende Gene bis heute unbekannt. Die vorliegende Arbeit soll diese Lücke schließen.

Die damaligen Ergebnisse deckten sich teilweise, wiesen aber auch Unterschiede auf. So wurde für die Niere nur ein Isoenzym beschrieben, für die Leber jedoch zwei mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten. Entsprechend ihrer Lokalisati-

on hatten die Enzyme ihr Aktivitätsoptimum bei einem sauren pH-Wert und bewegten sich ihrer Größe nach zwischen 25 und knapp 60 kDa.

### 1.3.3.2 Lysosomale Phospholipase A<sub>2</sub>

Obwohl die lysosomale PLA<sub>2</sub>-Aktivität schon lange bekannt war, gelang es erst vor einigen Jahren, zwei dafür verantwortliche Enzyme zu reinigen und zu klonieren [79, 100]. Das erste 1997 entdeckte Enzym wurde aiPLA<sub>2</sub> getauft (was für *acid Ca*<sup>2+</sup>-*independent* PLA<sub>2</sub> steht). Es zeigte sich, dass die Sequenz der des Peroxiredoxin 6 gleicht, welches zu den antioxidativen Enzymen zählt. Es handelt sich somit um ein bifunktionales Enzym, welches Peroxidase- und Phospholipase-Aktivität vereint und dafür zwei unterschiedliche katalytisch aktive Domänen besitzt. Abermals ist ein Serinrest für die PLA<sub>2</sub>-Aktivität essentiell. Außerdem wurde es sowohl in lysosomalen Kompartimenten, als auch im Zytosol gefunden [99]. Es wird spekuliert, dass die zytosolische Variante für die Peroxidase-Aktivität verantwortlich zeichnet und die lysosomale für die PLA<sub>2</sub>-Aktivität. Das Enzym wird in allen Geweben exprimiert, in der Lunge jedoch in wesentlich größerem Ausmaß als in den anderen großen Organen [99, 173].

Das zweite 2002 klonierte Enzym wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit zur Transacylierung entdeckt, bei welcher es FS von Phospholipiden auf die C-1 Position des N-Acetylsphingosins überträgt. Es wurde daher zunächst 1-O-Acylceramid Synthase genannt. Es stellte sich heraus, dass das Enzym auch H<sub>2</sub>O als Akzeptor für die Acylgruppe verwenden kann und somit als PLA<sub>2</sub> fungiert. Das 45 kDa große Glykoprotein hat ein pH-Optimum von 4,5 und wurde mittlerweile in „lysosomale PLA<sub>2</sub>“ (LPLA<sub>2</sub>) umgetauft. Gegen viele Inhibitoren der sPLA<sub>2</sub>s, cPLA<sub>2</sub>s und iPLA<sub>2</sub>s ist es resistent, was auf strukturelle Unterschiede zu den anderen PLA<sub>2</sub>-Klassen hinweist. Die LPLA<sub>2</sub> nutzt jedoch ebenfalls Serin für die Hydrolyse, welches in das Motiv AxSxG eingebettet ist und auch hier intermediär eine kovalente Bindung mit dem Acylrest eingeht. An der katalytischen Triade sind zudem ein weiterer Aspartat- und ein Histidinrest beteiligt.

### 1.3.4 Phospholipase B

PLBs vereinen PLA und Lysophospholipase-Aktivität, was eine vollständige Deacylierung des Phospholipids zur Folge hat. Solche Aktivitäten wurden in Bakterien, Pilzen und Säugerzellen gefunden, wobei keine Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Familien bestehen. Die bisher klonierte PLB aus Säugern ist als Ekto-Phospholipase

auf der Plasmamembran der Enterozyten des Dünndarmepithels lokalisiert, wo sie für den Verdau von Nahrungslipiden sorgt. Sie enthält Sequenzmotive zweier unterschiedlicher Klassen lipolytischer Enzyme, nämlich das GxSxG-Motiv und das GDSL-Motiv. Der Serinrest des zweiten ist für die katalytische Aktivität verantwortlich.

### 1.3.5 Phospholipase C

Die verschiedenen Isoformen der Phospholipase C (PLC) gehören zu den Schlüsselenzymen bei der Signaltransduktion. Sie werden von einer großen Palette von Hormonen aktiviert und hydrolysieren anschließend das in der Membran befindliche Lipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. Bei der Spaltung dieses Lipids entstehen die „second messenger“ Inositol-(1,4,5)-triphosphat sowie Diacylglycerol (DAG). Inositol-(1,4,5)-triphosphat setzt Kalzium aus im ER lokalisierten intrazellulären Kalziumspeichern frei, DAG aktiviert die Proteinkinase C, die ihrerseits Substratproteine phosphoryliert und damit deren biologische Aktivität ändert. Auf diese Weise werden in der Zielzelle mannigfaltige Stoffwechselveränderungen herbeigeführt, die vom jeweilig auslösendem Hormon abhängen.

### 1.3.6 Phospholipase D

Die Mitglieder der PLD-Superfamilie trifft man ebenfalls in den verschiedensten Organismen an, von Viren über Bakterien, Hefen, Pflanzen bis hin zu höheren Tieren. In Säugern findet man die Aktivität in fast allen Körperzellen [25, 102]. Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der bisher sequenzierten PLDs, erkennt man, dass sie innerhalb der Organismenreiche sehr hohe, zwischen den Reichen jedoch eine sehr niedrige Homologien aufweisen.

Sie beinhalten jedoch ein gemeinsames katalytisches Sequenzmotiv, das so genannte HKD-Motiv, gebildet durch HxKxxxxD, wobei „x“ eine beliebige Aminosäure sein kann, „H“ für Histidin, „K“ für Lysin und „D“ für Aspartat steht. In den meisten Fällen liegt dieses Motiv als Duplikat vor. Auch einige andere Phosphatidyl-Transferasen, wie die CL- oder die PS-Synthase, und manche Endonukleasen und Toxine besitzen dieses Motiv. Man hat alle diese Proteine zu einer neuen Familie, der PLD-Superfamilie, zusammengefasst [109, 165].

Deletionsmutationen zeigten, dass beide HKD-Motive im Enzym gemeinsam das katalytische Zentrum bilden. Diejenigen Enzyme, welche nur ein HKD-Motiv in der Sequenz besitzen, wie die bakterielle Endonuklease, bilden für die Katalyse Dimere und erhalten auf diese Art ein HKD-Duplikat. [217, 247].

Des Weiteren weiß man mittlerweile, dass die Enzyme nach dem so genannten Ping-Pong-Mechanismus arbeiten, bei welchem das Substrat intermediär kovalent mit dem Histidin im HKD-Motiv verbunden wird [65, 217].

Die meisten bekannten PLDs sind kalziumabhängig und besitzen daher das bereits erwähnte C2-Motiv.

Obwohl viel über die pflanzlichen PLDs bekannt ist und viele von ihnen bereits kloniert wurden, soll an dieser Stelle nur auf die PLDs aus Säugetierzellen eingegangen werden. Bei diesen handelt es sich im wesentlichen um zwei Isoenzymtypen, PLD1 und PLD2, und ihre Spleißvarianten.

Wie die PLCs sind auch die PLDs Schlüsselenzyme in der Signaltransduktion, induzieren jedoch andere Signalmoleküle: Phosphatidsäure (PA), Lysophosphatidsäure (LPA) und DAG mit gesättigten und/oder einfach ungesättigten FS [159]. Im Gegensatz dazu generiert PLC DAG mit mehrfach ungesättigten FS (oft mit AA) [80]. Inwiefern die FS-Zusammensetzung in DAG von biologischer Relevanz ist, muss noch entschlüsselt werden. Es scheint jedoch, dass gesättigtes und/oder einfach ungesättigtes DAG nicht in der Lage ist, die PKC zu aktivieren.

Beide PLDs zeigen eine starke Präferenz für Phosphatidylcholin (PC) als Substrat [157, 160] und sind kalziumunabhängig (kein C2-Motiv). Bei der Hydrolyse entstehen PA und freies Cholin als direkte Produkte. Es hat sich gezeigt, dass primäre Alkohole wie 1-Ethanol oder 1-Butanol das  $H_2O$  als Nukleophil in der Katalyse ersetzen können und in diesem Falle eine Transphosphatidylierungs-Reaktion erfolgt, bei welcher PA an den Alkohol (Phosphatidylalkohol) gebunden wird. In der Tat werden die Alkohole sogar bis zu 1000-fach als Nukleophile gegenüber  $H_2O$  bevorzugt [60].

PA erfüllt zahlreiche intrazelluläre und extrazelluläre Signalfunktionen über vielfältige Mechanismen. Es aktiviert z.B. Phosphatidylinositol-Kinase, was zur Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat führt. Zudem dient es als Lipidbindungspartner für mehrere Proteine oder als Vorstufe zur Synthese von DAG durch Phosphatidsäure-Phosphohydrolase [94]. Auch an der Zielsteuerung von Vesikeln und bei der Endo- und Exozytose ist PA beteiligt [172].

Wird PA durch eine  $PLA_2$  hydrolysiert, so entsteht das ebenfalls bioaktive Lipid LPA. Auch dieses Molekül agiert in der Signalübermittlung und greift somit in die unterschiedlichsten Prozesse ein [140].

## 1.4 Grenzflächenaktivierung

Viele lipolytische Enzyme zeigen das Phänomen der so genannten „Grenzflächenaktivierung“. Sie können ihre volle Aktivität nur entfalten, wenn ihr Substrat als Aggregat in wässriger Phase (z. B. Mizelle, Lipiddoppelschicht) vorliegt und sich eine hydrophil-hydrophobe Grenzfläche ausbildet. Sobald das Substratmonomer die Löslichkeitsgrenze überschreitet und aggregiert, nimmt die Enzymaktivität sprunghaft zu [7].

Aufgrund der Grenzflächenaktivierung können die kinetischen Eigenschaften von Lipasen nicht durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden, welche mathematisch an eine homogene, dreidimensionale Phase angepasst ist ( $K_m$  hat die Dimension einer Volumenkonzentration). Lipasen arbeiten jedoch an zweidimensionalen Substrataggregaten und unterlaufen bei der Katalyse wenigstens zwei kinetisch voneinander unabhängige Schritte. In den letzten drei Jahrzehnten wurden viele kinetische Modelle entwickelt, um die Aktivität von Grenzflächenenzymen zu beschreiben. Das einfachste ist das Verger-De Haas' Modell, welches zwei unabhängige Schritte unterscheidet [7, 230]:

1. Die physikalische Adsorption des Enzyms an die Lipidgrenzfläche und die damit einhergehende Grenzflächenaktivierung:



2. Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und die anschließende Katalyse.



E steht hier für Enzym,  $E^*$  für seine aktivierte Form, L für Lipidsubstrat und P für Produkt. Dieses Modell kann allerdings nur für die Hydrolyse von Substraten gelten, deren Produkte wasserlöslich sind (kurze Acylketten) und nach Entstehung sofort im wässrigen Medium wegdiffundieren. In der Regel bestehen die biologischen Substrate jedoch aus langkettigen FS, die nach ihrer Hydrolyse unlöslich bleiben und in der Interphase akkumulieren. Dieses führt oft zu einer Veränderung der Qualität der Grenzfläche, was sich wiederum inhibierend oder aktivierend auf das Enzym auswirken kann. Art und Geschwindigkeit der Reorganisation (auch Diffusion der Produkte) dieses zweidimensionalen Systems nimmt also entscheidenden Einfluss auf die Katalysesegeschwindigkeit [7].

Das Enzym selbst kann seinerseits nach verschiedenen Modi arbeiten. Es gibt Enzyme, die einmal an die Interphase gebunden, für viele Katalysezyklen dort verbleiben. Viele sPLA<sub>2</sub> verfahren nach diesem Mechanismus. So ist es möglich, dass das Enzym die äußere Lipidschicht von kleinen, unilamellaren Vesikeln komplett hydrolysiert, ohne währenddessen einmal vom Vesikel abzulassen. Man spricht hierbei vom *scooting mode*. Andere Enzyme desorbieren nach wenigen katalytischen Zyklen oder gar jedem Umsatz von der Grenzfläche und können auf diese Art zwischen den einzelnen Vesikeln in der Dispersion hin- und herspringen (*hopping mode*). Sie durchlaufen somit den ersten kinetischen Schritt, nämlich die Adsorption an die Interphase, immer wieder von Neuem [23, 92].

Der Bindung an die Interphase wurde in den letzten zwei Jahrzehnten viel Aufmerksamkeit geschenkt. Die Herstellung von rekombinanten lipolytischen Enzymen und deren Kristallisation erlaubte zunehmend die Untersuchung jener Parameter, welche das Bindungsvermögen an die Grenzfläche beeinflussen.

Zu diesen Parametern gehören sowohl die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der einzelnen Proteine, als auch die Beschaffenheit der Grenzfläche als solches. So wird die Aktivität der meisten Enzyme durch negative Ladung an der Interphase positiv reguliert [143].

Negative Ladung wird durch die Kopfgruppen von anionischen Phospholipiden, wie PS, PI, PG, PA und CL, mitgebracht. Bezogen auf die gesamte zelluläre Phospholipidfraktion machen anionische Phospholipide in etwa einen Anteil von 30% aus. In biologischen Membranen kommen zusätzlich zwitterionische, und damit nach außen neutrale, Phospholipide, wie PC, PE und Sphingomyelin (SM) vor [117].

Anionische Phospholipide beeinflussen die Grenzflächenbindung von lipolytischen Enzymen vor allem aufgrund von zwei Effekten: Sie bieten einerseits eine elektrostatische Anziehungsfläche für positiv geladene Bindungsdomänen, welche in vielen (Phospho-) Lipasen vorhanden sind. Andererseits haben sie die Eigenschaft, die Ordnung der kondensierten Phospholipiddoppelschicht aufzuweichen. Das Ausmaß dieses Effektes hängt von der Kopfgruppengröße relativ zu den Acylgruppen und der gegenseitigen Abstoßung der negativen Ladungen in den Kopfgruppen ab. Positive Ionen im umgebenden Medium können diese Effekte teilweise neutralisieren. Die resultierende geringere Packungsdichte erleichtert dem Enzym die Ausbildung von hydrophoben Interaktionen mit der Lipidschicht [31].

Jede Zell- und Organellenart zeichnet sich durch eine ihr spezifische Lipidzusammensetzung aus. Zudem sind viele biologische Membranen asymmetrisch aufgebaut, d. h. die innere und die äußere Lipidschicht unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung.

zung. Ein Beispiel hierfür ist die Plasmamembran von Säugerzellen, welche in ihrer extrazellulären Schicht vor allem aus den neutralen Lipiden PC, SM und ein wenig PE besteht, auf der zytoplasmatischen Seite jedoch auch anionische Lipide wie PS, PI und wenig PG aufweist. Diese Lipidverteilung wird von aktiven Transportproteinen aufrecht erhalten [164].

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wird klar werden, dass auch die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> stark von der Lipidzusammensetzung der Membran bestimmt wird. Es wird deutlich werden, dass anionische Phospholipide den 1. kinetischen Schritt, nämlich die Membranbindung des Enzyms, vermitteln.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit widmet sich der Reinigung und Charakterisierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus Makrophagen. Diese professionellen Phagozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Pathogenen und abgestorbenen Körperzellen. Zusätzlich initiieren Makrophagen mittels Antigenpräsentation die spezifische Immunantwort gegen eingedrungene Erreger. Wir vermuten, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> eine wichtige Rolle bei der Degradation von phagozytiertem Material und der Generation von Lipidantigenen spielt. Da das codierende Gen bisher nicht bekannt war, sollte über eine klassische Enzymreinigung die entsprechende Sequenz ermittelt und das Gen entschlüsselt werden. Des Weiteren sollten die katalytischen Eigenschaften des Enzyms näher charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Am Ende dieses Abschnittes findet sich ein Verzeichnis der im Materialteil aufgeführten Zulieferer.

#### 2.1.1 Zellkultur

- Zellen: Mausmakrophagen-Zelllinie RAW B
- DMEM-Vollmedium (VM) wurde frisch hergestellt und sterilfiltriert aus
  - 500 ml Dulbecco's MEM (1x) (DMEM, GIBCO) mit 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat und 4,5 g/l D-Glucose, ohne L-Glutamin und Natriumpyruvat
  - 50 ml (10%) hitzeinaktiviertes (56°C, 30 min) Fetales Kälberserum (Seromed)
  - 2 mM L-Glutamin (GIBCO)
  - 1 mM Na-Pyruvat (GIBCO)
  - Fakultativ Antibiotika: 1:1000 Penicillin/Streptomycin-Cocktail
- Einfriermedien
  - Einfriermedium 1: DMEM VM mit 20% FKS
  - Einfriermedium 2: DMEM-VM mit 20% + 20% DMSO

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

- 30%ige Acrylamidlösung (Bio-Rad) wurde angesetzt aus:
  - 3,9 g Bisacrylamid
  - 146,1 g Acrylamid
  - ad 500 ml ddH<sub>2</sub>O
- Assaypuffer, 50 mM Acetatpuffer:
  - 50 mM Acetat, unterschiedliche pH-Werte (nach Puffertabelle aus Natrium-Acetat (NaAc) und Essigsäure hergestellt)
  - 5 mM EDTA
  - mit oder ohne 0,1% Triton-X-100 (TX-100)
- HB-T-Puffer:
  - 10 mM NaAc
  - 10 mM Triethanolamin (TEA)
  - 1 mM EDTA
  - für HB-T-Sucrose- und Lysepuffer zusätzlich: 8,55% Sucrose

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

- für Lysepuffer zusätzlich: 0,1% Proteasehemmer-Mix, bestehend aus TLCK (Serininhibitor, Stock: 100 mg/ml), E64 (Thiolprotease, Stock: 25 mg/ml), Pepstatin A (Carboxylprotease, Stock: 50 mg/ml), Leupeptin (Thiolprotease, Stock: 100 mg/ml),  
Anmerkung: EDTA wirkt als Metalloprotease
- eingestellt auf pH 7,4 mit konzentrierter Essigsäure
- Laufpuffer:
  - 25 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris), pH 8,3
  - 200 mM Glycin
  - 0,1% SDS
  - ddH<sub>2</sub>O
- Unterer Gelpuffer
  - 1,5 M Tris, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt
  - 0,014 M SDS
- Oberer Gelpuffer:
  - 0,5 M Tris, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
  - 0,056 M SDS
- Probenpuffer:
  - 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
  - 10% Glycerin
  - 0,01% Bromphenolblau
  - 10% SDS
  - für reduzierenden Puffer zusätzlich 0,1 M Dithiothreitol (DTT)
- PBS, bezogen von Biochrom, Deutschland oder steril und pyrogenfrei von GIBCO, besteht aus:
  - 2,67 mM Kaliumchlorid
  - 1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat
  - 137,93 mM Natriumchlorid
  - 8,06 mM Dinatriumhydrogenphosphat
- Renaturierungspuffer
  - 100 mM Tris-HCl, pH 7,6
  - 0,1 mM EDTA
  - 22,5 mM (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD, Fluka)

### 2.1.3 Chemikalien

- Alle Standardchemikalien wurden von Sigma-Aldrich oder Merck bezogen.
- Proteinchemie:
  - Proteinstandards: Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color (Bio-Rad), BenchMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen)
  - Coomassie: Imperial Protein Stain (Perbio),
  - Silberfärbung, Silberfärbekit: Roti-Black P (Carl-Roth)
  - Ampholyte: Bio-Lyte 3-10 und 3-5 (Bio-Rad), Pharmalyte 2-5 und 5-6 (GE Healthcare)
  - Bestimmung der Proteinkonzentration: BCA\*Protein Assay (Perbio)  
Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit (Perbio)  
Protein Assay Reagenz (Bio-Rad)

- Deglykosylierung: Native Protein Deglycosylation Kit und GlycoProfile IV Deglycosylation Kit (Sigma-Aldrich), PNGase F (Roche)
- Ionen- und Hydrophobe Austauscher: Poros-Matrices (Perseptive Biosystems); Mono Q, Mini Q, Source Q, Phenyl- und Octyl-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare)
- Lektinchromatographie: Concanavalin A, Weizenkeimagglutinin (Sigma-Aldrich); Jacalin-Agarose (Perbio)
- Affinitätschromatographie:
  1. Kopplung von 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (Avanti Polar Lipids) an EAH-Sepharose 4B (GE Healthcare)
  2. Kopplung von Dimethyl-DL-2,3-distearoyloxypropyl(2-hydroxyethyl)ammonium acetate (Sigma-Aldrich) an ECH-Sepharose 4B (GE Healthcare)
- Dialyse: Schlauch Visking (Carl Roth), Slide-A-Lyzer (Perbio)
- Percoll, Biochrom, Deutschland
- Lipide:
  - L- $\alpha$ -Phosphatidylserine (Brain, Porcine), L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol (Liver, Bovine) L- $\alpha$ -Phosphatidyl-DL-Glycerol (Egg, Chicken), L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (Egg, Chicken), Cardiolipin und Dilyocardiolipin (Heart, Bovine), Bis(monoooleoylglycero)phosphat (S,S-Isomer), alle von Avanti Polar Lipids
  - Sphingomyelin (Brain, Bovine) und L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine (Brain, Bovine) von Sigma-Aldrich

#### 2.1.4 Radiochemikalien

- L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-(1- $^{14}\text{C}$ )palmitoyl (GE Healthcare)
- L-3-Phosphatidylethanolamine, 1-palmitoyl-2-(1- $^{14}\text{C}$ )palmitoyl (GE Healthcare)
- L-(3- $^{14}\text{C}$ )-Phosphatidylserine (GE Healthcare)
- Phosphatidylinositol, L- $\alpha$ [Myo-Inositol-2 $^3\text{H}$ (N)]- (PerkinElmer)

#### 2.1.5 Enzyme

- PLA<sub>2</sub> aus Schweinepankreas (Sigma-Aldrich)
- PLD aus Weißkohl (Sigma-Aldrich)
- DNase (Sigma-Aldrich)

#### 2.1.6 Gebrauchswaren

- Dünnschichtchromatographie-Platten hochauflösend (HPTLC): Kieselgel 60 auf Aluminium-Folie, Merck, Deutschland
- Einmal-Pipettenspitzen, Sarstedt, Deutschland
- Extruder-Polycarbonatmembranen, Avanti, USA
- Fertiggele: Criterion XT Bis-Tris, 4-12%, (Bio-Rad)  
Precise Protein Gels, 4-20%, (Perbio)
- Reaktionsgefäße, Sarstedt, Deutschland
- Mikrotiterplatten, photometrisch: Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate MaxiSorp Surface, Nunc,
- Phosphoimager-Film: BAS-TR 2040, Fujifilm, Japan
- Sterilfilter: FP 030/3 Einmal Filterhalter 0,2 $\mu\text{m}$ ; 7 bar max., Schleicher & Schuel, Deutschland
- Transferpettor-Caps aus Glas, Brand
- Ultrafiltration: Amicon Ultra, Millipore, Deutschland
- Zellkulturflaschen, TPP, Schweiz
- Zellkulturobjektträger: Lab-Tek 8 well glass chamber slides, Nunc, USA
- Zellkulturschaber, Sarstedt, Deutschland

### 2.1.7 Geräte

- Blockthermostat: BT 200.EU1 (Kleinfeld Labortechnik)
- CO<sub>2</sub>-Inkubator: CB21 (Binder)
- Elektrophorese-Kammern: Mini-Protean 3 (Bio-Rad)  
Criterion Cell (Bio-Rad)  
SE 400 (Hofer)
- ELISA-Spektrometer: Spectra Max 190 (Molecular Devices)
- Extruder: LiposoFast Basic (Avestin)
- FPLC-Anlage: BioCAD SPRINT Perfusion Chromatography Systems (Perkin Elmer)
- Gefriertrockner/Lyophilisator: LYOVAC GT2, Amsco, FINN-AQOA, Deutschland
- Gel Trocknungsrahmen (Carl Roth)
- HPLC-System: ÄKTApurifier (GE Healthcare)
- HPTLC-Laufkammer (Desaga)
- Isoelektrische Fokussierung: Rotofor (Bio-Rad)
- Konzentrator: Concentrator 5301 (Eppendorf)
- Lösungsmittelverdampfer (N<sub>2</sub>): Reacti-Vap III und Reacti-Therm III Modul (Perbio)
- pH-Meter: Mikroprozessor pH-Meter 761 (Knick)
- Phosphoimager: FLA-3000 (Fujifilm)
- Pipettierhilfe: Pipetboy acu (Integra Biosciences)
- Pipetten: Einkanal Pipetten (Eppendorf), Transferpette Direktverdränger Pipetten (Brand)
- Reinluftgeräte: Sicherheitswerkbänke HS 12 (Heraeus)
- Rührplatte, IKA-Labortechnik
- Spannungsgeber: NOVEX Power Ease 500 (NOVEX)  
Power PAC 300 (Bio-Rad)
- Sterilwerkbank: Hera Safe HS12 (Heraeus)
- Ultraschall Desintegrator: RK 100 (Bandelin)
- Vortexer, IKA Labortechnik
- Waagen: BP 2100 S, (Satorius)  
BP 210 S, (Satorius)
- Wipptisch, Biometra
- Zellhomogenisator: Metal Douncer (Pyrex)
- Zellzählkammer: Neubauer improved (Brand)
- Zentrifugen: Megafuge 1.0R, Heraeus  
Biofuge fresco, Heraeus  
Optima TLX Ultrazentrifuge, Beckmann  
Avanti J-25, Beckmann

### 2.1.8 Software

- Tabellenkalkulation, Grafiken: GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software)
- Abbildungen: Photoshop (Adobe Systems), CorelDRAW 11 (Corel Cooperation), Power Point (Microsoft)
- ELISA Auswertung: Softmax Pro, Spf 3.0 (Molecular Devices)
- Textverarbeitung: LaTeX, MiKTeX 2.6 ([www.miktex.org](http://www.miktex.org)) in Verbindung mit TeXnicCenter 1 beta 7.01 ([TeXnicCenter.org](http://TeXnicCenter.org)) und Adobe Reader 7.0 (Adobe Systems)
- Phosphoimager: BASReader 3.14 und Advanced Image Data Analyser, Version 4.03.031 (Fujifilm)
- Massenspektrometrie-Auswertung: Mascot MS/MS Ion Search (Matrix Science)
- Gelfiltration: Unicorn 5.11(GE Healthcare)
- Bioinformatische Analysen: ComputePI/MW, NetNGlyc, InterPro Scan, WoLF PSORT, TargetP1.1 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)), Blast (NCBI)

### 2.1.9 Verzeichnis der Zulieferer

- Adobe Systems GmbH, Ohmstraße 1, D-85716 Unterschleißheim – [www.adobe.de](http://www.adobe.de)
- Amersham Biosciences, siehe GE Healthcare
- Applied Biosystems, Division Headquarters, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404, USA – [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)
- Avanti Polar Lipids Inc., 700 Industrial Park Drive, Alabaster, Alabama 35007-9105, USA – [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)
- Avestin Europe GmbH, Weinheimer Str. 64b, D-68309 Mannheim – [www.avestin.com](http://www.avestin.com)
- B.Braun Melsungen AG, Carl-Braun-Straße 1, D-34212 Melsungen – [www.bbraun.de](http://www.bbraun.de)
- Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Heinrichstraße 3-4, D-12207 Berlin – [www.bandelin.com](http://www.bandelin.com)
- Barloworld Scientific, Beacon Road, Stone, Staffordshire, ST15 0SA, UK – [www.barloworld-scientific.com](http://www.barloworld-scientific.com)
- Beckmann Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, D-47807 Krefeld – [www.beckmann.com](http://www.beckmann.com)
- Binder, Im Mittleren Ösch 5, D-78532 Tuttlingen – [www.binder-world.de](http://www.binder-world.de)
- Biochrom Labs Inc., 1719 South 13th Street, P.O. Box 996, Terre Haute, IN 47808, USA – [www.biochrom.com](http://www.biochrom.com)
- Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Rudolf-Wissel-Straße 30, D-37079 Göttingen – [www.biometra.com](http://www.biometra.com)
- Bio-Rad Laboratories GmbH, Heidemannstraße 164, D-80939 München – [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)
- Brand GmbH & Co.KG, Otto-Schott Straße 25, D-97877 Wertheim – [www.brand.de](http://www.brand.de)
- Carl Roth GmbH & Co.KG, Schoemperlenstraße 1–5, D-76185 Karlsruhe – [www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de)
- Corel Corporation, Edisonstraße 6, D-85716 Unterschleißheim – [www.corel.com](http://www.corel.com)
- Desaga GmbH, In den Ziegelwiesen 1-7, D-69153 Wiesloch
- Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, D-223339 Hamburg – [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)
- ExPASy Proteomics Server – [www.expasy.org](http://www.expasy.org)
- Fisher Scientific GmbH, Im Heiligen Feld 17, D-58239 Schwerte – [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)
- Fluka, siehe Sigma-Aldrich Chemie GmbH
- Fujifilm Europe GmbH, Heesenstraße 13, D-40549 Düsseldorf – [www.fujifilm.de](http://www.fujifilm.de)
- GE Healthcare Buchler GmbH & Co.KG, Gieselweg 1, D-38110 Braunschweig – [www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com)
- GIBCO, siehe Invitrogen
- GraphPad Software Inc., 11452 El Camino Real, 215 San Diego, CA 92130, USA – [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products GmbH, Robert-Bosch-Straße 1, D-63505 Langenselbold – [www.heraeus-instruments.de](http://www.heraeus-instruments.de)
- IKA Labortechnik, IKA-Werke GmbH & Co.KG, Janke und Kunkel-Straße 10, D-79219 Staufen – [www.ika.net](http://www.ika.net)
- Integra Biosciences GmbH, Ruhberg 4, D-35463 Fernwald – [www.integra-biosciences.de](http://www.integra-biosciences.de)
- Invitrogen GmbH (Invitrogen, GIBCO), Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether-Straße 10, D-76131 Karlsruhe – [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
- Kleinfeld Labortechnik, Elbingeröderstraße 1, D-30989 Gehrden – [www.kleinfeld-labor.com](http://www.kleinfeld-labor.com)
- Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG, Beuckestraße 22, D-14163 Berlin – [www.knick.de](http://www.knick.de)
- Matrix Science Ltd., 64 Baker Street, London W1U 7GB, UK – [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)
- Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, D-64293 Darmstadt – [www.merck.de](http://www.merck.de)
- Microsoft Corporation, One Microsoft Way, Redmond, WA 98052-6399 – [www.microsoft.com](http://www.microsoft.com)
- Millipore GmbH, Am Kronenberger Hang 5, D-65824 Schwalbach – [www.millipore.de](http://www.millipore.de)
- Molecular Devices GmbH, Gutenbergstraße 10, D-85737 Ismaning/München – [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

- Novex, siehe Invitrogen
- Nunc GmbH und Co.KG, Hagenauer Straße 21A, D-65203 Wiesbaden – [www.nuncbrand.com](http://www.nuncbrand.com)
- Perbio Science Deutschland GmbH, Adenauerallee 113, D-53113 Bonn – [www.perbio.com](http://www.perbio.com)
- PerkinElmer Life And Analytical Sciences Inc., 940 Winter Street, Waltham, Massachusetts 02451, USA – <http://las.perkinelmer.com>
- Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Sandhofer Straße 116, D-68305 Mannheim – [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)
- Sarstedt AG & Co., Rommelsdorfer Straße, Postfach 1220, D-51582 Nürmbrecht – [www.sarstedt.com](http://www.sarstedt.com)
- Satorius AG, Weender Landstraße 94-108, D-37075 Göttingen – [www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)
- SERO-Med GmbH, Margaretengürtel 100-110, A-1050 Wien – [www.seromed.com](http://www.seromed.com)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstrasse 5, D-82024 Taufkirchen bei München – [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Zellpassage

Die Zelllinie RAW B wurde in DMEM-Vollmedium (DMEM-VM) bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Es wurden 750-ml-Zellkulturflaschen verwendet, das Mediumvolumen pro Flasche entsprach 30 ml. Sobald die Zellen zu einem konfluenten Rasen herangewachsen waren, wurden sie in einer Verdünnung von 1:10 passagiert. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen in PBS mit einem Schaber vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Reaktionsröhrchen überführt, für 5 min bei 4°C und 470 x g in der Megafuge 1.0 R zentrifugiert und das Zellpellet in frischem DMEM-Vollmedium aufgenommen.

#### 2.2.1.2 Herstellen von Zellkulturüberständen zur Enzymreinigung

Die Zelllinie RAW B wurde in großen Zellkulturflaschen in DMEM-VM herangezogen, bis ein fast konfluenter Zellrasen entstanden war. Dann wurde das VM abgezogen, der Zellrasen zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen für zwei Tage in FCS-freiem DMEM mit 30 mM NH<sub>4</sub>Cl kultiviert. NH<sub>4</sub>Cl verhindert das Ansäuern von Endosomen und löst so die Sekretion lysosomaler Proteine in den Zellkulturüberstand aus. Nach zwei Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, in Amicon-Ultrafiltrationseinheiten (Millipore) eingengt und das Konzentrat bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C aufgehoben. Die RAW B-Zellen wurden zur Regeneration wieder für zwei Tage in DMEM-VM gehalten.

#### 2.2.1.3 Zellen einfrieren

Pro 1 ml-Reaktionsröhrchen wurden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen eingefroren. Die entsprechende Anzahl Zellen wurde zunächst in DMSO-freiem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurde sehr langsam das gleiche Volumen Einfriermedium mit 20% DMSO unter ständigem leichten Schütteln tröpfchenweise hinzugefügt. DMSO verhindert, dass die Zellen durch den Einfrierprozess beschädigt werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen in einer Styroporbox bei -80°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden sie in einen Stickstoff-Tank überführt.

#### 2.2.1.4 Zellen auftauen

Es wurden ca. 10 ml Vollmedium auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden bei 37°C vorsichtig aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest Eis im Tube verblieben war. Die Zellsuspension wurde dann sofort in ein 15 ml-Reaktionsröhrchen überführt und tropfenweise das warme Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen noch drei Mal mit Medium gewaschen, um das DMSO vollständig zu entfernen.

#### 2.2.1.5 Präparation von Lysosomen

Die Präparation der Lysosomen erfolgte nach [189]. In 750 ml-Zellkulturflaschen wurden die Zellen zu einem konfluenten Rasen herangezogen. Alle Schritte der Präparation erfolgten auf Eis. Die Zentrifuge wurde auf 4°C gekühlt. Nachdem der Zellkulturüberstand entfernt worden war, wurden die Zellen einmal mit HB-T-Sucrose-Puffer gewaschen und anschließend in demselben Puffer abgeschabt. Die Zellsuspensionen aller Flaschen wurden in 50 ml-Falcon-Röhrchen gesammelt und die Zellen schließlich bei 470 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Lysepuffer aufgenommen, die Suspension in einen Zellhomogenisator überführt und die Zellen durch 10- bis 25-maliges Stempeln mit einem feinen Stempel aufgeschlossen. Währenddessen wurde nach jeweils 5-maligem Stempeln die Lyseeffizienz mikroskopisch kontrolliert. Es sollte dadurch sicher gestellt werden, dass möglichst viele Zellen lysiert, jedoch möglichst wenig Kerne beschädigt wurden. Wenn etwa 80% der Zellen aufgeschlossen waren (mikroskopische Kontrolle), wurde die Suspension für 10 min bei 1105 x g zentrifugiert. Hierbei wurden Kerne und nicht-lysierte Zellen pelletiert, während das vesikuläre Material der lysierten Zellen im Überstand blieb. Es folgte abermals eine Zentrifugation und der resultierende Überstand wurde mit dem des ersten Spins vereint. Das Pellet wurde noch zweimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen. Vom Gesamtlysat und vom Pellet des letzten Spins wurde jeweils ein 100 µl Aliquot genommen. Das vereinigte Homogenat wurde noch dreimal abzentrifugiert, für 5 min bei 37°C mit DNase (1:5000) inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils verworfen. Vom resultierenden kern- und zellfreien Überstand wurde abermals ein 100 µl Aliquot genommen. Anschließend wurde er in 3 ml-Portionen auf je 10 ml einer 30%igen Percollösung in HB-T-Sucrosepuffer geschichtet und für 21 min bei 25 000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch bildete sich im Percoll ein Gradient aus, der mit Hilfe einer Pasteurpipette in 1 ml-Fraktionen geerntet wurde. Die Fraktionen wurden 1:1 mit HB-T-Puffer ohne Sucrose verdünnt und anschließend für 1 h einer Ultrazentrifugation bei 100 000 x g unterworfen. Hierbei wurde das in den jeweiligen Fraktionen befindliche Zellmaterial pelletiert. Die Pellets wurden in HB-T-Puffer aufgenommen und die Vesikel durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen und durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Eine erneute Ultrazentrifugation bei gleichen Bedingungen pelletierte die Vesikelmembranen, während der Überstand den löslichen vesikulären Inhalt enthielt. Die Fraktionen wurden auf Aktivität von Markerenzymen getestet wie in [113] beschrieben.

### 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung mittels BCA

Die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode zeichnet sich durch eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Salzen und Detergenzien aus. Sie beruht auf der Bildung eines Cu<sup>1+</sup>-Bicinchoninsäure(BCA)-Komplexes mit einem Absorptionsmaximum von 562nm.

Für Proteinkonzentrationen ab 20 µg/ml wurde das „BCA\* Protein Assay Reagent“, für Proteinkonzentrationen von 1-20 µg/ml wurde das „Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent“ Kit verwendet (Perbio).

Die Standardreihen wurden mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellt. Beide Tests wurden in Mikrotiterplatten nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und bei einer Wel-

lenlänge von 562 nm gemessen.

### 2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass sich in saurer Lösung das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliantblau G250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn der Farbstoff an Protein gebunden wird. Es wurde das „Protein Assay-Reagenz“ (Bio-Rad) verwendet. In Mikrotiterplatten wurden je 10  $\mu$ l konzentrierte oder verdünnte Probe vorgelegt und je 200  $\mu$ l fertiges Bradford-Reagenz hinzugefügt. Es wurde auf jeder Platte eine Standardreihe mit BSA (Duplikate) angefertigt. Die Messung erfolgte im Spektrometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

### 2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden sowohl selbst gegossene Gele, als auch kommerzielle Gradientengele (Perbio oder Bio-Rad) eingesetzt. Es wurden das Mini- und das Criterion-Polyacrylamid-Elektrophoresesystem von Bio-Rad verwendet. In der Regel wurden die Proteine vor SDS-PAGE mittels Aceton- oder TCA/DOC-Fällung (s.u.) pelletiert.

Zum Gießen der selbst gefertigten Gele wurde die Gießstände entsprechend den Vorgaben des Herstellers zusammengesetzt. Zuvor wurden die Glasplatten und die Kämme sorgfältig Detergenz und 70%igem Ethanol gereinigt, um Verschmutzungen zu beseitigen. Es wurden 10%ige, 12%ige und 15%ige Gele nach Tab.2.1 gegossen.

Beim Mischen der Zusätze wurde darauf geachtet, dass keine Blasen entstanden. Zuerst wurden die Trenngele gegossen und bis zur Aushärtung mit 2-Butanol überschichtet, um eine gerade Geloberkante zu erhalten. Nach Polymerisation wurden sie mit der Sammelgelmischung überschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt. Die Proben wurden vor der Beladung mit 4-fachem Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht, die Geltaschen wurden mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Pufferreservoirs der Gellaufkammer wurden mit Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit einem Proteinstandard und den Proben beladen. Die Gele liefen zunächst bei 15 mA pro Gel, bis die Lauffront das Sammelgel gerade verließ, dann mit 30 mA pro Gel, bis die Lauffront das Trenngel verließ. Im Anschluß wurden die Gele mit Coomassie oder Silber gefärbt (s.u.).

Die von Perbio bezogenen 4-20%igen Gradienten-Minigele wurden analog behandelt. Sie liefen jedoch mit BupH Tris-HEPES-SDS Laufpuffer derselben Firma bei konstant 100 V.

Das Criterion-Gelsystem erlaubt den Lauf von etwas größeren Gelen, was eine etwas bessere Trennung der Proteine ermöglicht. Die Kammer wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Zum Einsatz kamen Criterion XT Bis-Tris 4-12%Gradientengele, als Laufpuffer diente XT MES Puffer (alles Bio-Rad). Die Gele liefen bei zunächst bei 100, dann bei konstant 150 V.

**Tabelle 2.1:** Pipettierschema von Trenn- und Sammelgel für 5 Minigele

Gelkonzentration	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	15%	
ddH <sub>2</sub> O	12,5 ml	10,5 ml	7,5 ml	9 ml
Unterer Gelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	
Oberer Gelpuffer				3,75 ml
Acrylamid	10 ml	12 ml	15 ml	2,25 ml
APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	76,5 $\mu$ l
TEMED	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	22,5 $\mu$ l

### 2.2.2.4 Färbung von Proteingelen

Es wurden zwei Färbemethoden angewendet, die Coomassie- und die Silber-Färbung. Während die Coomassie-Färbung die anschließende Analyse der Proteine im Massenspektrometer erlaubt, ist dies nach der sensitiveren Silberfärbung nicht möglich.

**Coomassiefärbung** Coomassie ist ein Indigofarbstoff, der durch hydrophobe Interaktion an Protein bindet. Zur Verwendung kam entweder die „Imperial Stain“ Lösung (Perbio) oder es wurde mit Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich) wie folgt gefärbt.

1. **Fixierung:** 50% Methanol, 2% Phosphorsäure in Wasser über Nacht.
2. **Waschen:** 3x30 min in Wasser.
3. **Inkubation:** 34% Methanol, 2% Phosphorsäure, 17% Ammoniumsulfat in Wasser für 60 min.
4. **Färbung:** 34% Methanol, 2% Phosphorsäure, 17% Ammoniumsulfat, 0,066% Coomassie Blue G-250 für fünf Tage.
5. **Spülen:** 25% Methanol für maximal 1 min.
6. **Lagern:** in Wasser.

**Silberfärbung** Bei der Silberfärbung bilden Silberionen Komplexe mit den Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das  $\text{Ag}^+$  zu metallischem Silber. Der Vorteil dieser Methode ist ihre große Empfindlichkeit. Es können noch Proteinbanden gefärbt werden, die eine Proteinmenge im untersten Nanogrammbereich enthalten.

Für die Silberfärbung der Gele wurde das Silberfärbungskit „Roti-Black P“ (Carl Roth) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei 4°C über Nacht oder eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung gelagert. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte mit Waschlösung. Anschließend wurden die Gele für 1 min in Sensibilisierungslösung geschwenkt, dreimal kurz gewaschen und für 20 min in die Silberimprägnierungslösung eingelegt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proteinbanden mit Entwicklungslösung sichtbar gemacht. Als die Entwicklung eine angemessene Stärke erreicht hatte, wurde kurz mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und die Entwicklungsreaktion durch Behandlung mit der Stopplösung beendet. Es erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit Waschlösung und eine 60-minütige mit glycerinhaltiger Trocknerlösung. Danach wurden die Gele zwischen zwei Celluphanblätter gelegt, eingescannt und getrocknet.

### 2.2.2.5 Konzentration von Proteinen

**Acetonfällung** Die Proteinlösung wurde auf Eis mit 4 Teilen Aceton versetzt und anschließend für mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Proteinpräzipitat für 25 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet.

**DOC/TCA-Fällung** Die Probe wurde im Verhältnis von 1:9 (v/v) mit 0,15%iger wässriger DOC(Desoxycholat)-Lösung versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde im Verhältnis von 1:9 72%ige TCA (Trichloressigsäure) hinzugefügt, leicht geschüttelt und bei 4°C für eine Stunde oder über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde für 25 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich ein Mal mit 80%igem Aceton gewaschen, wieder abzentrifugiert und getrocknet.

**Ammoniumsulfatfällung** Die Ammoniumsulfatfällung erlaubt eine Konzentration der Proteine unter Beibehaltung ihrer biologischen Aktivität. Diese Methode wurde verwendet, um Proteine aus Zellkulturüberständen auszufällen. Unter Rühren wurde langsam bei Raumtemperatur solange Ammoniumsulfatsalz zu den Proben hinzugefügt, bis die gewünschte Salzkonzentration erreicht war. Die präzipitierten Proteine wurden abzentrifugiert, in Puffer aufgenommen und dialysiert.

**Ultrafiltration** Mittels Ultrafiltration lassen sich Proteinlösungen über Zentrifugation durch einen Filter bzw. eine Membran konzentrieren. Es wurden Amicon-Ultrazentrifugationsröhrchen (Millipore) mit einem Ausschlussvolumen von 5, 10 oder 30 kDa verwendet. Amicons erlauben die Konzentration von bis zu 15 ml Ausgangslösung auf 5-500  $\mu$ l.

### 2.2.2.6 Dialyse

Die Dialyse ist eine klassische Methode, um kleine unerwünschte Moleküle in Lösungen von Makromolekülen abzutrennen. Dieses geschieht über selektive Diffusion durch eine semipermeable Membran. Zum Pufferaustausch mittels Dialyse wurden unterschiedliche Dialysmembranen verwendet. Große Volumina von 20-100 ml wurden mittels Dialyseschlauch (Visking, Carl Roth) gegen Volumen von 2-5 l dialysiert.

Für kleinere Volumen von 0,5-12 ml wurden die Dialyserahmen Slide-A-Lyzer (Perbio) mit einem Ausschlussvolumen von 3,5 oder 7 kDa verwendet. Sehr kleine Volumen von bis zu 0,1 ml wurden mit den Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Units umgepuffert.

### 2.2.2.7 Deglykosylierung

Es kamen native und denaturierende Methoden zur Deglykosylierung zum Einsatz. Die native Deglykosylierung erfolgte enzymatisch mit dem „Native Protein Deglycosylation Kit“ (Sigma-Aldrich), welches die Endoglykosidasen F1, F2 und F3 enthält oder mit PNGase F (Roche) unter nativen Bedingungen. Da die Zuckerketten am nativ gefalteten Protein nicht immer frei zugänglich sind, sind hier lange Inkubationszeiten bis zu mehreren Tagen nötig, um eine möglichst vollständige Deglykosylierung zu erreichen. So wurden die Ansätze bis zu 5 Tagen bei 37°C inkubiert. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Für die Deglykosylierung unter denaturierenden Bedingungen wurde ebenfalls PNGase F verwendet. Zusätzlich wurde eine chemische Deglykosylierung versucht, wobei das „GlycoProfile IV Deglycosylation Kit“ eingesetzt wurde. In beiden Fällen wurde auch hier nach Herstellerangaben vorgegangen.

## 2.2.3 Liposomenherstellung

Zunächst wurden Stocklösungen der Lipide hergestellt. Die Lipide wurden dazu in einem geeigneten Lösungsmittel, meistens Chloroform:Methanol im Verhältnis 2:1, aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Aus diesen Stocks wurden die im jeweiligen Versuch gewünschten Lipidmischungen und -mengen in einem Glasgefäß zusammenpipettiert. Der Lipidansatz wurde gemischt (gevortext) und das Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung abgedampft. Anschließend wurden die letzten Spuren von Lösungsmittel durch Gefiertrocknung unter Vakuum entfernt. Der zurückgebliebene Lipidfilm wurde im gewünschten Puffer für 30 min bei 37°C hydratisiert (Gesamtkonzentration ca. 600  $\mu$ mol/l). Hierbei kommt es zur Quellung des Lipids und einer spontanen Vesikelbildung.

Die Lipidsuspension wurde zehn Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen (37°C Wasserbad) unterworfen. Diese Fraktion wurde in den Versuchen mit multilamellaren Vesikeln (MLVs) eingesetzt.

Zur Herstellung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs) wurde die Lipiddispersion mittels eines Extruders (Avestin) 20-30 Mal durch zwei aufeinander gelegte Polycarbonatfilter mit einer definierter Porengröße von 100 nm gepresst.

Kleine unilamellare Vesikel (SUVs) wurden erhalten, indem die MLV-Suspension für 45 min mit Ultraschall in einem Ultraschall-Wasserbad behandelt wurde.

Es kamen Liposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen zum Einsatz. Zwei Zusammensetzungen wurden besonders häufig verwendet und seien hier beschrieben. Abweichungen sind bei den entsprechenden Experimenten im Ergebnisteil angegeben.

Das „**Grundliposom**“ besteht nur aus den zwitterionischen, also in der Summe neutralen, Lipiden PC, PE und SM zu den Anteilen 50% PC, 15% PE und 35% SM.

Beim „**Komplettliposom**“ orientiert sich die Zusammensetzung der Lipide an der, die von Kobayashi *et al.*[105] für das späte endosomale Kompartiment publiziert wurde: 50% PC, 15% PE und 6% SM, 7% PI, 7% PS und 15% BMP. Im Gegensatz zum Grundliposom sind hier also noch die anionischen Lipide PI, PS und BMP vorhanden, so dass das Liposom eine negativ geladene Membranoberfläche erhält.

Zur Messung der PLA<sub>1</sub>-Aktivität wurde den Liposomen 5 pmol radioaktiv markiertes PC (<sup>14</sup>C am sn-2 Palmitoylrest) zugesetzt. In den Assays wurden je 20 nmol Liposomendispersion/40 µl pro Versuchsansatz eingesetzt.

#### 2.2.4 Phospholipase-Assays

**PLA<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Aktivitäten** wurde mit <sup>14</sup>C-markiertem Phosphatidylcholin detektiert, wobei die zweite Fettsäuregruppe die Markierung trug (L-3-Phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-(1-<sup>14</sup>C)palmitoyl). Das markierte Lipid wurde 1:1000 mit nicht-markiertem verdünnt, so dass jeder Versuchsansatz 4,8 pmol heißes und 4,8 nmol kaltes Phosphatidylcholin enthielt. Das Lipid wurde in chloroformbeständigen 1,5 ml-Teströhrchen getrocknet, in 30 µl Assaypuffer (enthält 0,1% Triton X-100) pro Ansatz aufgenommen und für 1 min im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 5-10 µl der zu testenden Probe pipettiert. Die Versuchsansätze wurden für 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde gestoppt, indem die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend lyophilisiert wurden. Die getrockneten Proben wurden in Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und mittels *High Performance Thin Layer Chromatography* (Hochauflösende Dünnschichtchromatographie, HPTLC) aufgetrennt.

Um die Enzymaktivität gegen andere Phospholipide zu messen, wurde mit diesen Lipiden analog vorgegangen.

**PLD-Aktivität:** Die Messung von PLD-Aktivität erfolgte bei pH 4,5, pH 5,6 oder pH 7,4, wobei für die sauren pH-Bereiche 50 mM Natrium-Acetat-Puffer und im neutralen 50 mM Tris-HCl-Puffer verwendet wurde. Die Puffer enthielten 100 mM KCl, um bei physiologischer Osmolarität zu arbeiten. Zudem wurden 2 mM, 5 mM, 10 mM oder 20 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt, da viele PLDs Kalzium benötigen. In der Regel war zusätzlich Triton X-100 zugegen. Da von vielen PLDs bekannt ist, dass Diethylether im Assay deren Aktivität steigert, wurden einige Assays in Gegenwart von 20vol% Ether durchgeführt. Des Weiteren bevorzugen einige PLDs Alkohole gegenüber Wasser als Nukleophil. Aus diesem Grund wurden ebenfalls Assays unter Zusatz von 2vol% Ethanol durchgeführt.

In den meisten Fällen diente radioaktives PC zur Detektion. Es wurden aber auch Tests an anderen, radioaktiv-markierten, Phospholipiden (PS, PI, PE (siehe Material)) durchgeführt.

Die Versuchsansätze enthielten 100 µl Gesamtvolumen, wurden für 30-60 min bei 37°C inkubiert, lyophilisiert und über HPTLC getrennt. Zur Kontrolle wurden die Lipide mit PLD aus *Brassica oleracea* (Sigma-Aldrich) bei pH 5,6, 30°C, verdaut und die Kontrollansätze bei der HPTLC mitlaufen gelassen.

### 2.2.4.1 HPTLC

Die Proben wurden punktförmig auf HPTLC-Platten der Größe 20 x 20 cm<sup>2</sup> (Merck) aufgetüpfelt. Der Probenauftrag erfolgte auf einer Linie, die 1,5 cm vom unteren Rand entfernt lag. Die Zentren der Probenpunkte hatten einen Abstand von je 1 cm zueinander. Das Laufmittel setzte sich zusammen aus 65 Teilen Chloroform, 25 Teilen Methanol und 4 Teilen Wasser und bedeckte den Boden der Laufkammer mit einer Höhe von etwa 4 mm. Die HPTLC-Platte wurde in die Kammer gestellt, nachdem die Atmosphäre vollständig mit Lösungsmittel gesättigt war, und entfernt, nachdem die Laufmittelfront ca. 1-2 cm von der oberen Kante entfernt war. Nachdem die Platte getrocknet war, wurde über Nacht eine Phosphoimager-Filmplatte aufgelegt, die am nächsten Tag mit dem Phosphoimager mit Hilfe des Programms BASReader ausgelesen wurde.

**Quantifizierung** Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm „Advanced Image Data Analyser“. Es wurde hierbei ermittelt, wie viel Prozent des im Versuchsansatz eingesetzten Lipids durch die Phospholipase A<sub>1</sub>-Aktivität geschnitten wurde. Die Intensität der Schwärzung von Ausgangs- und Schnittprodukt zusammen wurde als 100%-Wert definiert. Eine auf dem Film völlig ungeschwärzte Stelle gleicher Größe wurde als Null-Wert herangezogen. Mit Hilfe dieser Eckwerte wurde schließlich berechnet, wie viel Prozent der Gesamtschwärzung das Schnittprodukt und wie viel das Ausgangsprodukt ausmachten. Diese Prozentzahlen wurden in Molmengen umgerechnet, so dass die umgesetzte Molmenge pro Stunde berechnet werden konnte. Um die getesteten Proben direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Aktivität schließlich auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge bezogen.

**Färben von HPTLC-Platten** In den Fällen, wo kein radioaktiv-markiertes Lipid eingesetzt worden war, wurde die HPTLC-Platte nach dem Lauf getrocknet und mit Rhodamin B-Lösung (Fluka) gleichmäßig eingesprüht. Die Lipide konnten anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

### 2.2.5 Methoden zur Enzymreinigung

#### 2.2.5.1 Renaturierung

**Vortests** Zunächst wurden Vortests durchgeführt, ob und wie die Enzymaktivität renaturiert werden kann. Dafür wurde die PLA<sub>1</sub>-Probe zunächst auf verschiedene Arten im Reagenzröhrchen denaturiert. Dieses geschah zum einen mittels Zusatz von 2 mM oder 5 mM SDS und anschließender Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (37°C, 60°C oder 80°C). Zudem wurde durch Zugabe von 6 mM Urea denaturiert. Ein anschließender PLA<sub>1</sub>-Test stellte sicher, dass die Aktivität komplett verloren gegangen war. In einigen Fällen wurde die PLA<sub>1</sub>-Probe zuvor denaturierend deglykosyliert (PNGase Verdau, siehe 2.2.2.7).

Die denaturierte Probe wurde 10fach mit Renaturierungspuffer verdünnt. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur wurde die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in den Ansätzen gemessen.

**Renaturierung aus SDS-PAGE** Vor dem Auftrag auf das Gel wurde die Probe in reduzierendem Probenpuffer ( $\beta$ -Mercaptoethanol) für 15 min auf 60°C erhitzt. Nach der Gelelektrophorese wurde die Gelspur in Streifen geschnitten und die Gelstückchen mit einem Pistill nach Zusatz von 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, im Reagenzröhrchen zerkleinert. Der „Gelschlamm“ wurde zur Elution der Proteine über Nacht bei Raumtemperatur rigoros geschüttelt und am nächsten Tag mit Renaturierungspuffer versetzt. Einen weiteren Tag später wurden die Proben auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität untersucht.

### 2.2.5.2 Triton X-114 Phasentrennung

Erhitzt man eine wässrige Triton X-114 Lösung auf Temperaturen von über 22°C (Wolkenpunkt), so formen sich unlösliche Detergenzaggregate. Zentrifugation bei niedrigen Geschwindigkeiten erlauben eine saubere Phasentrennung in eine obere, detergenzarme, und eine untere, detergenzreiche, Phase. Proteine können sich je nach ihren lipophilen Eigenschaften in der einen oder anderen Phase anreichern. Die Phasentrennung wurde bei pH 4 und pH 7 durchgeführt. Das Detergenz wurde zunächst zwei Mal mit Puffer vorkondensiert. Zu diesem Zweck wurde es auf Eis im jeweiligen Puffer gelöst und die Lösung anschließend für 5 min auf 37°C erwärmt, um die Phasentrennung zu induzieren. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm und 30°C in der Tischzentrifuge wurde die obere wässrige Phase entfernt und die untere Detergenzphase wieder in Puffer resuspendiert. Nach zweimaliger Vorkondensation wurde schließlich die Probe hinzugefügt und analog verfahren. Nach der ersten Phasentrennung wurden beide Phasen einer weiteren Trennung unterzogen, indem die Detergenzphase nochmals mit Puffer, und die wässrige Phase nochmal mit Triton X-114 versetzt wurde. Im Anschluss wurden alle Fraktionen auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität getestet.

### 2.2.5.3 FPLC-Chromatographie

FPLC steht für Fast Protein Liquid Chromatographie. Mit dieser Methode können Gelfiltrationen oder Ionenaustauschchromatographien durch Anlegen von Drucken mittlerer Stärke in relativ kurzer Zeit (30-60 min) mit besseren Trennergebnissen gefahren werden, als diese bei Niederdruckverfahren erreicht werden. Die FPLC besitzt eine hohe Reproduzierbarkeit und es können beliebige Gradienten eingestellt werden.

**Vortests** Im so genannten **Batchverfahren** kann vor Anwendung einer Chromatographie getestet werden, ob sich ein bestimmtes Säulenmaterial für die Reinigung eignet. Der Test erfolgt im Reaktionsröhrchen. Die Probe wird dabei unter verschiedenen Pufferbedingungen mit dem Säulenmaterial versetzt und inkubiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und auf das zu reinigende Protein hin untersucht. Schließlich wird in Stufen eluiert und die Eluate ebenfalls auf das Protein getestet. Das Batchverfahren wurde auch in dieser Arbeit verwendet, um Chromatographie-Matrices und -Bedingungen auf ihre Eignung zur Reinigung von PLA<sub>1</sub> zu testen. Dabei wurde folgende Säulenmaterialien getestet (von Amersham Biosciences und Applied Biosystems):

- **Starker Anionenaustauscher:** Poros 20 HQ, Mono Q, Mini Q
- **Schwacher Anionenaustauscher:** Poros PI, DEAE Sepharose
- **Starker Kationenaustauscher:** Poros 20 HS
- **Schwacher Kationenaustauscher:** Poros 20 CM
- **Hydrophober Anionenaustauscher:** Phenyl- und Octyl-Sepharose Fast Flow
- **Blue Sepharose:** Fast Flow
- **Lektine:** Weizenkeimagglutinin (WGA) -Sepharose, Jacalin-Agarose, Concanavalin A (Con A)-Sepharose

Die Kopplung an die Ionenaustauscher und Blue-Sepharose erfolgte bei niedriger Ionenstärke (20 mM), in den meisten Fällen in Tris-HCl oder Natriumacetat-Puffer. Für die Anionenaustauscher wurden die pH-Werte 6-9 getestet, für die Kationenaustauscher pH 3-5. Blue Sepharose wurde bei neutralem und leicht basischem pH verwendet. Die Elution erfolgte durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration (50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 1 M NaCl, bei Blue Sepharose bis zu 2 M) oder durch pH-Wert-Änderung. Die Überstände und Eluate wurden anschließend auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität hin untersucht.

Hydrophober Austausch erfordert bei der Bindung hohe Salzkonzentrationen. Es wurden 1 M NaCl und 1 M Ammoniumsulfat ausprobiert. Elution erfolgte durch stufenweise Erniedrigung der Salzkonzentration.

Die Lektin-Matrices wurden nach den Protokollen der Hersteller gewaschen. Bindung erfolgte in Tris-HCl-Puffer bei neutralem pH-Wert. Von WGA wurde mittels N-Acetylglucosamin eluiert, von Con A mit  $\alpha$ -Methylmannosid, von Jacalin-Agarose mit Melibiose.

### 2.2.5.4 Anionenaustausch-Chromatographie

Ionenaustausch-Chromatographien nutzen Unterschiede in Vorzeichen und Größe der Nettoladung von Proteinen bei gegebenem pH-Wert aus. Die hierfür verwendeten Säulen sind mit einem synthetischen Harz gefüllt, an das geladene Gruppen gebunden sind. Im Falle der Anionenaustausch-Chromatographie sind dies positiv geladene Gruppen. Je mehr negativ geladene Gruppen ein Protein enthält, desto besser wird es am Säulenmaterial festgehalten. Proteine, die neutral oder positiv geladen sind, verlassen die Säule bereits im Durchlauf. Vor der Beladung muss jede Säule so lange mit einem Puffer von niedriger Ionenstärke equilibriert werden, bis die bei 280 nm gemessene Proteingrundlinie eine konstant niedrige Absorption aufweist. Die Säule wird anschließend mit der Probe beladen und wiederum mit dem Equilibrierungspuffer so lange gewaschen, bis die an dem Säulenmaterial nicht-bindenden Proteine die Säule verlassen haben. Zur Elution wird die Ionenstärke des Puffers stufenweise erhöht, so dass die gebundenen Proteine nach und nach von der Säule verdrängt werden. Das die Säule verlassende Material wird fraktioniert aufgefangen.

Es wurden zwei verschiedene Anionenaustausch-Materialien verwendet: MonoQ und Source Q1 (SQ1), beide von GE Healthcare. „Q“ bedeutet, dass die funktionelle Gruppe der Säule ein quartäres Amin (z. B.  $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) ist.

**MonoQ-Säule:** Die Maße der MonoQ-Säule betragen 5 x 50 mm, das Volumen entsprach demnach knapp 1 ml. Die Säule wurde mit 20 mM Tris-HCl pH 8.5, 0,05% TX-100, equilibriert. Bei einer Flußrate von 1 ml/min wurden bis zur Elution Fraktionen von 3 ml Volumen gesammelt, mit Beginn der Elution wurde das Fraktionsvolumen auf 1 ml reduziert. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-1000 mM.

**Source Q1-Säule:** Es wurde eine Säule mit den Maßen 10 x 110 mm mit dem Material SQ1 gefüllt. Als Equilibrierungspuffer wurde 40 mM Kalium-Phosphat-Puffer (KPP) pH 7,4 mit 0,05% TX-100 verwendet. Die Flußrate betrug durchgehend 2 ml/min und es wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Zum Eluieren wurde ein linearer NaCl-Gradient von 0-1000 mM angelegt.

### 2.2.5.5 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Kationenaustausch-Chromatographie funktioniert entsprechend dem Anionenaustausch, mit dem Unterschied, dass die Säule in diesem Fall negativ geladene Gruppen trägt, welche Proteine mit positiver Nettoladung binden.

Für diese Chromatographie wurde eine POROS Hyper S-Säule (HS) mit 20  $\mu\text{m}$  Kügelchen von der Firma Applied Biosystems, USA, verwendet. „S“ steht für eine Sulfat-Gruppe ( $-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ ). Die Säule hatte einen Durchmesser von 4,8 mm und eine Länge von 100 mm, und faßte daher ein Volumen von 1,8 ml. Als Equilibrierungspuffer wurde für die erste Chromatographie 40 mM KPP mit einem pH-Wert von 7,2 eingesetzt, für die zweite Chromatographie 40 mM NaAc-Puffer mit einem pH-Wert von 5,2. Die Flußrate betrug bei beiden Chromatographien 1 ml/min und es wurde in 1 ml-Schritten fraktioniert. Eluiert wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-500 mM.

**Gelfiltrations-Chromatographie** Die Gelfiltrations-Chromatographie wird auch Größenausschlußchromatographie genannt. Sie trennt Proteine nach ihrer Größe. Die Säule enthält Kügelchen aus einem quervernetzten Polymer mit definierter Porengröße. Kleinere Proteine können das Polymer durchwandern, größere werden ausgeschlossen, so dass den größeren Proteinen ein kleineres Durchwanderungsvolumen zur Verfügung steht und sie die Säule vor den kleineren Proteinen verlassen.

Die Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex HR 200 10/30-Säule (Amersham Biosciences). Equilibriert wurde die Säule mit PBS. Die Probe wurde vor der Beladung mit einer 10 kDa-Centricon von Millipore, Deutschland, auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt. Bei einer Flußrate von 0,4 ml/min wurde in 250  $\mu$ l-Schritten fraktioniert (96 Well Platte).

### 2.2.5.6 Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) handelt es sich um eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten, welcher durch ein Gemisch von Trägerampholyten aufrechterhalten wird. Die Proteine wandern zu dem Punkt im Gradienten, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist, dem isoelektrischen Punkt (pI). Zur präparativen IEF wurde das Rotofor-System (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet. In diesem geschlossenen zylindrischen System ist eine Fokussierung in freier Lösung und eine anschließende Separation in 20 Proteinfractionen möglich.

Die Proteinlösung wurde für die IEF auf eine Ionenkonzentration von maximal 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, gebracht (durch Dialyse und/oder Verdünnung) und zu 2-5% mit Ampholyten (Bio-Rad oder Amersham Biosciences) versetzt. Um eine Präzipitation der Proteine an ihrem pI zu verhindern, wurden zusätzlich 0,1% DTT (reduzierendes Agens) und 0,1% Triton-X 100 hinzugefügt.

Der Lauf erfolgte in der großen Probenkammer in einem Gesamtvolumen von ca. 55 ml bei konstant 15 W für 3-5 Stunden, bis der Stromfluss konstant blieb. In der Regel betrug der Strom in der Anfangsphase ca. 38 mA und am Ende ca. 20 mA. Als Elektrolyte dienten 0,1 M Natronlauge (NaOH) und 0,1 M Phosphorsäure ( $H_3PO_4$ ).

### 2.2.5.7 Concanavalin A-Chromatographie

Die Concanavalin A-Chromatographie gehört zu den Affinitätschromatographien, genauer zu den Lektinchromatographien. Lektine binden reversibel Zuckerreste. Con A bindet  $\alpha$ -D-Glucose- und verwandte Reste.

**Säulenchromatographie** Es wurde eine 1 ml-fassende Säule mit einem Durchmesser von 4 mm mit Con A Sepharose 4B von GE Healthcare versehen. Als Equilibrierungspuffer diente PBS mit 0,05% TX-100. Die Flußrate betrug 0,2 ml/min und es wurden 1 ml-Fractionen gesammelt. Bei der Beladung mit der Probe wurde die Säule auf 4°C gekühlt. Kühlung fördert die Bindung von Protein an die Säule. Für die Elution hingegen wurde die Säule auf 30°C erwärmt. Sie erfolgte mit einer 4%igen Lösung von Methylmannosid in PBS.

**Batchverfahren** Zur Vorbereitung wurde die Sepharose zunächst mit sieben Volumenteilen 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, und anschließend mit drei Volumenteilen Con A-Waschlösung (1 M NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $CaCl_2$ , 5 mM  $MnCl_2$ ) gespült (so vom Hersteller empfohlen). Die Proben wurden auf eine NaCl-Konzentration von 0,5 gebracht und nachfolgend mit Con A-Sepharose versetzt. Die Bindung der Proteine an das Con A-Material erfolgte in 50 ml-Röhrchen über Nacht unter Rotation bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Überstände auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität getestet, um sicher zu stellen, dass die Aktivität komplett an die Sepharose gebunden hatte.

Die Con A-Sepharose wurde vier Mal mit je zwei Volumenteilen 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, gewaschen und der Waschüberstand vereinigt. Anschließend wurden folgende

Elutionen schritte durchgeführt, wobei die Überstände der einzelnen Elutionsschritte ebenfalls vereinigt wurden:

1. Drei Volumenteile 50 mM Methylmannopyranoside in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, bei Raumtemperatur.
2. Drei Volumenteile 500 mM Methylmannopyranoside in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4. Vor Abnahme der Überstände jeweils 15 minütige Inkubation bei 30°C im Wasserbad.
3. Drei Volumenteile 1 M Glucose in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4.
4. Drei Volumenteile 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4.

### 2.2.5.8 Material für Affinitätsreinigung

Zur Affinitätsreinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> wurden Affinitätsmatrices wie folgt hergestellt:

**Kopplung von 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine an EAH-Sepharose 4B.** Die Kopplung erfolgte in 50 ml-Reagenzröhrchen in Anlehnung an Rock & Snyder und Barsukov [17, 178]. 4 ml der EAH-Sepharose wurden zunächst mit ddH<sub>2</sub>O, pH 4,5 (eingestellt mit HCl), dann mit 0,5 M NaCl in ddH<sub>2</sub>O, pH 4,5, und zuletzt mit Dioxan/ddH<sub>2</sub>O 1:1 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 5 ml Dioxan/ddH<sub>2</sub>O 1:1 aufgenommen, mit 206 mg H-ethyl-N<sup>3</sup>-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochlorid und 25 mg des zu koppelnden Liganden versetzt und mit Dioxan/ddH<sub>2</sub>O auf 10 ml aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für zwei Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Nach dieser Zeit wurde der pH-Wert mittels pH-Papier kontrolliert. Dieses ist wichtig, da der pH-Wert während der Kopplungsreaktion sinkt und durch Zugabe von NaOH wieder angepasst werden muss. Der optimale pH-Bereich für die Reaktion liegt bei pH 4,5-6,0. Schließlich wurde der Reaktionsansatz für 24 Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Es folgten mehrere Waschschritte, um die gekoppelte PC-Sepharose von nicht umgesetzten Reagenzien zu befreien. Gewaschen wurde nacheinander mit 100 ml Dioxane, 100 ml Methanol, 100 ml 1 M NaCl und schließlich 150 ml 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,5. Nachfolgend wird dieses Affinitätsmaterial „PC-Sepharose“ genannt.

**Kopplung von Rosenthals-Inhibitor an ECH-Sepharose 4B.** Die Kopplung erfolgte ebenfalls in 50 ml-Reagenzröhrchen in Anlehnung an Vargas-Villarreal *et al.*, 1991 [228]. Zur Vorbereitung wurden 4 ml der ECH-Sepharose wie oben mit ddH<sub>2</sub>O, pH 4,5 (eingestellt mit HCl), dann mit 0,5 M NaCl in ddH<sub>2</sub>O, pH 4,5, und zuletzt mit Dioxan/ddH<sub>2</sub>O 1:1 gewaschen. Anschließend wurde die ECH-Sepharose in 10 ml Dioxane aufgenommen, 206 mg 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide, 25 mg Rosenthals Inhibitor (Dimethyl-DL-2,3-distearoyloxypropyl(2-hydroxyethyl)ammonium acetate) und 49 mg Dimethylaminopyridine (Katalysator) hinzugefügt und der Ansatz für 24 Stunden bei Raumtemperatur rotiert. Die „Rosenthal-Sepharose“ wurde dann nacheinander zunächst mit 150 ml Isopropanol, 150 ml Chloroform, 150 ml Dioxane, 150 ml ddH<sub>2</sub>O und 150 ml 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,5 gewaschen.

**Affinitäts-Batchverfahren** Vortest: Je 100 µl der PC- bzw. Rosenthal-Sepharose wurden in 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,5, mit einer der PLA<sub>1</sub>-Fraktionen aus isoelektrischer Fokussierung versetzt. Als Kontrolle wurden ungekoppelte EAH- oder ECH-Sepharose mit der PLA<sub>1</sub>-Probe versetzt. Die Ansätze wurde für 10 min leicht geschüttelt, die Sepharose abzentrifugiert und die Überstände abgenommen. Anschließend wurde mit dem Bindungspuffer mehrfach gewaschen und folgende Puffer auf ihre Fähigkeit getestet, gebundene Proteine zu eluieren:

1. 100 mM Tris-HCl, pH 8,6

2. wie 1. + 1 M NaCl
3. wie 1. + 3 mM SDS
4. wie 1. + 6 mM Urea

Das Batchverfahren der Gesamtprobe erfolgte mit 1 ml PC-Sepharose.

### 2.2.5.9 Massenspektrometrische Analyse mittels LC/MS/MS

Diese Arbeiten wurden für uns von Heike Stephanowitz in der Gruppe von Dr. Eberhard Krause am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, durchgeführt. Bei einer LC/MS/MS handelt es sich um die Kopplung einer Flüssigkeitschromatographie (LC) mit MALDI-MS/MS. MALDI/MS/MS steht für *Matrix-assoziierte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie*. Nach dem tryptischen Verdau der Proteine werden die entstandenen Peptide mittels LC (HPLC) aufgetrennt und die Fraktionen auf eine Maldi-Probenplatte getüpfelt. Im Massenspektrometer werden die Peptide ionisiert, unter Hochspannung in einem Flugrohr beschleunigt und ihre Flugzeit detektiert. Letztere gibt Aufschluss über die Peptidmassen. Die MS/MS-Analyse erlaubt durch die Fragmentation der Peptide ein Sequenzbestimmung derselben.

**Proteinverdau** Die Gelstückchen wurden mit 50% (v/v) Acetonitrile (ACN) in 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen, in ACN dehydriert und unter Vakuum getrocknet. Es folgte eine Inkubation mit 100 ng Trypsin (Sequenzierungsgrad, Promega, Madison, WI, USA) in 30  $\mu$ l 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung. Nach 17 h bei 37°C wurde der Verdau durch Zugabe von 35  $\mu$ l 0,3%iger Trifluoressigsäure in ACN gestoppt, der Überstand abgenommen, unter Vakuum getrocknet und in 10  $\mu$ l 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure und 5% ACN wiederaufgenommen.

**nanoLC und MALDI-MS/MS** Die aus dem tryptischen Verdau resultierenden Peptide wurden mittels eines UltiMate HPLC Systems (Dionex, Idstein, Germany) separiert und mit Hilfe eines Probot Micro-Pipettierroboters fraktioniert (Dionex) und auf Maldi-Target-Platten aufgetragen. Zur LC-Separation wurden die Proben auf eine Vorsäule (PepMap C18, Dionex) geladen und auf eine analytische Säule (PepMap C18, Dionex) eluiert. Die Separation und Elution der Peptide erfolgte mit einer Flussrate von 200 nL/min. Die mobilen Phasen für die Chromatographie setzen sich wie folgt zusammen. Mobile Phase A: 0,1% TFA in ACN/Wasser (1/19; v/v); mobile Phase B: 0,085% TFA in ACN/Wasser (4/1; v/v). Die Elution der Peptide erfolgte mittels eines Gradienten mit 5-65% B über einen Zeitraum von 31 min. Das Eluat wurde direkt mit Matrix-Lösung (2 mg of  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure in 1 ml of 0,1% TFA in ACN/Wasser, 7:3) vermischt und anschließend auf stählerne unbeschichtete Maldi-Target-Platten (Applied Biosystems) aufgetüpfelt. Pro LC-Lauf wurden im zeitlichen Abstand von 10 s jeweils 156 Eluat-Fraktionen auf die Platte aufgebracht.

Die Messungen erfolgten an dem nanoLC-MALDI-Massenspektrometer „4700 Proteomics Analyzer“ von Applied Biosystems, Framingham, MA, USA mit einem Nd:YAG Laser (355 nm) bei einer Frequenz von 200 Hz. Die MS-Spektren wurden im Reflektionsmodus durch die Aufnahme von 3000 Laserimpulsen erhalten. Anschließend wurden aus jeder Fraktion 5 Peptidionen fragmentiert, um MS/MS-Spektren dieser Peptide zu erhalten. Die Fragmentation erfolgte mit einem Minimum von 4000 und einem Maximum von 8000 Laserimpulsen. Die Kollisionsenergie betrug 1keV und als Kollisionsgas diente Luft. Die Daten wurden mit dem GPS Explorer (Applied Biosystems) prozessiert.

**Analyse der MS/MS-Spektren** Die Analyse der MS/MS-Spektren erfolgte mit Hilfe des MASCOT Servers (Version 2.0, Matrix Science Ltd, London, UK) gegen die Proteindatenbanken SwissProt und NCBI. Als Massentoleranz für Peptidion und Sequenzierungsionen

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

wurde auf 100 ppm und 0,15 Da festgelegt. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn der MASCOT-Wert über der Signifikanzgrenze ( $p=0,05$ ) lag und mindestens 2 Peptide des Proteins gefunden wurden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Enzymreinigung

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Reinigung und Sequenzierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> aus Makrophagen, deren codierendes Gen bis heute noch unbekannt ist. Um ein günstiges Reinigungsprotokoll zu etablieren, wurden die gängigen Fraktionierungsverfahren zur Proteinreinigung auf ihre Eignung getestet, die PLA<sub>1</sub>-Aktivität anzureichern. Dazu zählen im Wesentlichen Triton X-114-Phasentrennung, fraktionierende Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch-Chromatographie (Anionen-, und Kationenaustauscher), Hydrophobe Chromatographie, Chromatofokussierung, High Performance Liquid-Chromatographie (HPLC), Lektin-Chromatographien (Concanavalin A (Con A), Weizenkeimagglutinin, Jacalin) und IEF. Es stellte sich heraus, dass die meisten dieser Methoden zur PLA<sub>1</sub>-Reinigung ungeeignet waren, da das Enzym entweder nicht vom Säulenmaterial gebunden wurde, sich nach Elution in einem breiten Bereich der Eluate wiederfand, also nicht angereichert wurde, oder ein hoher Verlust an Gesamtaktivität auftrat. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die getesteten Methoden, im Methodenteil finden sich nähere Angaben zu Material und Bedingungen dieser Versuche.

Eine Erklärung für das heterogene Verhalten des Enzyms ist sein hoher Glykosylierungsgrad und wahrscheinlich eine partielle Degradation der Zuckerketten. Es ist typisch für Glykoproteine, dass dieselbe Polypeptidkette mit variierenden Glykosylierungsgraden vorkommt, was sich auf Ladung und Masse der Proteine und damit auf ihr Verhalten in entsprechenden Anreicherungsmethoden auswirkt. Dieses Phänomen soll später noch näher diskutiert werden.

Ein Lösung wäre gewesen, die lysosomale PLA<sub>1</sub> für die Reinigung komplett zu deglykosylieren. Methoden, Proteine zu deglykosylieren, sind jedoch vor allem analytischer, nicht präparativer Natur. Zudem erfordert eine quantitative Deglykosylierung oftmals die vorhergehende Denaturierung der Proteine. Bei dem Versuch, das Enzym

### 3. ERGEBNISSE

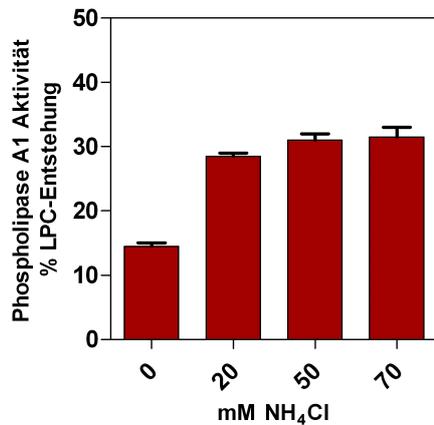
---

**Tabelle 3.1: Getestete Reinigungsmethoden zur Anreicherung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Die markierten Methoden wurden im Weiteren für die Reinigung verwendet.**

Methoden	Ergebnis
<b>Anionenaustauscher</b>	Je nach Austauschermatrix und pH-Wert PLA <sub>1</sub> im Durchlauf oder zum großen Teil gebunden. Nach Elution Aktivität in einem breiten Bereich an Fraktionen. Sehr schlechte Anreicherungsfaktoren (oft unter 1), großer Verlust an Gesamtaktivität.
<b>Kationenaustauscher</b>	PLA <sub>1</sub> wird bei pH 3,7 gebunden, jedoch Elution von aktivem Enzym nicht möglich.
<b>Hydrophober Austauscher</b>	PLA <sub>1</sub> wird nicht gebunden.
<b>HPLC</b>	Zunächst gute Erfolge, Anreicherung von aktivem Enzym. Später Inaktivierung des Enzyms auf Säule, daher Methode nicht eingesetzt.
<b>Blue Sepharose</b>	PLA <sub>1</sub> wird nicht gebunden.
<b>Lektine*</b>	<i>Con A</i> bindet PLA <sub>1</sub> komplett, Elution auch hier über breiten Bereich. Daher Übergang zu Batchverfahren mit Stufengradient. <i>WGA</i> bindet je nach eingesetzter PLA <sub>1</sub> -Probe einen mehr oder weniger großen Anteil der Aktivität. Nach Bindung schwer eluierbar. Keine Anreicherung. <i>Jacalin</i> bindet PLA <sub>1</sub> nicht.
<b>Gelfiltration*</b>	Geringer Anreicherungsfaktor (2-3).
<b>Chromatofokussierung</b>	Aktivität bindet, lässt sich jedoch mittels pH-Gradient nicht eluieren bzw. wird inaktiv. Daher Methode nicht geeignet.
<b>Isoelektrische* Fokussierung</b>	Auch hier Fokussierung mit einer breiten Schulter, jedoch in sehr niedrigem pH-Bereich von 3,5-4. Daher zur Abtrennung der PLA <sub>1</sub> von einem Großteil der kontaminierenden Proteine geeignet, welche höhere isoelektrische Punkte besitzen.
<b>TX-114 Phasentrennung</b>	PLA <sub>1</sub> bleibt sowohl bei pH 4 als auch bei pH 7 zu 80% in wässriger Phase, wie der Großteil der in der Probe vorhandenen Proteine.
<b>Fraktionierende Ammoniumsulfatfällung</b>	PLA <sub>1</sub> präzipitiert verstärkt bei hohen (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Konzentrationen > 70%. Der Anreicherungsfaktor von 2-3 rechtfertigt jedoch nicht die hohen Verluste bei einer fraktionierenden Fällung (Ausbeute < 30%)
<b>Native Deglykosylierung</b>	PLA <sub>1</sub> verliert Aktivität.

unter nativen Bedingungen enzymatisch zu deglykosylieren, verlor es seine Aktivität. Es war daher nicht möglich, die Reinigung an der deglykosylierten Form des Enzyms durchzuführen.

Lediglich die Reinigung über Con A, die IEF und die Gelfiltration führten zur Anreicherung der Enzymaktivität und wurden später für die Reinigung eingesetzt.



**Abbildung 3.1:** *Lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität gelangt in den Zellkulturüberstand.* Das Zellkulturmedium der RAW B-Zellen wurde mit NH<sub>4</sub>Cl in den angegebenen Konzentrationen versetzt und am nächsten Tag die PLA<sub>1</sub>-Aktivität im Kulturüberstand gemessen. Der Null-Wert zeigt die PLA<sub>1</sub>-Aktivität ohne Zugabe der Base. Das Zellkulturmedium alleine, welches in diesem Falle kein Rinderserumalbumin enthält, ist nicht aktiv. Die Aktivität wurde bei pH 4 und 1 mM EDTA gemessen. Bei pH 7,6 (100 mM Tris-HCl) war keine PLA<sub>1</sub>-Aktivität detektierbar.

### 3.1.1 Ausgangsmaterial

Bei der zu reinigenden PLA<sub>1</sub> handelt es sich um ein lysosomales Enzym, welches unsere Arbeitsgruppe in Mausmakrophagen nachweisen konnte. Für seine Reinigung wurden daher zunächst Lysosomen aus der Mausmakrophagen-Zelllinie RAW B mittels subzellulärer Fraktionierung isoliert und als Ausgangsmaterial verwendet [113]. Es stellte sich jedoch heraus, dass die hierbei erhaltenen Proteilmengen bei Weitem nicht ausreichend waren. So wurden Fraktionen erhalten, in welchen zwar noch eine geringe PLA<sub>1</sub>-Aktivität gemessen werden konnte, die Proteine jedoch nicht mehr nachweisbar waren.

Es wurde daher ein anderer Weg beschritten, Ausgangsmaterial für die Enzymreinigung anzureichern: Der Zusatz von schwachen Basen, wie NH<sub>4</sub>Cl (Ammoniumchlorid) zu Zellkulturen bewirkt eine Alkalisierung der sauren Kompartimente, d. h. der Lysosomen und späten Endosomen. Als Folge werden die M6P-sortierten lysosomalen Proteine gesteigert sezerniert und können im Zellkulturüberstand wiedergefunden werden [27]. Allerdings handelt es sich bei den meisten dieser Enzyme um Vorstufen, welche erst im Lysosom proteolytisch aktiviert werden [81, 133].

Daher wurde zunächst geprüft, ob RAW B-Zellen aktive PLA<sub>1</sub> in den Kulturüberstand abgeben, wenn NH<sub>4</sub>Cl zugegen ist. Für diesen Versuch wurde dem Medium kein FCS zugesetzt. Wie man in Abbildung 3.1 sieht, sezernieren die RAW B-Zellen auch ohne Zugabe der Base eine gewisse Menge an saurer PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Die Anwesenheit von 20 mM NH<sub>4</sub>Cl bewirkt eine Verdopplung der im Überstand gemessenen Aktivität. Es handelt sich bei der gemessenen PLA<sub>1</sub> um ein Enzym, das ausschließlich im Sauren arbeitet. Bei pH 7,6 konnte keine PLA<sub>1</sub>-Aktivität gemessen werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es sich bei der gemessenen PLA<sub>1</sub>-Aktivität um ein lysosomales Enzym handelt. Zur Kontrolle der Daten wurden die Aktivitäten der lysosomalen

**Tabelle 3.2:** Renaturierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität

Methode der Denaturierung	Renaturierung möglich?
2 mM SDS, 10 min, 37°C	ja
2 mM SDS, 10 min, 60°C	ja
2 mM SDS, 10 min, 80°C	ja
5 mM SDS, 10 min, 37°C	ja
5 mM SDS, 10 min, 60°C	ja
5 mM SDS, 10 min, 80°C	ja
8 M Urea, 3 h, 20°C	ja
Denaturierende Deglykosylierung mit PNGase	nein
reduzierendes SDS-PAGE	ja
nicht-reduzierendes SDS-PAGE	ja

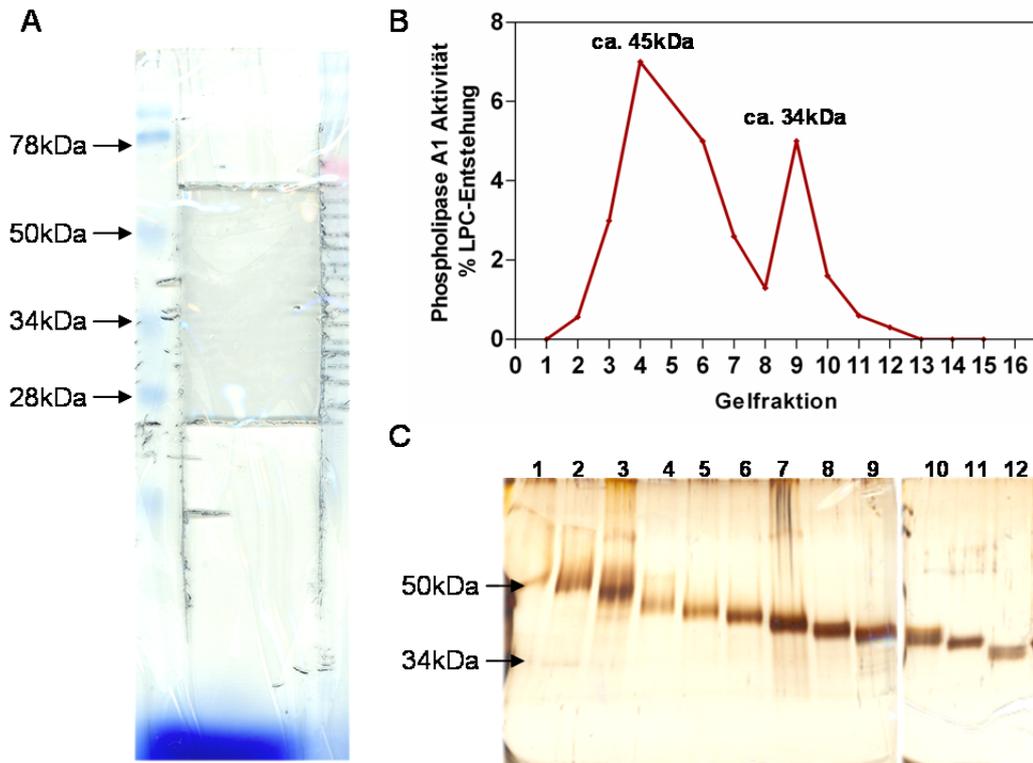
Cathpsine B und L ebenfalls gemessen und ein vergleichbares Ergebnis erhalten (nicht gezeigt).

Diese Versuche zeigten, dass Zellkulturüberstände verwendet werden können, um die lysosomale PLA<sub>1</sub> zu reinigen. Die Methode bietet den Vorteil, dass auf unkomplizierte Weise relativ viel Ausgangsmaterial gesammelt werden kann.

### 3.1.2 Renaturierung

Auf der Suche nach geeigneten Reinigungsmethoden wurde eine besondere Methode entwickelt, welche eine Renaturierung der Enzymaktivität nach Trennung über SDS-PAGE erlaubt.

Zum Thema Renaturierung nach Gelelektrophorese gibt es nicht viele Veröffentlichungen. Einige der publizierten Protokolle wurden für die PLA<sub>1</sub>-Renaturierung ausprobiert. Diese sahen meist eine Denaturierung mittels Guanidin-Hydrochlorid zur vollständigen Entfaltung des Proteins vor und verwendeten verschiedenartige Renaturierungspuffer [5, 29, 121, 156, 211, 236]. Die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität ließ sich jedoch mittels dieser Protokolle nicht renaturieren. Schließlich brachte der Einsatz von  $\beta$ -CD den entscheidenden Erfolg. Dieses ringförmige Molekül ist in der Lage, SDS zu binden. Dank dieser Fähigkeit komplexiert es an Protein gebundenes SDS und entfernt es dadurch von der Aminosäurekette. Diese hat nun die Möglichkeit, wieder ihre native Konformation einzunehmen [40]. Die Vortests erfolgten im Teströhrchen mit Lysosomenpräparationen oder Zellkulturüberständen. Eine Enzymfraktion wurde hierfür unter verschiedenen Bedingungen denaturiert und im Anschluss versucht,



**Abbildung 3.2: PLA<sub>1</sub>-Aktivität kann aus SDS-PAGE renaturiert werden.** A: Es wurde ein 10 cm langes 12%iges SDS-Gel hergestellt und eine PLA<sub>1</sub>-Fraktion aus Zellkulturüberstand aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel, wie auf dem Bild verdeutlicht, im Bereich zwischen ca. 20 und 60kDa in Streifen geschnitten, die Proteine eluiert und in Renaturierungspuffer inkubiert. B: Aus den Gelstreifen wiedergewonnene PLA<sub>1</sub>-Aktivität. C: Es wurde jeweils ein Aliquot der renaturierten Proteinfraktionen nochmals einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung unterworfen.

Aktivität zurückzugewinnen. Dabei wurde kontrolliert, dass nach Denaturierung tatsächlich keine PLA<sub>1</sub>-Aktivität mehr zu messen war. Wie aus Tabelle 3.2 hervor geht, ist eine Renaturierung sowohl nach SDS-, als auch nach Urea-Behandlung möglich. Im Anschluss wurden SDS-Gele angefertigt, wobei die Enzymprobe vor Gelauftrag entweder in reduzierendem, oder in nicht-reduzierendem Probenpuffer erhitzt wurde. Die Gelspuren wurden in Streifen geschnitten, das Protein eluiert und in Renaturierungspuffer inkubiert. Anschließende Aktivitätstests zeigten, dass in beiden Gelspuren zwischen ca. 28 und 52 kDa PLA<sub>1</sub>-Aktivität vorhanden war.

Im Anschluss an diese Vortests wurde ein größeres, 10 cm langes 12%iges Gel angefertigt, welches eine genauere Trennung der Proteine aus dem Zellkulturüberstand erlauben sollte. Dieses Mal wurde nur der Bereich zwischen 20 und 60 kDa in feine Gelstreifen geschnitten und der Renaturierung zugeführt (siehe Abbildung 3.2A). Abbildung 3.2B zeigt, dass auch hier in einem Größenbereich von 28 und 50 kDa Ak-

tivität zurückgewonnen werden konnte. Die Aktivitätskurve weist zwei Scheitelpunkte auf, einen bei ca. 45 und einen bei ca. 34 kDa. Das Leiternmuster in Kontrollbild 3.2C belegt, dass die Proteine erfolgreich aus den entsprechenden Gelstückchen eluiert wurden.

Das Ergebnis zeigt, dass die PLA<sub>1</sub> auch im SDS-Gel nicht in einer distinkten Bande, sondern sehr breit läuft. Dieses kann durch unterschiedliche Glykosylierungsgrade und damit heterogenen Proteinmassen bedingt sein [176]. Ist dies der Fall, so müssten nach Deglykosylierung disktrinktere Banden erhalten werden. Leider konnte das Enzym weder nach chemischer, noch nach enzymatischer Deglykosylierung renaturiert werden. Womöglich spielen die Zuckerketten bei der nativen Faltung des Proteins eine Rolle.

Eine weitere Erklärung für das breite Laufverhalten im SDS-Gel und das Auftreten von zwei Scheitelpunkten wäre, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität durch zwei Isoenzyme verursacht wird.

#### **3.1.3 Erfolgreiche Anreicherung und Isolierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>**

##### **3.1.3.1 Ammoniumsulfatfällung**

Der nun folgende Abschnitt des Ergebnisteils stellt dar, wie über eine partielle Reinigung des Enzyms die Sequenzen von zwei Proteinen ermittelt wurden, welche für die PLA<sub>1</sub>-Aktivität verantwortlich sein können.

Um ausreichend Ausgangsmaterial für die Reinigung zu erhalten, wurden über einen Zeitraum von fünf Monaten Zellkulturüberstände von mehr als 1000 großen Zellkulturflaschen gesammelt.

Die gesammelten Überstände wurden mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 0,5 Liter eingengt und die Proteine anschließend auf Eis durch langsame Zugabe von (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Endkonzentration: 90%) komplett ausgefällt. Das abzentrifugierte Pellet wurde in 150 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, aufgenommen und unter mehrmaligem Pufferwechsel über Nacht bei 4°C gegen denselben Puffer dialysiert.

##### **3.1.3.2 Bindung an Concanavalin A-Sepharose**

Die dialysierte Probe wurde im Batchverfahren bei 4°C über Nacht an Con A-Sepharose gebunden und die Proteine schrittweise eluiert. Folgende Elutionspuffer wurden verwendet:

1. 50 mM Methylmannopyranosid in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, bei Raumtemperatur.

**Tabelle 3.3:** Anreicherungstabelle der lysosomalen PLA<sub>1</sub> nach Con A-Anreicherung

Fraktion	Gesamtaktivität	Spez. Aktivität	Proteinmenge(mg)	Volumen (ml)	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
Auftrag	180000	100	1800	320	1,0	100,0
Überstand	4650	7	664	280	0,1	2,6
Waschfraktion	3060	18	170	40	0,2	2,6
1. Elution	79000	700	113	40	7,0	45,0
2. Elution	244500	1500	163	38	15,0	135,0
3. Elution	14000	1400	10	4	14,0	7,7
4. Elution	6600	300	22	4	3,0	3,6

2. 500 mM Methylmannopyranosid in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4. Vor Abnahme der Überstände jeweils 30-minütige Inkubation bei 30°C im Wasserbad.
3. 1 M Glucose in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4.
4. 50 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4.

Die Elutionsfraktionen wurden über Ultrafiltration aufkonzentriert und in 100 mM Tris-HCl, pH 7,4, umgepuffert. Anschließend wurden Protein- und Aktivitätstests durchgeführt. Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse zusammen. Insgesamt wurde eine Proteinmenge von ca. 1800 mg mit 40 ml Con A-Sepharose versetzt. Nach Inkubation waren davon noch ca. 830 mg in Lösung. Das bedeutet, dass 46% des Gesamtproteins nicht an das Lektin gebunden hatten. Die entsprechende Menge fand sich in der Überstands- und Waschfraktion. Es konnte insgesamt eine Proteinmenge von ca. 310 mg eluiert werden. Addiert man diese Menge mit derjenigen, die nicht gebunden hat, so kommt man auf ca. 1140 mg. Das sind 63% der aufgetragenen Menge. Demnach sind 37% der aufgetragenen Proteinmenge auf der Säule verloren gegangen.

Betrachtet man die jeweiligen spezifischen Aktivitäten der Fraktionen, erkennt man eine Anreicherung in den Elutionsfraktionen. Bei der 1. Elution wurde ein Anreicherungsfaktor von 7, bei der 2. und 3. Elution ca. der Faktor 15 erreicht (Tabelle 3.3). Interessanterweise nimmt jedoch die Gesamtaktivität zwischen Auftrag und 2. Elution zu. Dies könnte darin begründet liegen, dass in den Zellkulturüberständen Moleküle vorhanden sind, welche inhibitorisch auf die PLA<sub>1</sub>-Aktivität wirken oder das Substrat binden und damit für das Enzym unzugänglich machen. Diese Moleküle könnten während des Batchverfahrens abgetrennt worden sein.

Die 1. Elutionsfraktion wird im Folgenden „**Elu1**“-Fraktion genannt und wurde separat weiterverarbeitet. Die Elutionsfraktionen 2 und 3 wurden für die weitere Reinigung gepoolt und mit „**Elu2**“ bezeichnet.

#### 3.1.3.3 Isoelektrische Fokussierung

Die IEF erfolgte in der Flüssigphase mit dem Gerät „Rotofor“ der Firma Biorad. Die Rotofor Zelle besteht aus einer Säule, welche durch eine Reihe von zwischengeschalteten Filtern in 20 Abschnitte unterteilt wird. Diese Filter und die ständige Rotation der Säule während des Laufes hemmen das Ausmaß von Konvektionsströmen, welche den pH-Gradienten verzerren würden.

Proteine neigen dazu, an ihrem pI zu präzipitieren, da sie hier keine Nettoladung mehr besitzen. Dies begünstigt die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen. Es kommt hinzu, dass man bei einer IEF bei sehr niedriger Ionenstärke (maximal 20 mM) arbeiten muss, was hydrophobe Wechselwirkungen zusätzlich begünstigt.

In Probeläufen mit Ampholyten pH 3-10 zeigte sich, dass die PLA<sub>1</sub>-Aktivität ausschließlich im sauren Bereich fokussiert und hier ebenfalls dazu tendiert, nach der Fokussierung irreversibel auszufallen. Der Hersteller empfiehlt in diesem Falle die Erhöhung der Ampholyt-Konzentration von 1% auf 5-6%. Zusätzlich können Detergenzien, wie CHAPS, dazu beitragen, die Proteine in Lösung zu halten. Da CHAPS die PLA<sub>1</sub>-Aktivität jedoch inhibierte, wurde Triton X-100 verwendet. Des Weiteren verhindert eine Zugabe von DTT die Ausbildung ungewollter Disulfidbrücken zwischen den Proteinen. Die Probe wurde zur Fokussierung daher mit je 0,1 % Triton und DTT versetzt.

Um einer Präzipitation entgegen zu wirken empfiehlt es sich außerdem, nicht zu hohe Proteinkonzentrationen je Fokussierungslauf einzusetzen. Aus diesem Grund wurde die Elu1-Probe in zwei, die Elu2-Probe in fünf unabhängigen Läufen fokussiert.

In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Fokussierungen dargestellt. Die ersten drei Fokussierungen (A-C) wurden mit Ampholyten 3-5 der Firma Biorad durchgeführt. Der damit aufgebaute pH-Gradient reicht jedoch nicht weit genug in den sauren Bereich. Die Aktivitätskurve beginnt schon in Fraktion 1 mit hohen Werten. Ein Teil der Aktivität ist hier sehr wahrscheinlich an der Anode verloren gegangen.

Daher wurden Ampholytlösungen mehrerer Hersteller auf ihre Fähigkeit getestet, den pH-Gradienten in noch saurere Bereiche zu verschieben. Die Pharmalyte 2,5-5 von Amersham Biosciences erfüllten schließlich diese Bedingung. Wie man in Abbildung 3.3A-C sieht, fokussiert die Aktivität an zwei Scheitelpunkten (*engl.: Peaks*): Einem breiten Peak im sehr sauren Bereich und einem schmaleren zwischen pH 5 und 5,5. Für die Fokussierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität sollte folglich ein pH-Gradient von pH 3–6 aufgespannt werden.

Für die Fokussierungen D-G wurde deshalb eine Mischung der Pharmalyte 2,5-5

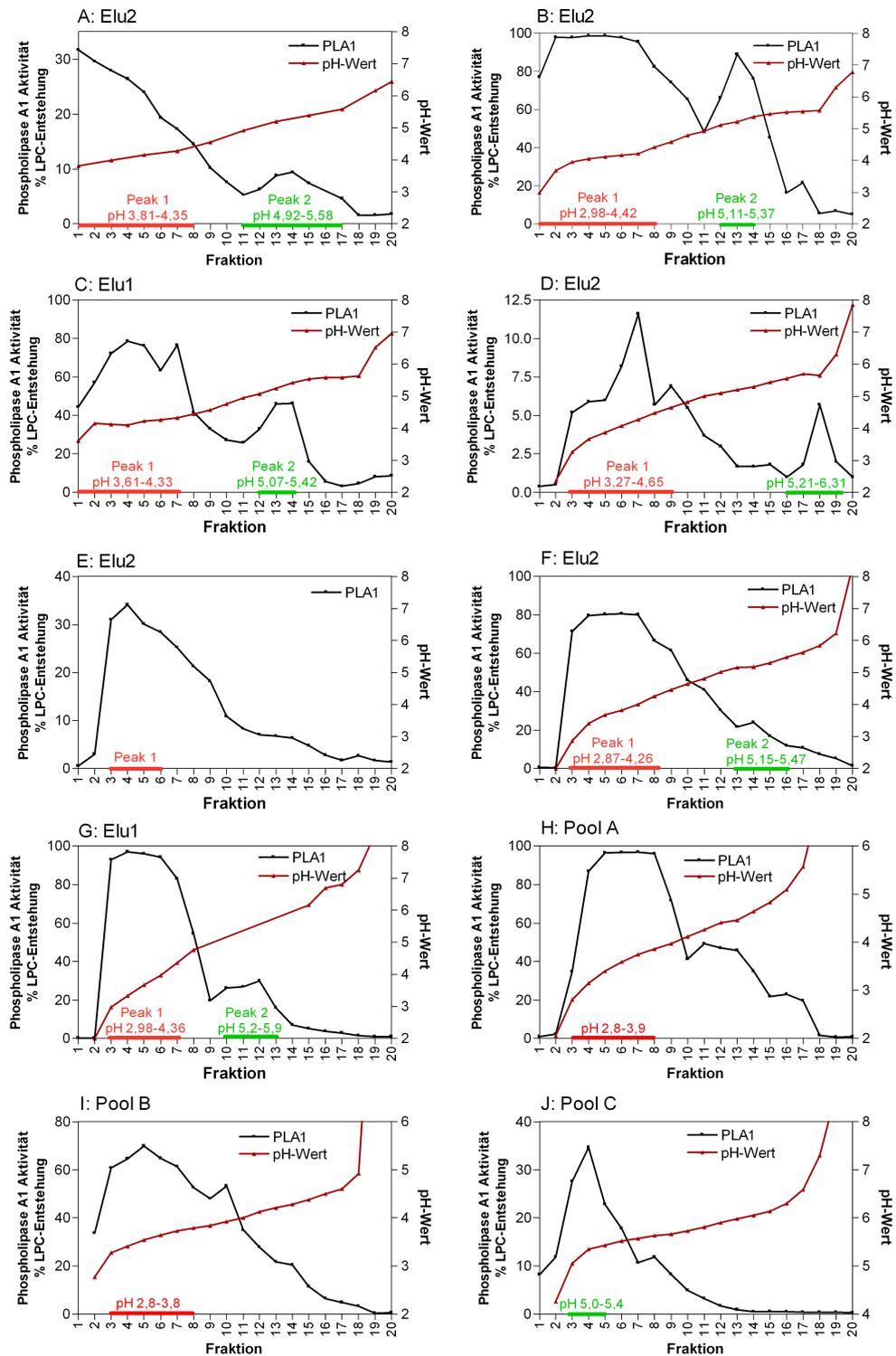
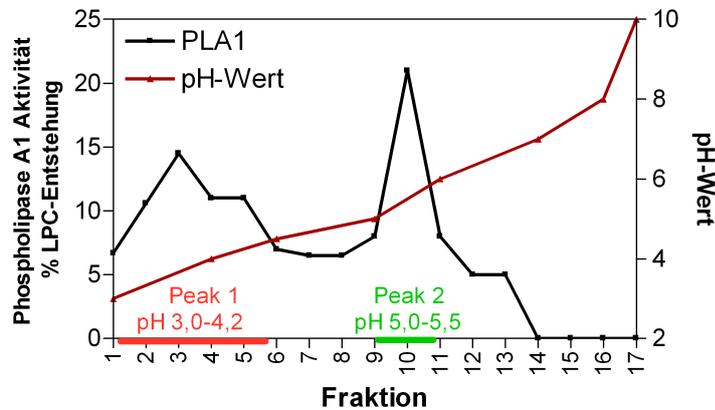


Abbildung 3.3: PLA<sub>1</sub>-Aktivität und pH-Werte der Fraktionen aus den Isoelektrischen Fokussierungen. *Elu1* und *Elu2*: 1. und 2. Elutionsfraktion aus Con A-Batchverfahren; *PoolA*: Vereinigte saure Peaks (pH < 4,4) der *Elu2*-Fraktionen; *PoolB*: Vereinigte saure Peaks (pH < 4,4) der *Elu2*-Fraktionen; *PoolC*: Vereinigte Peaks, die bei pH 5,2-6 fokussierten.



**Abbildung 3.4: IEF einer delipidierten Lysosomenpräparation.**  $PLA_1$ -Aktivität und pH-Werte der Fraktionen nach Fokussierung. Das hier erhaltene Aktivitätsmuster gleicht jenen, die bei IEF von RAW B-Zellüberständen erhalten wurden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die  $PLA_1$ -Aktivität in Lysosomen und Zellkulturüberständen von demselben Enzym verursacht wird.

und 5-6 eingesetzt (Abbildung 3.3D-G). Die Grafik D zeigt einen Probelauf mit diesen Ampholyten und einem kleinen Teil der  $PLA_1$ -Probe. Die Aktivitätskurve steigt hier erst in Fraktion 3 steil an, es läuft keine Aktivität mehr in die Elektrode.

Am Anschluss an die Fokussierungsläufe A-G wurden die Fraktionen wie folgt vereinigt („Pools“ gebildet):

**Pool A** : Die sauren ersten Peaks (pH-Bereich 3-4,4) der Elu2-Fraktionen.

**Pool B** : Die sauren ersten Peaks (pH-Bereich 3-4,4) der Elu1-Fraktionen.

**Pool C** : Die weniger sauren zweiten Peaks (pH-Bereich 5,2-6)

Diese Pools wurden einer Refokussierung unterworfen (Abbildung 3.3 H-J). Sowohl in Pool A als auch in Pool B findet sich die höchste Aktivität in den Fraktionen 3-8, welche einen pH-Bereich von 2,8-3,8 aufspannen. In beiden Proben haben die Aktivitätspeaks jedoch breite Schultern, in Pool A ist auch bei pH 5 noch eine deutliche  $PLA_1$ -Aktivität messbar. Im Gegensatz dazu bildet sich in Pool C ein schmalerer Peak, dessen Höhepunkt bei pH 5,35 liegt.

Die spezifischen Aktivitäten konnten hier nicht mehr ausgerechnet werden, da hohe Ampholyt-Konzentrationen in den Proben die Proteinbestimmung nach allen gängigen Methoden (BCA, Lowry, Bradford) stören. Zudem ließen sich die Ampholyte bei Dialyse nur unvollständig wieder entfernen.

Zum Vergleich wurde auch eine Lysosomenpräparation der IEF unterzogen. Das Ergebnis in Abbildung 3.4 verdeutlicht, dass auch bei der Fokussierung von Lyso-

somenpräparationen zwei Aktivitätspeaks in entsprechenden pH-Bereichen erhalten werden. Dies zeigt, dass die saure PLA<sub>1</sub> aus den Zellkulturüberständen identisch mit derjenigen ist, welche aus Lysosomenpräparationen gewonnen wird.

### 3.1.3.4 Affinitätsbindung

Aus den Vortests war klar geworden, dass konventionelle Methoden zur Proteinreinigung der PLA<sub>1</sub> nicht geeignet waren. Es bedurfte also der Entwicklung einer spezifischen Methode, wie sie die Liganden-Affinitätschromatographie darstellt.

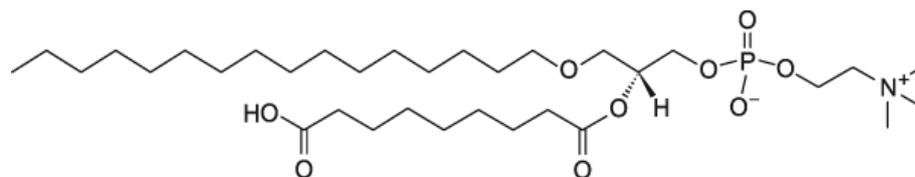
Als Liganden wurden die Substratanaloga 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine und Rosenthals Inhibitor gewählt. Ersteres Lipid enthält an der *sn*-1 Position eine Etherbindung. Die FS an der *sn*-2 Position ist ein Carboxyoctanoyl-Rest, dessen Carboxylgruppe am C-9 Atom sitzt und daher gut für die Kopplung an eine Matrix mit freien Aminogruppen, wie EAH-Sepharose, geeignet ist. Die Struktur des Liganden ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Rosenthals Inhibitor ist ein 1960 von A.F. Rosenthal und R.P. Geyer synthetisierter Inhibitor für Phospholipase A [179]. Er wurde bereits von einer anderen Gruppe als Affinitätsligand für die Reinigung von PLA<sub>2</sub>en aus *Entamoeba histolytica* und verschiedenen Schlangen-, Echsen- und Insekten-Toxinen genutzt [229].

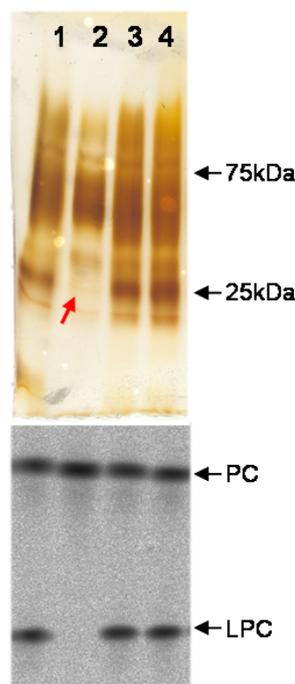
Die Liganden wurden mittels der Carbodiimid-Methode an EAH- bzw. ECH-Sepharose gekoppelt (Einzelheiten siehe Methoden-Teil auf Seite 42).

**Vortest: PLA<sub>1</sub>-Bindungsvermögen der Affinitätsmatrices** Anschließend wurden die PC- und Rosenthal-Sepharose im Batch-Test auf ihre Fähigkeit untersucht, PLA<sub>1</sub> zu binden. Die Matrices wurden mit einer PLA<sub>1</sub>-Fraktion aus den IEF-Läufen versetzt und nach 10-minütiger Inkubation die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in den Überständen getestet. Die Proteine wurden mittels Acetonfällung pelletiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Das Ergebnis für den Vorversuch mit Fraktion 3, Pool A, aus der IEF ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Die Spuren 1 und 3 zeigen Kontrollexperimente. Hier wurde die PLA<sub>1</sub>-Fraktion mit



**Abbildung 3.5:** 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine Der Ligand, der für die Affinitätsreinigung von PLA<sub>1</sub> an EAH-Sepharose gekoppelt wurde.



**Abbildung 3.6: Die lysosomale  $PLA_1$  bindet an PC-Sepharose** Die gekoppelten Matrizes wurden auf ihre Fähigkeit getestet,  $PLA_1$  zu binden. Dafür wurde das Affinitätsmaterial mit der Probe 3A aus der IEF versetzt, kurz inkubiert und der Überstand abgenommen. Als Kontrolle dienten ungekoppelte EAH- und ECH-Sepharose. Die Überstände wurden auf  $PLA_1$ -Aktivität getestet und über SDS-PAGE aufgetrennt. Oben: SDS-PAGE der Überstände: 1. ungekoppelte EAH-Sepharose; 2. gekoppelte EAH-Sepharose (PC); 3. ungekoppelte ECH-Sepharose; 4. gekoppelte ECH-Sepharose (Rosenthal). In Spur 2 ist eine Proteinbande verloren gegangen (roter Pfeil). Unten: Aktivitätstest der Überstände (HPTLC) entsprechend des Gelauftrags. PC: ungeschnittenes PC-Substrat; LPC: Lyso-PC (Produkt der  $PLA_1$ ).

ungekoppelter (ligandenfreier) EAH- bzw. ECH-Sepharose inkubiert. Diese Ansätze sollen Aufschluss über mögliche unspezifische Bindung an das Material geben. In Spur 2 wurde die Probe an PC-Sepharose gebunden, in Spur 4 an Rosenthal-Sepharose. Der Aktivitätstest (untere Abbildung in 3.6) zeigt, dass in Spur 2, im Gegensatz zu den anderen Ansätzen, das Produkt Lyso-PC (LPC) nicht mehr gebildet wird. Nach Inkubation mit PC-Sepharose geht die  $PLA_1$ -Aktivität im Überstand also verloren. Beim Vergleich der Spuren 1 und 2 im SDS-PAGE fällt auf, dass in Spur 2 eine Proteinbande fehlt, welche in Spur 1 noch vorhanden ist (roter Pfeil). Diese liegt bei einem Molekulargewicht von etwa 28-30 kDa.

In weiteren Experimenten zeigte sich, dass dieser Effekt einer Sättigung unterliegt, wenn  $PLA_1$ -Probe im Überschuss auf das Affinitätsmaterial gegeben wird. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sowohl die  $PLA_1$ -Aktivität aus der Probe, als auch die Proteinbande aus dem Muster verloren gehen, weil die entsprechenden Proteine an die PC-Sepharose gebunden haben. Dabei ist nicht sicher, ob die verschwindende Proteinbande auch für die Aktivität verantwortlich ist.

Die Rosenthal-Sepharose scheint weder die  $PLA_1$ , noch offensichtliche andere Proteine zu binden, da die Aktivität im Überstand verbleibt und im Proteinmuster zwischen den Spuren 3 und 4 keine Veränderungen auffallen (Abbildung 3.6).

Im Folgenden wurde versucht, die an die PC-Sepharose gebundenen Proteine zu

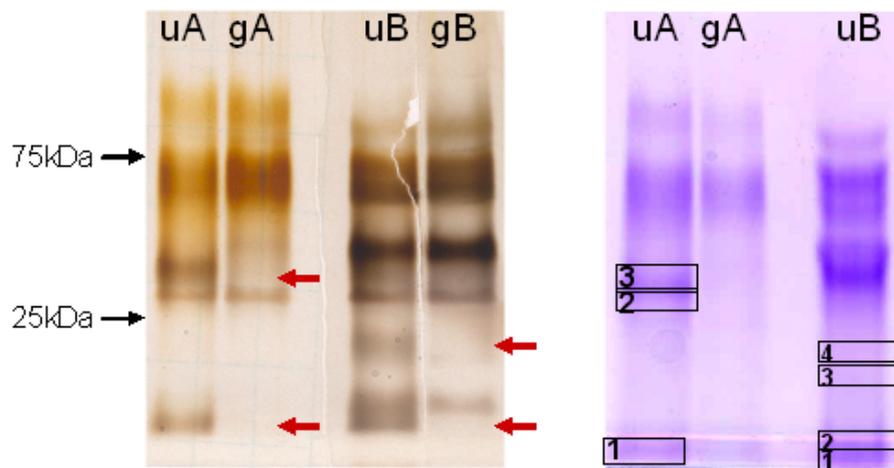
eluieren. Die Eluate wurden auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität getestet (sofern sie native Bedingungen boten) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Folgende Elutionsbedingungen wurden nacheinander angewendet:

1. pH-Wert-Erhöpfung mittels 100 mM Tris-HCl, pH 8,6: Da die PLA<sub>1</sub> im neutralen und alkalischen pH-Bereich komplett inaktiv ist, wäre es denkbar, dass unter diesen Bedingungen ihre Affinität zum Substrat vermindert wird.
2. Erhöhung der Salzkonzentration auf bis zu 1,5 M NaCl in Tris-HCl, pH 8,6, um ionische Wechselwirkungen des Enzyms mit dem Säulenmaterial zu unterbinden.
3. Denaturierung mit SDS: Die PC-Sepharose wurde in 5 mM SDS erwärmt.
4. Denaturierung mit Harnstoff: 6 mM Urea sollten die gebundenen Proteine komplett denaturieren.

Unter keiner der genannten Bedingungen ließ sich Protein von der Säule eluieren. Erst durch Kochen der Sepharose in SDS-PAGE Probenpuffer (mit DTT) konnten im Silbergel feine Banden wiedergefunden werden. Bei den Elu1-Proben aus der IEF eluierten zwei Proteinbanden, eine bei ca. 34 kDa, die andere bei 14 kDa. Bei den C-Proben der IEF (zweiter Peak) konnten wir Banden in der Höhe von 50 kDa und 20 kDa von der Affinitätsmatrix ablösen. Da diese Mengen jedoch zu gering für eine Analyse mit dem Massenspektrometer waren und nur geringe Mengen an Affinitätsmaterial zur Verfügung standen, entschieden wir uns dazu, jene Banden aus der Kontrollspur auszuschneiden, welche nach Affinitätsreinigung im Proteinmuster fehlten.

### **3.1.3.5 Präparation der Proben für die Massenspektrometrie**

Die Fraktionen 3-5 aus der Fokussierung von Pool A wurden vereint. Eine Hälfte wurde für 20 min mit EAH-Sepharose inkubiert, die andere Hälfte mit PC-Sepharose. Ein anschließender PLA<sub>1</sub>-Aktivitätstest stellte sicher, dass die Aktivität komplett an die PC-Sepharose gebunden hatte. Die Proteine wurden mit Aceton aus den Überständen ausgefällt und parallel auf zwei Criterion-Gelen (Biorad) aufgetrennt. Eines der Gele wurde mit Silber gefärbt, das andere mit Coomassie (Imperial Stain, Pierce). Die parallel durchgeführte Silberfärbung sollte zur besseren Sichtbarmachung des Bandenmusters dienen. Mit der Fraktion 5 aus der Fokussierung von Pool B wurde ähnlich verfahren. Hier wurde jedoch nur der Teil der Probe an PC-Sepharose gebunden, welcher mit Silber gefärbt werden sollte. Für die Coomassiefärbung wurde die Probe nur mit EAH-Sepharose inkubiert. Abbildung 3.7 zeigt die entsprechenden Gele.

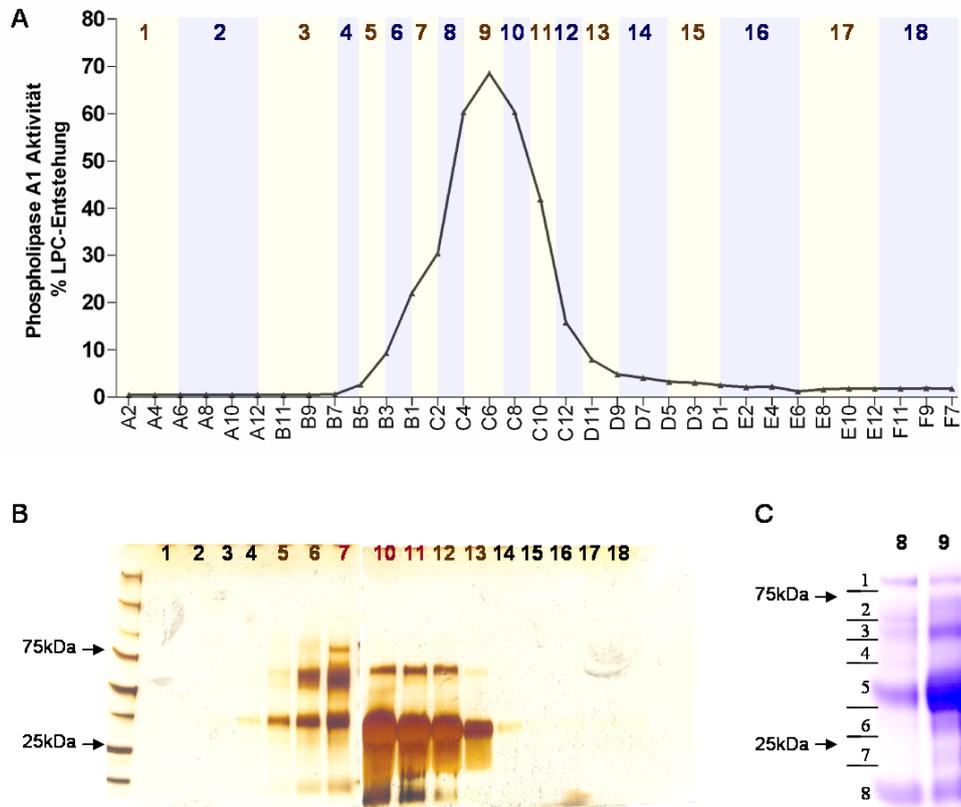


**Abbildung 3.7: Proben für die Massenspektrometrie aus Affinitäts-Batchverfahren.** Fraktionen 3-5 aus Pool A und Fraktion 5 aus Pool B der IEF wurden mit gekoppelter(PC-) Sepharose (gA, gB) und ungekoppelter EAH-Sepharose (uA) inkubiert. Die Batch-Überstände wurden auf PLA<sub>1</sub>-Aktivität untersucht, um zu kontrollieren, dass die Aktivität in gA und gB komplett an die PC-Sepharose gebunden hatte. In den Überständen aus gA und gB war keine Aktivität mehr messbar, in uA und uB hingegen war sie noch komplett vorhanden (im Vergleich mit dem Auftrag). Mittels Aceton wurden die Proteine aus den Überständen ausgefällt, in Probenpuffer aufgenommen und die Proben parallel auf zwei Criterion-Gelen aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Silber gefärbt (links), das andere mit Coomassie (rechts). Die Bandenmuster auf dem Silbergel der „g“ und „u“-Proben wurden miteinander verglichen und die in den „g“-Spuren fehlenden Banden entsprechend auf dem mit Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten (hier durch die bezifferten Kästchen dargestellt). Die Gelstückchen wurden zur Identifikation der in ihnen vorhandenen Proteine der Massenspektrometrie zugeführt.

Ein Vergleich des Proteinbandenmusters der uA- und gA-Spuren einerseits und der uB- und gB-Spuren andererseits zeigt, dass auch hier in den g-Proben je zwei Proteinbanden fehlen. Bei der A-Fraktion in den Höhen von ca. 32 kDa und 13 kDa, bei der B-Fraktion in der Höhe von 20 kDa und ebenfalls bei 13 kDa (Abbildung 3.7). Diese Proteine haben an die PC-Sepharose gebunden. Die entsprechenden Banden wurden aus den u-Spuren des Coomassie-gefärbten Geles zur Massenanalyse ausgeschnitten.

### 3.1.3.6 Gelfiltration

Die Fokussierungsfraction 9, Pool A, wurde einer Größenausschlusschromatographie unterworfen. Im Anhang dieser Arbeit ist das Chromatogramm einzusehen. Die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in den erhaltenen Fraktionen wurde bestimmt und die Proben entsprechend vereinigt. Abbildung 3.8A zeigt das PLA<sub>1</sub>-Aktivitätsprofil, die farbliche Unterlegung verdeutlicht die gebildeten Pools. Gleiche Volumina der Pools wurden zur Silberfärbung über SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.8B). Die Proteine in den aktivsten Pools, 8 und 9, wurden mit Aceton ausgefällt und komplett auf ein Gel zur Coomassiefärbung aufgetragen. Die Gelspur der Fraktion 8 wurde wie in Abbildung 3.8C



**Abbildung 3.8: Proben für die Massenspektrometrie aus Gelfiltration** Die Probe 9A aus IEF wurde einer Gelfiltration unterworfen. **A:** PLA<sub>1</sub>-Aktivität in den erhaltenen Fraktionen. Die farbliche Unterlegung verdeutlicht, wie die Fraktionen im Anschluss an den Aktivitätstest vereinigt wurden. **B:** SDS-PAGE und Silberfärbung der Pools außer 8 und 9. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen. **C:** SDS-PAGE und Coomassiefärbung der Pools 8 und 9. Die Spur 8 wurde wie eingezeichnet in acht Gelstücke geschnitten, um diese einer Tandem-Massenspektrometrie zu unterziehen.

eingezeichnet in acht Stücke geschnitten und die Stücke 2-8 der massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Es wurde versucht, nach Auftrennung von Fraktion 7 und 10 im SDS-PAGE, PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus ungefärbten Gelstückchen zu renaturieren, um festzustellen, auf welcher Höhe die Aktivität im Gel lief. Leider konnte keine Aktivität wiedergewonnen werden.

### 3. ERGEBNISSE

**Tabelle 3.4:** Proteine in den Banden aus *Elu1* und *Elu2*, welche an PC-Sepharose gebunden haben.

Proteinname	Accession No.	Protein MW	Lokalisation
<b>B1 (13 kDa)</b>			
Cathepsin B Preproprotein (Maus)	gi 6681079	37256	lysosomal
<b>Phospholipase D family, member 4 (Maus)</b>	gi 30725764	56118	?
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (Maus)	gi 476562	108932	PM
CD44 (Maus)	gi 53674	50468	PM
Prosaposin (Maus)	gi 557967	61442	lysosomal
Glutathione S-transferase 26 kDa (GST 26) (SJ26)	gi 121697	25482	
<b>B3 (18 kDa)</b>			
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor	gi 266418	109195	PM
<b>Phospholipase D family, member 4 (Maus)</b>	gi 30725764	56118	?
Mouse Preprocathepsin B	gi 309202	37340	lysosomal
CD44 (Maus)	gi 53676	54020	PM
Interleukin 6 receptor [Mus musculus]	gi 52693	50508	PM
<b>B4 (20 kDa)</b>			
<b>Phospholipase D family, member 4 (Maus)</b>	gi 30725764	56118	?
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (Maus)	gi 476562	108932	PM
Cathepsin B (Maus)	gi 3929817	20910	lysosomal
CD44 (Maus)	gi 53674	50468	PM
Cathepsin Z Preproprotein (Maus)	gi 11968166	33974	lysosomal
<b>A1 (13 kDa)</b>			
Prosaposin	gi 557967	61442	lysosomal
Preprocathepsin B (Maus)	gi 309202	37340	lysosomal
<b>Phospholipase D family, member 4 (Maus)</b>	gi 30725764	56118	?
Cathepsin Z (Maus)	gi 11066226	34153	lysosomal
<b>A3 (32 kDa)</b>			
Preprocathepsin B (Maus)	gi 309202	37340	lysosomal
<b>Phospholipase D family, member 4 (Maus)</b>	gi 30725764	56118	?
Cathepsin B	gi 1311050	28396	lysosomal
Cathepsin Z Preproprotein (Maus)	gi 11968166	33974	lysosomal
Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (Maus)	gi 6753520	24436	Sz
Cathepsin O [Mus musculus]	gi 29244082	34701	lysosomal
Similar to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha isoform 4	gi 94375513	29181	PM

Lokalisation angegeben nach *www.ncbi.nlm.nih.gov* **PM:** Plasmamembran; **Sz:** Sezerniert.

### 3.1.3.7 Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS)

Die massenspektrometrische Analyse der Gelstücke wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Eberhard Krause am FMP<sup>1</sup>, Berlin Buch, durchgeführt. Zur Verwendung kam die Methode der LC/MS/MS Tandem-Massenspektrometrie. Die Proteine werden hier durch tryptischen Verdau in Peptide zerlegt, welche vor der Massenanalyse mittels Flüssigkeitschromatographie<sup>2</sup> aufgetrennt werden. Im Anschluss erfolgt eine Tandem-Massenspektrometrie, durch welche die Aminosäuresequenzen der Peptide ermittelt werden können. Eine nachfolgende Datenbankanalyse gibt darüber Aufschluss, zu welchen Proteinen die gefundenen Peptide gehören.

In den Tabellen 3.4 und 3.5 sind die ermittelten Proteine aufgeschlüsselt.

**Tabelle 3.5:** *Proteine in Fraktion 8 der Gelfiltration*

Protein Name	Accession Nr.	Protein MW	Lokalisation
Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a	gi 114431242	49825	lysosomal?
Activated leukocyte cell adhesion molecule CD166	gi 2982192	65120	PM
Arylsulfatase A precursor (ASA) (Cerebrosidase-sulfatase)	gi 1703420	53741	lysosomal
Arylsulfatase B	gi 78042476	59609	lysosomal
Aspartylglucosaminidase	gi 54292135	36998	lysosomal
Cathepsin B preproprotein	gi 6681079	37296	lysosomal
Cathepsin Z preproprotein	gi 11968166	33974	lysosomal
Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1	gi 6753520	24436	lysosomal?
Di-N-Acetylchitobiase Precursor	gi 67460414	41268	lysosomal
Dipeptidyl-peptidase 2 precursor	gi 13626390	56233	lysosomal
Dipeptidylpeptidase 7	gi 31981425	56217	lysosomal
Galactosidase, alpha	gi 7305089	47813	lysosomal/Sz
Galactosidase, beta 1	gi 22137334	73074	lysosomal
Gamma-glutamyl hydrolase precursor	gi 3831564	35322	lysosomal
Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	gi 29789239	61136	lysosomal
Iduronate 2-sulfatase precursor	gi 116242520	62132	lysosomal
Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	gi 126381	45618	lysosomal
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor	gi 266418	109194	Sz/PM
N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase)	gi 31543697	56686	lysosomal
Palmitoyl-protein thioesterase 2	gi 9506985	34344	lysosomal
Phospholipase D family, member 4	gi 30725764	56118	?
Hypothetical Protein LOC71772	gi 20072905	66624	lysosomal
Sialic acid acylesterase	gi 13938040	60739	lysosomal
mKIAA0315	gi 33438162	206027	?

Lokalisation angegeben nach *www.ncbi.nlm.nih.gov* und [204–206]. **PM:** Plasmamembran; **Sz:** Sezerniert; **lysosomal?:** Wahrscheinlich lysosomal.

<sup>1</sup>Leibnitz Institut für Molekulare Pharmakologie

<sup>2</sup>LC steht für *engl.: liquid chromatography*

### 3. ERGEBNISSE

```

74.5% identity in 502 residues overlap; Score: 1879.0; Gap frequency: 2.4%

Human,      4 PLWKAAVAAPTWPSCMPPRRPVDREACTLQVLGALAVLWLGCSVALICLLWQVPRPPTWGQV
Mouse,     13 PLQTAVEVSDWPCST----SHDPHSGLGHVLCMLAVLGLSSVTLLIFLWQGATSFTSHRM
      * *      * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     64 QPKDVPRSWEHCSSPAWEPLEAEARQQEDSCQLVLVESIPQDLPSAAGSPSAQPLGQAWL
Mouse,     69 FPEVFP-SW-----SWETLKGDAEQNNWSCQLILVESIPEDLPFAAGSPTAQPLAQAWL
      * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     124 QLDDTAQESVHVASYYSWLTGPDIGVNDSSSQLGEALLQKQLQLLGRNISLAVATSSPTL
Mouse,     122 QLDDTARESVHIASYYWSLTGLDIGVNDSSSRQGEALLQKFOQLLRNISVVVAATHSPTL
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     184 ARTSTD LQVLAARGAHVRQVPMGRRLTRGVLHSEKFWVVDGRHIYMGSANMDWRSLTQVKEL
Mouse,     182 ARTSTD LQVLAARGAHVRQVPMGRRLTRGVLHSEKFWVVDGRHIYMGSANMDWRSLTQVKEL
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     244 GAVIYNCSHLAQDLKRTFQTYVWLVGPKAVLPKTPQNFSSHFNRFPFHGLFDGVPTTA
Mouse,     242 GAVIYNCSNLAQDLKRTFQTYVWLVGTPQAVLPKTPQNFSSHINRFHPLRGPFDCVPTTA
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     304 YFSASPALCPQGRTRDLEALLAVMCSAQEFIIYASVMEYFPTTRF SHPPRYWVPLDNLRL
Mouse,     302 YFSASPPLCPHGRTRDLDVILGVMEGARQFIYVSVMEYFPTTRFTHARYWVPLDNLRL
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     364 AAAFGKCVRVRLLVGCCINTDPTMFPYLRLQALSNPAANVSDVKVFIWVPGNHSNI PF
Mouse,     362 AAAINRCVHVRLLVSCWFNTDPTMFPAYLRSLQAESNPSAGISVDVKVFIWVPGNHSNI PF
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     424 SRVNHSEKFMVTEKAAYIGTSNWSEDFYSSTAGVGLVVTQ-SPGAQPAGATVQEQRLQLE
Mouse,     422 SRVNHSEKFMVTDKTAAYVGTSNWSEDFYSHTAGVGLIVSQKTPRAQPGRTTVQEQRLQLE
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Human,     483 RDWSSRYAVGLDGQAPGQDCVW
Mouse,     482 RDWSSHYAMDLDRQVPSQDCVW
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 3.9: Proteinsequenz der Phospholipase D, family member 4. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der PLD4-Sequenzen in Mensch und Maus. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte wurden in der Massenanalyse detektiert. (Programm: SIM Alignment([www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools)))

Alle offensichtlichen Kontaminanten wurden aus den Listen gestrichen. Dazu gehören sowohl die diversen Keratinpeptide, welche bei der Präparation durch den Menschen unabsichtlich in die Probe eingebracht werden, als auch bewusst hinzugefügte Fremdproteine wie Trypsin und Concanavalin A-Lektin. Die kompletten Listen der Massenanalysen sind im Anhang auf Seite 145 einzusehen.

Die Tabelle 3.4 listet auf, welche Proteine in jenen Banden gefunden wurden, welche nach Inkubation mit PC-Sepharose aus dem Proteinmuster verschwunden waren (A1, A3, B1, B3, B4). Einige der Proteine sind bekannte lysosomale Hydrolasen (Cathepsin B, O und Z) oder lysosomale Aktivatorproteine, wie das Lipidtransferprotein Prosaposin. Einige der gefundenen Proteine sind plasmamembranständig oder werden sezerniert. Eines der Proteine (fett gedruckt) findet sich in allen Gelbanden wieder: Phospholipase D family, member 4 (PLD4). Zu diesem Protein gibt es in den Datenbanken noch keine weiterführenden Informationen. Seine Proteinsequenz wurde aus in cDNA-Banken gefundenen Nukleotidsequenzen abgeleitet. Das Genprodukt selber wird



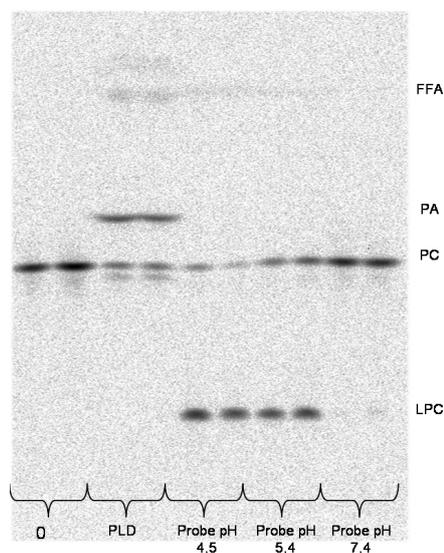
Identifikation mit einem Wert von  $p = 0,043$  leicht unter der Signifikanzgrenze (0,05), der Genlokus weist jedoch Homologien zu einer PLB aus *Dictyostelium discoideum* (*D. discoideum*) [141] auf. Eine Funktion für dieses Genprodukt wurde ebenfalls noch nicht beschrieben. Seine Homologie zur PLB lässt jedoch vermuten, dass es sich auch hier um eine Phospholipase handeln könnte. Aus diesem Grund soll auch diese Sequenz weiter untersucht werden.

Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen die gefundenen Proteinsequenzen im Vergleich zwischen Mensch und Maus.

#### 3.1.3.8 PLD-Analyse der Proben mit PL A<sub>1</sub>-Aktivität

Es wurde im Folgenden untersucht, ob die Proben mit PLA<sub>1</sub>-Aktivität auch PLD-Aktivität enthalten. Getestet wurde jene Fraktion aus Pool A und B der Fokussierung, welche für die Affinitätsgele verwendet wurden. Diese Versuche wurden bei verschiedenen pH-Werten (pH 4,5; 5,4; 7,4), in An- und Abwesenheit von Kalzium und/oder Diethylether, und/oder Ethanol durchgeführt. Viele der bekannten PLDs werden durch Diethylether im Assay aktiviert oder bevorzugen Alkohole gegenüber Wasser als Nukleophile [130, 142]. Um etwaige PLD-Aktivitäten zu erfassen, wurden möglichst viele verschiedene Versuchsbedingungen getestet, unter welchen eine PLD aktiv sein könnte. Als Lipid wurde radioaktiv-markiertes PC eingesetzt, aber auch markiertes PI, PS und PE wurde für PLD-Aktivitätsmessungen herangezogen. Alle bisher bekannten eukaryontischen PLDs schneiden PC [232]. Zur Kontrolle wurden die Lipide mit kommerziell erhältlicher PLD aus *Brassica oleracea* (Weißkohl) verdaut und dieser Ansatz parallel auf der HPTLC-Platte entwickelt. Abbildung 3.11 zeigt ein Beispiel dieser Versuche. Aufgetragen wurde ungeschnittenes, mit PLD und mit unseren Proben behandeltes radioaktiv-markiertes PC-Substrat. Nach PLD-Inkubation wird oberhalb der Substratbande eine weitere Bande sichtbar, welche dem PLD-Produkt PA entspricht. Diese Bande ist nicht in jenen Fraktionen vorhanden, welche mit Probe behandelt wurden. Das bedeutet, dass sich in den PLA<sub>1</sub>-aktiven Proben keine PLD-Aktivität befindet.

Auch unter keiner anderen der unterschiedlichen Versuchsbedingungen konnte PLD-Aktivität in unseren PLD4-haltigen Proben gemessen werden. Daraus folgt, dass PLD4 keine PLD-Aktivität besitzt.



**Abbildung 3.11:** *PLA<sub>1</sub>-enthaltende Proben zeigen keine PLD-Aktivität*  
 Die sauren Proben aus den IEFs wurden unter einer großen Zahl von verschiedenen Versuchsbedingungen auf PLD-Aktivität untersucht. Diese Abbildung zeigt ein repräsentatives Beispiel aller Ergebnisse (Duplikate). In „0“ wurde das Substrat nur in Puffer inkubiert. In „PLD“ mit dem entsprechenden Enzym aus Kohl. Im weiteren sieht man die Ergebnisse, nachdem das Substrat bei unterschiedlichen pH-Werten mit Probe 6, Pool A, versetzt wurde.

### 3.1.3.9 Computerunterstützte Untersuchungen der gefundenen Sequenzen

Auf der Internetseite [www.expasy.org](http://www.expasy.org)<sup>3</sup> werden Softwarepakete zur Verfügung gestellt, mit deren Hilfe man Eigenschaften von Proteinsequenzen vorhersagen kann. Folgende Programme wurden verwendet, um die PLD4 und LOC71772 bioinformatisch zu analysieren:

**ComputePI/MW** : Berechnet theoretischen pI und Molekulargewicht.

**NetNGlyc** : Sagt mögliche Glykosylierungsstellen voraus.

**InterPro Scan** : Durchsucht mit der eingegebenen Sequenz verschiedene Datenbanken auf Proteinfamilien bzw. konservierte Domänen hin.

**WoLF PSORT und TargetP1.1** : Machen Vorhersagen zur wahrscheinlichen subzellulären Lokalisation.

Die murine PLD4-Sequenz (PLD4) hat einen theoretischen pI von 6,83 und eine Masse von ca. 56 100 kDa. Es gibt 7 mögliche Glykosylierungsstellen. Die Sequenz enthält die konservierte Domäne PLDc (cd00138), welche in Phospholipasen D, aber auch bei der Cardiolipin- oder Serin-Synthase zu finden ist. Der Sequenzvergleich zwischen muriner und humaner PLD4 (hPLD4) zeigt eine Homologie von 74,5% zwischen beiden Proteinen (siehe Abbildung 3.9).

LOC71772 enthält die konservierte Laminin A-Domäne. Proteine mit dieser Domäne gehören zu einer Familie von intrazellulären Phospholipasen. Ein Familienmitglied

<sup>3</sup>ExPASy: Expert Protein Analysis System

### 3. ERGEBNISSE

**Tabelle 3.6:** Mit dem Programm *TargetP1.1* vorhergesagte Lokalisation der gefundenen Proteine

	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
mPLD4	0.060	0.489	0.705	-	4	-
hPLD4	0.227	0.872	0.058	S	2	46
LOC71772	0.604	0.608	0.026	S	5	46
LOC196463	0.150	0.932	0.018	S	2	41

*mTP*: mitochondrial targeting peptide (Wahrscheinlichkeitswert für mitochondriale Lokalisation, angegeben von 0-1); *SP*: secretory pathway signal peptide (Wahrscheinlichkeitswert für sekretorischen Weg, angegeben von 0-1); *Loc*: Lokalisation; *S*: Secretory Pathway; *RC*: Reliability class (Skala von 1-5, je geringer der Wert, desto sicherer die Vorhersage); *TPlen*: presequence length (Vorhersage über Länge eines möglichen Signalpeptids); *mPLD4*: mouse *PLD4*; *hPLD4*: human *PLD4*; *LOC71772*: mouse; *LOC196463*: human

dieser Proteine ist die bereits erwähnte PLB aus *D. discoideum* [141]. Der theoretische pI dieser Sequenz beträgt 5,77, das Molekulargewicht ca. 66 300 kDa. Es werden 4 mögliche Glykosylierungsstellen gefunden. Die Sequenzhomologie zwischen murinem und humanem Protein beträgt 82,1% (Abbildung 3.10).

Bezüglich der Lokalisation der Proteine ergibt die Analyse mit *TargetP1.1* das in Tabelle 3.6 wiedergegebene Bild. Es werden die Wahrscheinlichkeitswerte für das Vorhandensein eines mitochondrialen Lokalisationspeptids, eines Signalpeptids für den sekretorischen Stoffwechselweg oder für eine andere Lokalisation angegeben<sup>4</sup>. Die Skala reicht hier von 0 (nicht vorhanden) bis 1 (sicher vorhanden). Unter „Loc“ wird die wahrscheinlichste Lokalisation angegeben, wobei „S“ für den sekretorischen Stoffwechselweg steht. Der RC-Wert gibt die Zuverlässigkeit der Vorhersage an. Die Skala reicht hier von 1 (sehr sicher) bis 5 (sehr unsicher). TPlen gibt die Länge des wahrscheinlichen Signalpeptids für den sekretorischen Stoffwechselweg an.

Lysosomale Proteine gehören dem sekretorischen Stoffwechselweg an. Dementsprechend erwartet man das Vorhandensein eines Signalpeptids in ihrer Sequenz.

Es fällt auf, dass sich die Vorhersage für die murinen Proteine recht deutlich von der für die humanen Varianten unterscheiden. So beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass die mPLD4 ein Signalpeptid enthält, nur etwa 49%, bei hPLD4 sind es jedoch 87%.

<sup>4</sup>Damit neu synthetisierte Proteine ihren Bestimmungsort innerhalb der Zelle erreichen, sind sie mit *Adressen* für ihre Zielsteuerung versehen, welche zumeist aus spezifischen Aminosäuresequenzmotiven bestehen. Proteine, welche ein N-terminales Signalpeptid für den sekretorischen Stoffwechselweg enthalten, werden kotranslational in das ER geschleust und von dort aus weiter sortiert. Proteine mit diesem Signalpeptid gelangen ins ER, den GA oder die Plasmamembran, werden sezerniert oder in das **Lysosom** transportiert. Für die mitochondriale Lokalisation dient ebenfalls eine spezifische Zielsequenz. In der Tabelle wird angegeben, wie wahrscheinlich es ist, dass das entsprechende Protein eine dieser Adress-Sequenzen enthält. Proteine, welche keine dieser beiden Sequenzmotive aufweisen (in der Tabelle als „other“ bewertet), verbleiben im Zytosol, gelangen in den Nukleus oder werden in Peroxisomen transportiert.

**Tabelle 3.7:** *Mit WoLF PSORT vorhergesagte Lokalisation der gefundenen Proteine. Angegeben sind relative Wahrscheinlichkeiten.*

Lokalisation	mPLD4	hPLD4	LOC71772	LOC196463
Zytosol	12,5	-	2,5	-
Nukleus	8,5	2,0	2,5	-
Peroxisom	3,0	-	-	4,0
Plasmamembran	2,5	-	-	-
Extrazellulär	2,5	5,0	8,0	11,0
Lysosom	-	5,0	4,0	8,0
ER	-	3,0	-	-
GA	-	3,0	-	6,0
Mitochondrion	-	12,0	13,0	-

Dies ist überraschend, da aufgrund der hohen Sequenzhomologie (74,5%) erwartet werden kann, dass beide Proteine in ihren jeweiligen Organismen dieselbe Funktion erfüllen und damit dieselbe Lokalisierung innerhalb der Zelle erfahren. Der RC-Wert für mPLD4 ist mit „4“ relativ schlecht, die Vorhersage ist also nicht sehr zuverlässig. Der RC-Wert von „2“ für die humane Variante bietet dagegen größere Sicherheit.

Die Wahrscheinlichkeit, dass in LOC71772 (Maus) ein Signalpeptid vorhanden ist, beträgt 61%, für LOC196463 (Mensch) sind es 93%. Auch hier bietet die Vorhersage für das humane Protein mit einem RC-Wert von „2“ eine wesentlich größere Sicherheit als die Vorhersage für das murine Protein (RC-Wert 5). Die allgemeine Sequenzhomologie zwischen beiden Proteinen ist auch hier mit 82,1% sehr hoch.

Zum Vergleich wurden die Sequenzen zusätzlich mit dem bioinformatischen Programm WoLF PSORT analysiert [84, 212] (siehe Tabelle 3.7).

Auch hier erkennt man gravierende Unterschiede zwischen der Lokalisationsvorhersage für die murinen und die humanen Proteinvarianten. Bis auf mPLD4 wird für alle Proteine die Möglichkeit eingeräumt, dass sie im Lysosom vorkommen könnten.

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass LOC71772 und LOC196463 tatsächlich lysosomale Proteine noch unbekannter Funktion sind [45, 95]. Insbesondere bei dem Mausprotein LOC72772 zeigt sich hier, dass die Bioinformatik lediglich Hinweise auf die Lokalisation geben kann, jedoch noch keine sicheren Aussagen möglich sind. So wurde von WoLF PSORT für dieses Protein angegeben, dass es am wahrscheinlichsten im Mitochondrion zuhause ist.

Sprenger *et al.* haben kürzlich in einer umfassenden Untersuchung gezeigt, dass bioinformatische Vorhersagen der subzellulären Lokalisation für Proteine des sekretorischen Weges (ER, GA, Lysosomen) am kritischsten sind [212]. Insbesondere die bioinformatische Identifikation von lysosomalen Proteinen ist sehr wenig erfolgreich.

Daher muss man die hier erhaltenen Ergebnisse unter Vorsicht interpretieren.

Die Reinigung der Proteine erfolgte aus Zellkulturüberständen, welche durch Zugabe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  verstärkt lysosomale Proteine enthielten. Es ist daher zu erwarten, dass in diesen Fraktionen vor allem extrazelluläre und lysosomale Proteine gefunden werden. Dieses wird durch die Massenanalyse bestätigt, in welcher hauptsächlich lysosomale Proteine gefunden wurden. Vor diesem Hintergrund ist es sehr unwahrscheinlich, dass die PLD4s zytosolische Proteine sind, wie es insbesondere für mPLD4 bei der bioinformatischen Analyse vorhergesagt wird.

#### 3.1.3.10 Weitere Informationen zu PLD4

Die hier gefundene mPLD4 enthält zwei HKD-Motive, aufgrund derer sie der PLD Superfamilie zugeordnet wurde. Zu dieser Familie gehören auch die PLD1 und -2, welche bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, die CL- und PS-Synthasen, welche ihre Aufgabe in der Lipidbiosynthese haben, verschiedene Endonukleasen und Virenhüllenproteine. Alle Familienmitglieder scheinen Duplikate des HKD-Motivs zu besitzen. Mittels Mutations- und Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass beide HKD-Motive assoziieren, um ein katalytisch aktives Zentrum auszubilden (Stuckey1999, Xie2000a). Punktmutationen der konservierten Aminosäurereste führten zu komplettem Verlust der PLD-Aktivität.

Abgesehen von den HKD-Regionen bestehen zwischen PLD4 und den bereits bekannten PLDs keinerlei Sequenzhomologien. Im Gegensatz dazu findet man Homologien zu Proteinen aus mehr als 76 Spezies, die den Bakterien, Metazoen, Pflanzen oder Viren angehören. In Pilzen und Archaeen finden sich jedoch keine sequenzhomologen Proteine. Gut ein Drittel der Treffer finden sich im Reich der Viren. So besitzt z.B. Vaccinia Virus ein Protein, welches zu 39% mit mPLD4 identisch ist. Weitere Beispiele von Organismen mit PLD4-Homologen sind *D. discoideum* (36%), *Xenopus laevis* (46%) oder auch *Drosophila melanogaster* (38%).

Aber auch in der Maus selber finden sich homologe Proteine, wie eine mPLD3 und eine mPLD5 mit 42% und 36% Identität zu mPLD4. Die humane PLD4 ist zu 47% mit der hPLD3 und zu 35% mit der hPLD5 identisch.

Im Gegensatz zu PLD4 gibt es zu PLD3 aus Maus und Mensch einige wenige Daten. Munck *et al.* berichten von hPLD3, welche auch als Hu-K4 bekannt ist, dass dieses Protein ubiquitär als Typ 2 Transmembranprotein exprimiert wird und hauptsächlich im ER lokalisiert ist [145]. Die ersten 38 Aminosäuren sollen dabei auf die zytoplasmatische Seite hinausragen, während sich die große C-terminale Domäne samt beider

HKD-Motive auf der luminalen Seite befindet. Die Autoren fanden eine verstärkte Expression in Regionen des Vorderhirns.

Hu *et al.* [88] führten eine große vergleichende Studie durch, in welcher sie die bisher publizierten Daten zum Proteom von dem Lysosom verwandten Organellen (*lysosome related organelles*, LRO)<sup>5</sup> zusammentrugen. Insgesamt findet man hier 3290 Humanproteine, welche in einem oder mehreren der 9 LROs vorkommen. Hierin berichten sie das Vorkommen von hPLD3 in der frühen und späten Phase von Melanosomen und Neuromelanin Granula. Von den in Melanosomen enthaltenen Proteinen kennt man neben den Pigmentmelaninen in früher und später Phase zusammen rund 1400 Proteine. Melanosomen werden von den Pigmentzellen der Haut, den Melanozyten, gebildet und an die umgebenden Keratinozyten abgegeben. Neuromelanin ist ein spezielles Pigment, welches hauptsächlich in catecholaminergen Neuronen der Gehirne von Primaten zu finden ist. Als LROs teilen Melanosomen 40% ihrer Proteine mit den Lysosomen [88].

Die auch als Sam-9<sup>6</sup> bezeichnete mPLD3 wird ebenfalls vor allem im Gehirn, aber auch in anderen Geweben exprimiert. Sie soll ebenfalls auch ein Typ 2 Transmembranprotein sein. Eine Untersuchung auf PLD-Aktivität fiel negativ aus [158]

Ein weiterer Hinweis, dass PLD3 in Maus und Mensch mit Lysosomen assoziiert sein könnte, geht aus der Proteomanalyse von Sleat *et al.* hervor. Die Autoren haben M6P-markierte Proteine aus den Gehirnen dieser Spezies aufgereinigt und konnten hPLD3 und mPLD3 in ihren Fraktionen identifizieren [207]. Ein deutlicher Hinweis darauf, dass PLD3 zum Transport in Endosomen/Lysosomen vorgesehen ist.

Vaccinia Virus weist zwei homologe Proteine zu den PLD3s auf: K4L und p37, wobei die Homologie zu K4L 48% und die zu p37 21% beträgt. K4L zeichnet sich, wie andere Mitglieder der HKD-Familie, durch das Vorhandensein von zwei HKD-Motiven aus, welche für die Enzymaktivitäten der Mitglieder dieser Familie essentiell sind. Untersuchungen an diesem Protein konnten jedoch, wie auch bei Sam-9, keine PLD-Aktivität nachweisen [218].

Sowohl Hu-K4, als auch Sam-9 und K4L unterscheiden sich in einem Aspekt von anderen Mitgliedern der PLD-Superfamilie: ihr C-terminales HKD-Motiv trägt eine Punktmutation von Aspartat zu Glutamat. Die sonst übliche Sequenz HxKxxxxD ist hier also zu HxKxxxE mutiert. Es ist allerdings unklar, ob damit das Fehlen von PLD-Aktivität erklärt werden kann [158]. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wird für alle drei Proteine vermutet, dass sie von PLD-Aktivitäten unabhängige Funktionen

<sup>5</sup>[http://pir.georgetown.edu/iproxpress/organelle/organelle\\_comparison.html](http://pir.georgetown.edu/iproxpress/organelle/organelle_comparison.html)

<sup>6</sup>Schwannosoma-associated mRNA

wahrnehmen [145, 158].

Das zweite Homolog aus Vaccinia Virus, p37, ist das einzige Protein dieser Gruppe, für welches man Funktionen kennt. So weiß man, dass es bei der Membranbiogenese und Membranfusionen im Viruszyklus essentiell ist. Virusmutanten, welchen p37 fehlt, können keine Hülle bilden [15, 67]. Im Gegensatz zu den verwandten Proteinen besitzt p37 nur ein HKD-ähnliches Motiv und nicht, wie die anderen, zwei. Der konservierte Histidin-Rest ist in diesem Protein zu einem Aspartat mutiert. Man muss daher korrekterweise von einem NKD-Motiv sprechen. Auch für p37 ließ sich keine PLD-Aktivität nachweisen [15]. Die Mutation des Aspartats zu Histidin hatte keinen positiven Test auf PLD-Aktivität zur Folge. Interessanterweise konnten jedoch alle anderen Arten von Phospholipase-Aktivitäten bei diesem Protein festgestellt werden: PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub> und PLC-Aktivität, wobei die PLA<sub>2</sub>-Aktivität am dominantesten war [15]. Die erwähnte Mutation des Aspartats zu Histidin hatte keine Veränderung auf die Verteilung der Hydrolyseprodukte zufolge. Diese Beobachtung ist aus zwei Gründen ungewöhnlich: Erstens ist sonst von keinem Enzym bekannt, dass es sowohl PLA, als auch PLC-Aktivität (Phosphodiesterase und Acylesterase) besitzt [15]. Zweitens ist von keinem anderen Protein mit HKD- (oder NKD)-Motiv bekannt, dass es als PLA agieren kann. Die Autoren vermuten, dass in p37 zwar die Fähigkeit zur Phospholipidbindung erhalten blieb, die katalytische Funktion der HKD-Reste jedoch verändert ist oder hier womöglich andere Regionen im Protein das katalytische Zentrum bilden.

Die in dieser Arbeit gefundene mPLD4 ist über einen Bereich von 186 Aminosäuren zu 30,6%, die hPLD4 über einen Bereich von 187 Aminosäuren zu 29,4% mit p37 identisch. Diese Homologie zu einem Protein, welches PLA-Aktivitäten aufweist, ist ein deutlicher Hinweis, dass PLD4 der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität zugrunde liegt.

#### 3.1.3.11 Weitere Informationen zu LOC71772 und LOC196463

Für LOC71772 und sein Homolog aus Mensch LOC196463 tauchten in den letzten zwei Jahren Daten in verschiedenen Literaturstellen auf. Darunter finden sich sowohl globalere Proteomstudien, als auch zwei Studien, welche sich ganz speziell diesen Proteinen gewidmet haben.

Die Proteomuntersuchungen wurden von Sleat *et al.*, Tribl *et al.* und Kollmann *et al.* durchgeführt. Erstere finden LOC196463 nach Reinigung über MRP-Affinitätssäulen in Proben unterschiedlicher Herkunft. So konnten sie LOC196463 im menschlichen Urin, im Plasma und im Gehirn von Mensch und Maus nachweisen [204–206]. Trible und Mitarbeiter haben das Protein im Proteom von Neuromelanin Granula gefun-

den [223] und Kollmann *et al.* fanden, dass es von MPR-defizienten Mausfibroblasten sezerniert wurde [107].

Innerhalb des letzten Jahres wurden schließlich die speziellen Untersuchungen veröffentlicht, deren Ergebnisse im Folgendem kurz dargestellt werden sollen.

Dem Protein aus Maus, LOC71772, widmeten sich Deuschl und Mitarbeiter [45]. Auch sie fanden das Protein nach Reinigung über MRP-Affinität und benennen es nach seinem theoretischen Molekulargewicht „66,3 kDa Protein“. Sie konnten zeigen, dass aus einem Vorläufer von 75 kDa fünf verschiedene proteolytische Fragmente mit einer Größe von 66 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 28 kDa und 15 kDa hervorgingen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten sie eine Kollokalisierung mit dem lysosomalen Marker Lamp 1 feststellen, was die lysosomale Lokalisation von LOC71772 beweist. Des Weiteren sehen sie eine hohe Expression in Milz, Lunge und Gehirn, während in Hoden, Leber und Niere nur wenig LOC71772 zu finden ist. Interessanterweise finden sich in den verschiedenen Organen unterschiedliche Reifungsformen des Proteins. So überwog das 50 kDa-Protein, in der Lunge die 34 kDa-Form und in der Milz war die 24 kDa-Variante prominent. Das Protein ist an fünf Asparaginresten glykosyliert [45].

Auch Jensen *et al.* haben die humane Variante, LOC196463, in mittels MRP-gereinigten Fraktionen gefunden. Alle sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind bei diesem Protein besetzt, was den Unterschied des theoretischen (61 kDa) und apparenten (76 kDa) Molekulargewichts der sezernierten Form erklärt. Zudem konnte eine gewisse Heterogenität der Glykosylketten nachgewiesen werden. Sleat und Mitarbeiter konnten zeigen, dass fünf Glykopeptide einen M6P-Rest trugen [207]. Durch proteolytische Spaltung in späten Endosomen/Lysosomen entstehen ein 45 kDa und ein 32 kDa großes reifes Fragment, welche beide mit den lysosomalen Proteinen Lamp 1 und Cathepsin D kollokalisieren.

Wie zuvor erwähnt sind LOC71771 und LOC196463 homolog zu einer PLB aus *D. discoideum*. Daher vermuten die Autoren der vorgestellten Untersuchungen eine Phospholipase-Aktivität für diese Proteine. Trotz ihrer ausführlichen Untersuchungen zu Glykosylierungen, Reifungsformen und Lokalisation und obwohl Antikörper vorhanden sind, zeigen die Autoren jedoch keine funktionellen Daten zu diesen Proteinen.

Aufgrund seiner Präsenz in allen untersuchten Proben ist PLD4 jedoch der wahrscheinlichere Kandidat für die lysosomale PLA<sub>1</sub>.

## 3.2 Charakterisierung

Eine Hauptfunktion von Makrophagen ist die Aufnahme und Degradation von körpereigenen und Fremdpartikeln, welche in den Organismus eingedrungen sind. Es ist zu vermuten, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> eine wichtige Rolle bei dem Abbau körpereigener und körperfremder Membranen spielt. Zusätzlich nehmen wir an, dass sie für die Prozessierung und anschließende Präsentation von Lipidantigenen wichtig sein könnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden daher Studien zur Charakterisierung der Aktivität vorgenommen. Es sollte ermittelt werden, unter welchen Bedingungen das Enzym am besten arbeitet, ob und inwiefern die Membranbeschaffenheit eine Rolle spielt und welche löslichen Faktoren die Aktivität beeinflussen. Als Enzymfraktionen wurden hier sowohl delipidierte Lysosomenpräparationen aus subzellulärer Fraktionierung oder teilgereinigte RAW B-Zellkulturüberstände (nach ConA-Batch) verwendet.

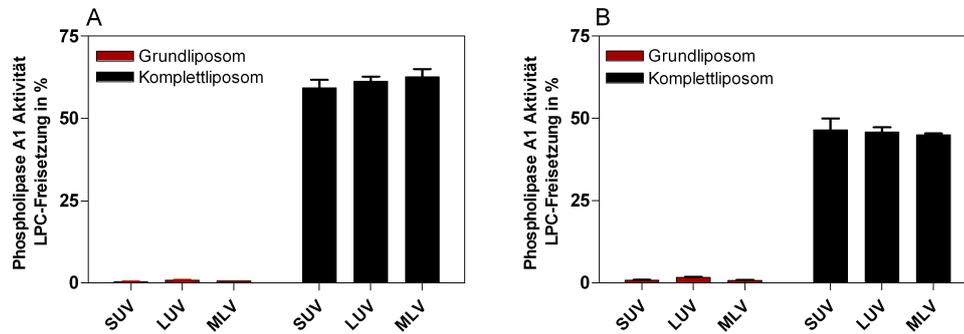
Um die natürlichen Bedingungen so gut wie möglich zu imitieren, wurden Liposomen mit unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen als Modellmembranen eingesetzt.

### 3.2.1 Aktivität am neutralen versus anionischen Liposom

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Enzymaktivität von der Lipidzusammensetzung und/oder der Größe der Liposomen abhängt. Zu diesem Zweck wurden SUVs, LUVs und MLVs in neutraler (Grundliposom) und „kompletter“ Zusammensetzung hergestellt. SUVs sind kleine unilamellare Vesikel, welche einen Durchmesser von bis zu 50 nm haben. Durch die starke Krümmung werden die Kopfgruppen der Phospholipide im äußeren Blatt der Lipiddoppelschicht auseinander gedrückt, während die FS-Ketten dicht gepackt sind. Dieses kann die Bindungsfähigkeit von Grenzflächenenzymen an die Membran modulieren und somit den Substratumsatz beeinflussen [3].

Das Komplettiliposom orientiert sich an der von Kobayashi *et al.* [105] publizierten Lipidzusammensetzung von späten Endosomen. Das Grundliposom enthält nur die zwitterionischen Lipide PC, PE und SM und ist damit nach außen neutral (siehe Seite 37). Der PC-Gehalt beträgt in beiden Liposomenarten konstant 50%. Im Komplettiliposom wurde Sphingomyelin zugunsten der anionischen Phospholipide ausgetauscht. In (hier nicht gezeigten) Voruntersuchungen konnte ein Einfluss der Sphingomyelin-konzentration auf die Phospholipase-Aktivität ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 zusammengefasst.

Zunächst fällt auf, dass die Probe der Lysosomenpräparation im PLA<sub>1</sub>-Test in der Tendenz dasselbe Ergebnis liefert, wie die PLA<sub>1</sub>-Fraktion aus den RAW B-Überständen.



**Abbildung 3.12:** *Lysosomale PLA<sub>1</sub> ist kaum an neutralen Liposomen aktiv und wird nicht durch die Membrankrümmung beeinflusst. Es wurden SUVs, LUVs und MLVs mit entweder rein zwitterionischer, also nach außen neutraler, Zusammensetzung (Grundliposom) oder mit anionischen Lipiden (Komplettliposom) hergestellt, wobei sich letztere an der von Kobayashi et al. [105] publizierte Lipidzusammensetzung des späten, endosomalen Kompartiments orientiert. Die Ansätze wurden bei pH 4,5 für 45 min bei 37°C inkubiert, lyophilisiert und die Lipide über HPTLC getrennt. Zwei unterschiedliche PLA<sub>1</sub>-Fraktionen wurden getestet: A: delipidierte Lysosomenpräparation, B: PLA<sub>1</sub> aus RAW B-Überstand*

Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da wir davon ausgehen, dass es sich in beiden Fraktionen um dasselbe Enzym handelt und bestätigt diese Annahme (Abbildung 3.12A vs. B).

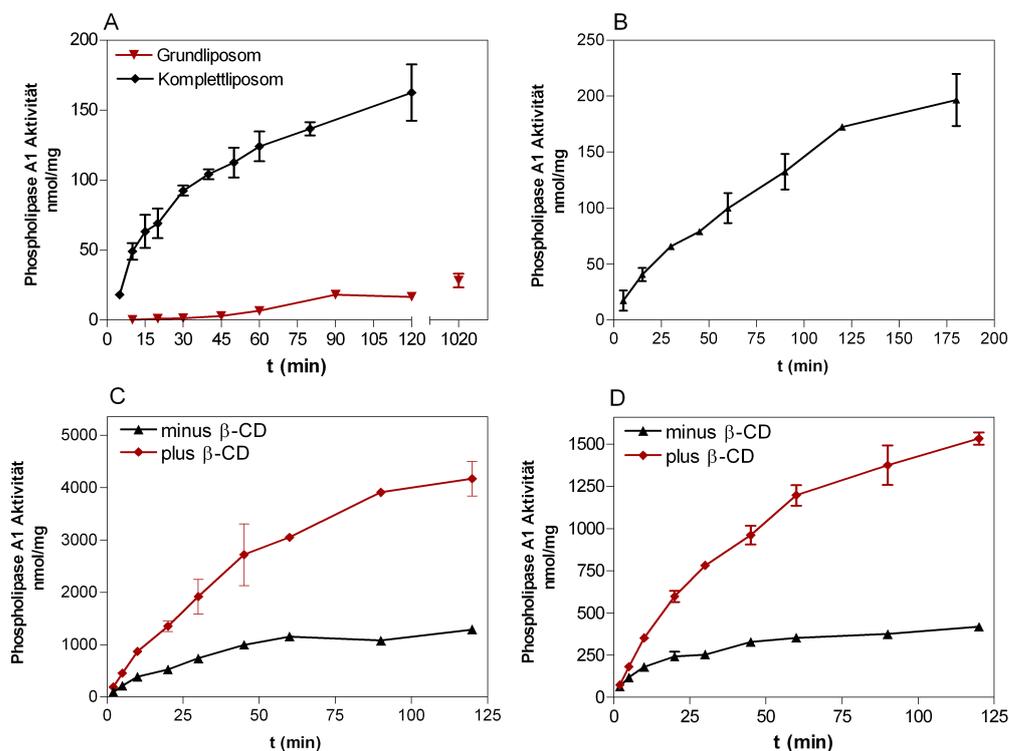
Des Weiteren kann man deutlich erkennen, dass am neutralen Liposom (Grundliposom) kaum Enzymaktivität am PC-Substrat nachweisbar ist, während am Komplettliposom ca. die Hälfte des verfügbaren PCs verdaut wurde. Das deutet darauf hin, dass negativ geladene Phospholipide in der Membran wichtig für die PLA<sub>1</sub>-Aktivität sind. Fehlen diese anionischen Phospholipide, kann an Modellmembranen kaum Substrat umgesetzt werden. Für SUVs, LUVs und MLVs erhält man gleiche Ergebnisse. Der Durchmesser der Liposomen, und damit die Krümmung ihrer Membranen, scheint demnach keinen Effekt auf die Aktivität zu haben.

### 3.2.2 Kinetik der Enzymaktivität

Die Untersuchung der Enzymkinetik sollte der Beantwortung zweier Fragen dienen. Zum einen sollte die optimale Inkubationszeit für die Charakterisierungsversuche ermittelt werden. Zum anderen sollte geklärt werden, ob die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität eine Verzögerung bei der Hydrolyse aufweist. Für viele sPLA<sub>2</sub>s wird unter bestimmten Bedingungen eine solche Verzögerungsphase (engl. *lag* oder *latency phase*) beobachtet, welche einen sigmoiden Kurvenverlauf zur Folge hat [12, 23, 153].

Es wurden abermals neutrale und Komplettliposomen in Form von LUVs einge-

### 3. ERGEBNISSE



**Abbildung 3.13: Kinetische Untersuchungen der PLA<sub>1</sub>-Aktivität** **A:** PLA<sub>1</sub>-Kinetik an Grund- und Komplettiliposomen (LUVs). **B:** Kinetik in Anwesenheit von Triton X-100. Der Lipidfilm wurde hier direkt in Assaypuffer mit 0,1% Triton X-100 aufgenommen. **C:** Kinetik in An- oder Abwesenheit von 2,9 mM β-CD mit Lysosomenpräparation. **D:** Kinetik in An- oder Abwesenheit von 2,9 mM β-CD mit teilgereinigten RAW B-Überständen

setzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 grafisch dargestellt.

Wie in vorangegangenem Versuch schon gesehen, wird am Grundliposom auch hier so gut wie kein PC abgebaut (Abbildung 3.13A). Auch nach 17 Stunden (1020 min) wurden erst 2% des verfügbaren PCs hydrolysiert. Die Kinetik am Komplettiliposom entspricht einer Sättigungskurve. Nach ca. 40 min flacht die Kurve langsam ab und nähert sich dem Plateaubereich. Die Kinetik mit Triton X-100 zeigt eine sehr ähnliche Verlaufsform (Abbildung 3.13B). Die Versuche A und B wurden unabhängig voneinander mit unterschiedlichen PLA<sub>1</sub>-Präparationen durchgeführt. Daher sind die y-Werte der beiden Grafiken nicht direkt miteinander vergleichbar.

Aus den Kinetiken geht hervor, dass die Inkubationszeit für die weiteren PLA<sub>1</sub>-Versuche 45 min nicht übersteigen sollte. Zudem wurde drauf geachtet, dass maximal 20% des verfügbaren PCs in den Assays umgesetzt wurde, um in der linearen Phase der Kurve zu arbeiten.

Die Kurve zeigt keinen S-förmigen Verlauf, wie er für die sPLA-2 beschrieben wurde.

Bei der Hydrolyse von langkettigem PC entstehen als wasserunlösliche Produkte eine FFS und Lyso-PC. Die Akkumulation dieser Moleküle in der Interphase führt zu qualitativen Veränderungen der Phospholipiddoppelschicht, welche die Enzymaktivität positiv oder negativ beeinflussen könnten.

Zur Klärung der Frage, ob dies hier der Fall ist, wurde eine Kinetik in An- oder Abwesenheit von  $\beta$ -CD erstellt. Es wurde von anderen Gruppen gezeigt, dass  $\beta$ -CD wasserlösliche Komplexe mit den Reaktionsprodukten von PLAs eingehen kann, ohne jedoch die Phospholipidsubstrate zu komplexieren oder die Oberflächenspannung der Vesikel zu verändern [89].  $\beta$ -CD eignet sich daher dafür, die lipophilen Produkte zu komplexieren und damit aus der Interphase zu entfernen.

Die Grafiken C und D in Abbildung 3.13 dokumentieren das Ergebnis. In C wurde als PLA-Fraktion eine Lysosomenpräparation eingesetzt, in D teilgereinigte PLA<sub>1</sub> aus RAW B-Überstand. Man kann deutlich erkennen, dass die Kurve nach  $\beta$ -CD-Zugabe wesentlich steiler verläuft. So wurde z. B. nach 30 min von der Lysosomenpräparation 7% des vorhandenen PCs verdaut, wenn kein  $\beta$ -CD vorhanden war, in Anwesenheit von diesem jedoch 22%. Für die teilgereinigte RAW B-Überstandsfraktion waren es nach 30 min 15% versus 46%.

Das Komplexieren der Spaltprodukte durch  $\beta$ -CD führt also insgesamt zu einer Aktivitätssteigerung auf 300%. Umgekehrt wirkt sich das Verbleiben der Spaltprodukte in der Membran inhibierend auf die PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus.

### 3.2.3 Zum Effekt von $\beta$ -CD

Um die Konzentrationsabhängigkeit des aktivierenden Effektes von  $\beta$ -CD zu untersuchen, wurden weitere PLA<sub>1</sub>-Assays mit verschiedenen  $\beta$ -CD-Konzentrationen durchgeführt.

Außerdem wurde getestet, ob Rinderserumalbumin (BSA), ein weiterer Komplexbildner mit FFS, ebenfalls aktivierend auf die lysosomale PLA<sub>1</sub> wirkt.

Abbildung 3.14 zeigt, dass sowohl  $\beta$ -CD- als auch BSA zunächst die PLA<sub>1</sub>-Aktivität steigern. Die Aktivitätskurve steigt im BSA-Assay bis zu einer Konzentration von 4,2 mM BSA steil an, fällt danach jedoch wieder ab. In Gegenwart von 20 mM BSA erreicht die Aktivität jenen Wert, welcher ohne BSA-Zugabe gemessen wurde. Im Gegensatz dazu steigt die Aktivität mit Erhöhung der  $\beta$ -CD-Konzentration kontinuierlich an. Bei einem Wert von 120 mM  $\beta$ -CD erreicht die Aktivität das 14-fache dessen, was in der Kontrolle ohne Zugabe gemessen wurde.

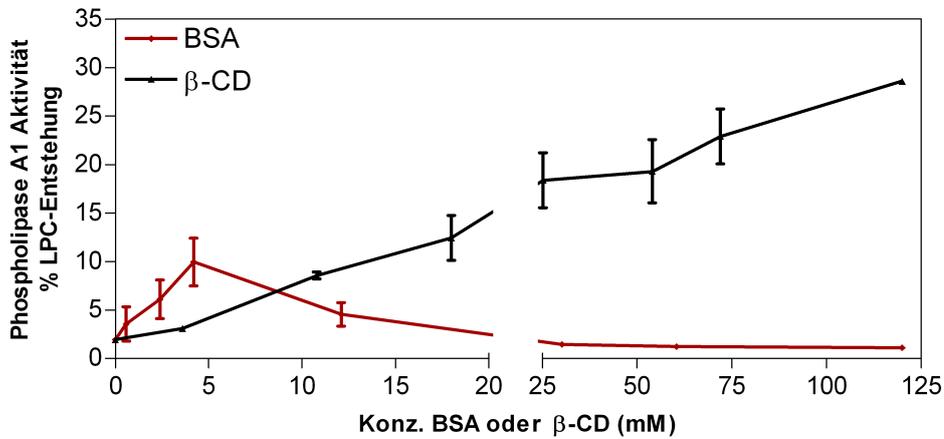


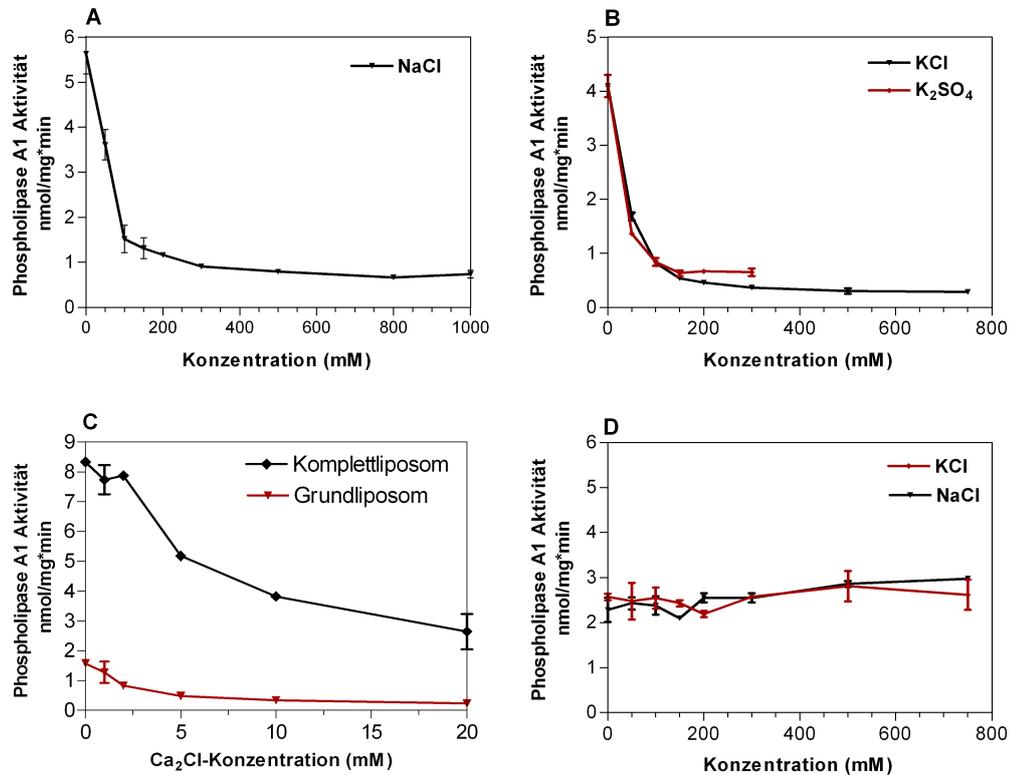
Abbildung 3.14:  $\beta$ -CD und BSA modulieren die PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Dem PLA<sub>1</sub>-Assay wurden steigende Konzentrationen von  $\beta$ -CD und BSA zugesetzt und deren Auswirkung auf die Aktivität hier dokumentiert.

Beide Moleküle, sowohl BSA, als auch  $\beta$ -CD sind in der Lage, die Spaltprodukte der PLA<sub>1</sub>-Hydrolyse zu komplexieren. Hier wird gezeigt, dass beide Moleküle die PLA<sub>1</sub>-Aktivität modulieren können (Abbildung 3.14). Ihre Titrationskurven sehen jedoch unterschiedlich aus. In Gegenwart von  $\beta$ -CD steigt die PLA<sub>1</sub>-Aktivität kontinuierlich mit der Konzentration an. Der Effekt von BSA erreicht hingegen einen Scheitelpunkt. Konzentrationen darüber hinaus nivellieren den anfänglich aktivierenden Effekt. Dies könnte daran liegen, dass BSA auch an Membranen binden kann und dadurch möglicherweise die PLA<sub>1</sub>-Bindung sterisch behindert.

### 3.2.4 Einfluss der Ionenkonzentration auf die PL A<sub>1</sub>-Aktivität

Es stellte sich die Frage, warum am neutralen Liposom, im Gegensatz zum negativ geladenen, kaum PC umgesetzt wird. Wie auf Seite 25 beschrieben, beschleunigen Phospholipide mit negativ geladenen Kopfgruppen die Bindung vieler Lipasen an die Grenzfläche. Sie tun dieses u. a. aufgrund von elektrostatischen Effekten. Zum einen werden positiv geladene Proteindomänen in den Lipasen elektrostatisch von den Kopfgruppen anionischer Lipide angezogen, zum anderen bewirkt gegenseitige elektrostatische Abstoßung der Phospholipidkopfgruppen eine Aufweichung der Ordnung in der Phospholipiddoppelschicht, was den Enzymen den Zugriff auf die Lipidsubstrate erleichtern kann [7].

Es sollte untersucht werden, ob die lysosomale PLA<sub>1</sub> ebenfalls auf elektrostatische Wechselwirkungen an der Interphase angewiesen ist. Ein Hinweis darauf wäre es, wenn die Ionenkonzentration im Medium die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität modulie-



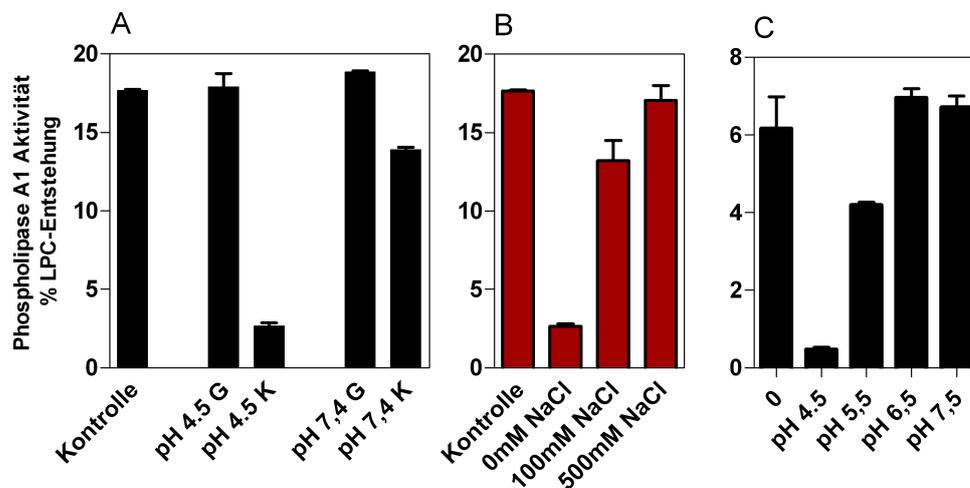
**Abbildung 3.15: Höhere Ionenkonzentration inhibiert die  $PLA_1$ -Aktivität.** Dem Liposomenassay wurden unterschiedliche Salze hinzu titriert. In allen Fällen erfolgte der Test mit  $PLA_1$  aus RAW B-Überständen. Die Tests wurden unabhängig voneinander durchgeführt, was die leicht unterschiedliche Skalierung der Y-Achsen erklärt. Inkubationszeit 40 min,  $37^\circ\text{C}$ . **A:** Titration von Natriumchlorid. **B:** Da intrazellulär vor allem Kaliumionen eine Rolle spielen, wurden zwei unterschiedliche Kaliumsalze, KCl und  $K_2SO_4$ , im Assay getestet. **C:** Auswirkung der Calciumkonzentration auf die Aktivität an Grund- und Komplettliposom. **D:** Auswirkung der Salzkonzentration nach Zugabe von 0,1% Triton X-100.

ren würde. Positiv geladene Ionen können die negativ geladene Membranoberfläche neutralisieren und die elektrostatischen Abstoßungen zwischen den Lipidkopfgruppen abschwächen. Die bisherigen Versuche erfolgten in der recht niedrigen Ionenstärke von 50 mM Natrium-Acetat-Puffer <sup>7</sup>.

Um den Effekt der Ionenstärke zu ermitteln, wurden dem Assay unterschiedliche Salze hinzu titriert (Abbildung 3.15). Es wurden Komplettliposomen (in 3.15C auch Grundliposomen) als MLVs eingesetzt.

Wie die Grafiken darlegen, wird die  $PLA_1$ -Aktivität schon durch eine geringe Erhöhung der Salzkonzentration stark inhibiert. Dabei spielt es keine Rolle, welches Salz eingesetzt wurde. Wird das  $PLA_1$ -Assay jedoch in Gegenwart von Triton X-100 durchgeführt (Abbildung 3.15D), so ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Offenbar spielt der

<sup>7</sup>Die physiologische Osmolarität entspricht etwa 140-160 mM NaCl (= 280-320 mM gelöste Ionen).



**Abbildung 3.16:** Die PLA<sub>1</sub>-Aktivität bindet bei saurem pH-Wert an anionische Membranen. Je Liposomenart wurden 200 nmol des entsprechenden Lipidmixes pipettiert und zur Herstellung von MLVs in 200  $\mu$ l Assaypuffer (50 mM NaAc- oder Tris-HCl-Puffer) hydriert. Die Liposomen wurden mit einem Aliquot einer Lysosomenpräparation (30  $\mu$ g Gesamtprotein bei A, 10  $\mu$ g bei B) versetzt und bei 37°C für 10 min leicht geschüttelt. Als Vergleichswert wurde ein Ansatz ohne Liposomen, aber in gleichem Puffer und in gleicher Verdünnung mitgeführt (Kontrolle). Anschließend wurden die Liposomen bei 100.000 g pelletiert und die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in den Überständen (in Gegenwart von Triton X-100) gemessen. **A:** PLA<sub>1</sub>-Bindung an Grund- und Komplettlipo-somen (G und K) bei saurem und neutralem pH-Wert. **B:** PLA<sub>1</sub>-Bindung an Komplettlipo-somen bei verschiedenen Salzkonzentrationen im Puffer. **C:** PLA<sub>1</sub>-Bindung an Komplettlipo-somen bei verschiedenen pH-Werten.

Ladungseffekt keine Rolle, wenn das Substrat in Detergenzmizellen angeboten wird.

Diese Ergebnisse erhärten die Interpretation, dass das Bindungsvermögen der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an die Grenzfläche über elektrostatische Effekte vermittelt wird.

### 3.2.5 Enzyymbindung am neutralen versus anionischen Liposom

Die lysosomale PLA<sub>1</sub> kann ihr PC-Substrat nur umsetzen, wenn es in eine Grenzfläche mit anionischer Phospholipiden eingebunden ist. Am neutralen Grundliposom hingegen wird kaum Substrat umgesetzt. Die vorangegangenen Versuche lassen vermuten, dass anionische Phospholipide die Bindung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an die Membranoberfläche vermitteln. Es könnte jedoch auch sein, dass das Enzym zwar noch an die Membran binden kann, die negative Ladung auf der Membranoberfläche jedoch für die katalytische Aktivität notwendig ist. In diesem Fall würde das Enzym zwar an das Grundliposom binden, könnte dort jedoch nicht katalytisch aktiv sein.

Zur Beantwortung, welche dieser beiden möglichen Interpretationen zutrifft, wurden Sedimentationsstudien mit Grund- und Komplettlipo-somen durchgeführt. Hierfür wurden die hergestellten Liposomen zunächst für 10 min bei 37°C mit der PLA<sub>1</sub>-Probe inkubiert, um dem Enzym die Bindung an die Liposomen zu ermöglichen. Anschließend

wurden die Liposomen pelletiert und die in den Überständen verbleibende Aktivität gemessen. Je höher die Restaktivität in diesen Fraktionen, desto weniger Enzym wurde von den Liposomen gebunden.

Abbildung 3.16 fasst die Ergebnisse zusammen. Wie aus Abbildung 3.16A hervor geht, bindet die PLA<sub>1</sub>-Aktivität weder bei pH 4,5, noch bei pH 7,4 an die Grundliposomen (G). An Komplettliposomen (K) findet bei pH 7,4 ebenfalls keine Bindung statt. Bei pH 4,5 werden jedoch ca. 85% der PLA<sub>1</sub>-Aktivität mit den Liposomen pelletiert, wie die Restaktivität von 15% im Überstand zeigt.

Im Folgenden wurde der Einfluss der Salzkonzentration auf die Bindung an Komplettliposomen bei pH 4,5 untersucht (Abbildung 3.16B). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich eine Erhöhung der Salzkonzentration negativ auf das Bindungsvermögen der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an die Komplettliposomen auswirkt. Bereits 100 mM NaCl im Bindungspuffer reduzieren die PLA<sub>1</sub>-Bindung um das 5-fache. Dieses Ergebnis korrespondiert gut mit der Beobachtung, dass bei erhöhter Salzkonzentration weniger PLA<sub>1</sub>-Aktivität an PC gemessen werden kann.

Schließlich wurde der Effekt des pH-Wertes auf die Bindungsfähigkeit an Komplettliposomen genauer untersucht. Abbildung 3.16C zeigt, dass bereits bei pH 5,5 deutlich weniger PLA<sub>1</sub>-Aktivität an die Liposomen bindet, bei pH 6,5 findet keine Bindung mehr statt. Wie weiter unten noch gezeigt werden wird, korrespondiert diese Beobachtung mit dem pH-Optimumsbereich des Enzyms.

Diese Versuche zeigen zum einen, dass die PLA<sub>1</sub>-Aktivität nur an Modellmembranen binden kann, wenn anionische Phospholipide in diese integriert wurden. Eine Erhöhung der Salzkonzentration vermindert die Bindungsfähigkeit, sehr wahrscheinlich durch Abschwächung von elektrostatischen Wechselwirkungen, und damit auch den katalytischen Umsatz von PC.

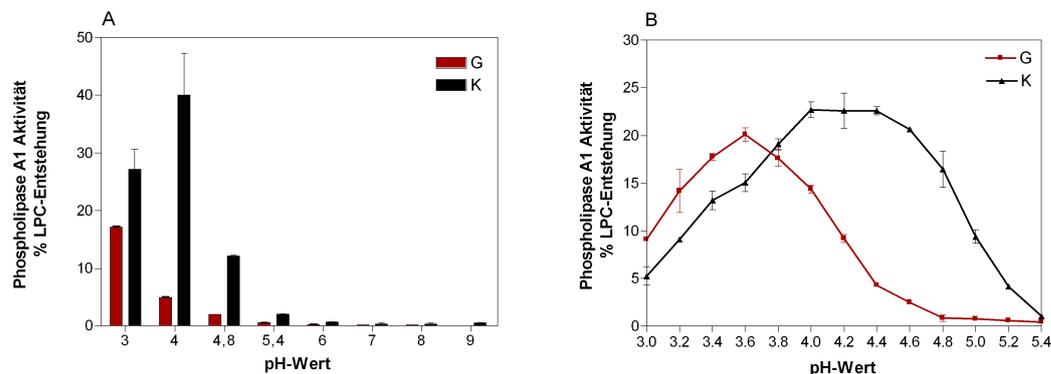
Zum anderen wird deutlich, dass auch der pH-Wert das Bindungsvermögen der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an Komplettliposomen stark beeinflusst. Die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität kann nur bei saurem pH-Wert von < 6,0 an die Modellmembranen binden.

### 3.2.6 Bestimmung des pH-Optimums

Für ein lysosomales Enzym erwartet man ein pH-Optimum im sauren Bereich. Wie oben gezeigt, findet bei pH > 6 quasi keine Bindung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an Liposomen mehr statt. Es ist daher zu vermuten, dass aus diesem Grund auch keine Aktivität bei weniger sauren pH-Werten festgestellt werden kann.

Hier wurde nun ermittelt, bei welchem pH-Wert genau die PLA<sub>1</sub> am besten ar-

### 3. ERGEBNISSE



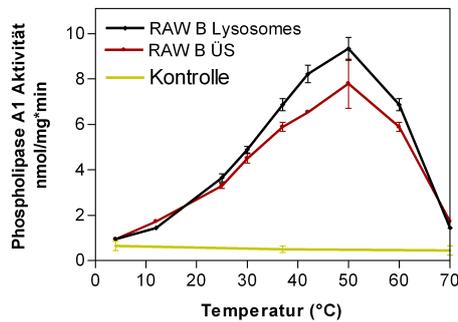
**Abbildung 3.17: Das pH-Optimum der lysosomalen PLA<sub>1</sub>.** Die PLA<sub>1</sub>-Aktivität wurde bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. **A:** pH-Bereich 3-9. **B:** pH-Bereich 3-5,4 in kleineren pH-Schritten. Für den pH-Bereich von 3-7 wurde das Zitronensäure-Phosphat-Puffersystem (50 mM) verwendet, für die pH-Werte 8 und 9 diente 50 mM Tris-HCl-Puffer. Allen Ansätzen wurden 0,1 mM EDTA zugesetzt. Als Substrat wurde wieder PC in Grund- oder Komplettliposomen (als MLVs) angeboten. Nach 45 min Schütteln bei 37°C wurde die Reaktion durch Einfrieren gestoppt, die Proben lyophilisiert, per HPTLC aufgetrennt und die Banden quantifiziert.

beitet. Des Weiteren sollte über diesen Versuch ausgeschlossen werden, dass auch bei neutralem pH-Wert PLA<sub>1</sub>-Aktivität gemessen werden kann. Dieses würde darauf hindeuten, dass womöglich zytosolische bzw. sezernierte PLAs in den Präparationen vorhanden sind, welche u. U. auch bei saurem pH-Wert aktiv sein und damit die Ergebnisse der Assays verfälschen könnten.

Es wurden zwei unterschiedliche Puffersysteme verwendet: 50 mM Zitronensäure-Phosphatpuffer für den pH-Bereich von 3-7 und 50 mM Tris-HCl-Puffer für die höheren pH-Werte. Allen Assays wurde zudem 0,1 mM EDTA zugesetzt. EDTA wird standardmäßig in allen Assays der sauren PLA<sub>1</sub>-Aktivität eingesetzt, um Aktivitäten von kalziumabhängigen Phospholipasen zu minimieren. Auch hier wurde an Grund- und Komplettliposomen (MLVs) gegen das Substrat PC gemessen.

Grafik A in Abbildung 3.17 zeigt die PLA<sub>1</sub>-Aktivität in einem breiteren pH-Bereich von pH 3-9. Um den Kurvenverlauf im Bereich des Aktivitätsoptimums noch genauer zu dokumentieren, wurde ein weiteres Assay in 0,2er-Schritten zwischen pH 3 und 5,4 durchgeführt (3.17B).

Man erkennt, dass weder bei neutralem, noch bei alkalischem pH-Wert PLA<sub>1</sub>-Aktivität messbar ist. Die Aktivität an Komplettliposomen ist im pH-Bereich zwischen 4 und 4,4 am größten. Am zwitterionischen Grundliposom ist das Aktivitätsoptimum in noch saurere Bereiche unter pH 4 verschoben. Ab einem pH-Wert von 4,8 kann das Enzym am Grundliposom, im Gegensatz zum Komplettliposom, kaum noch PC hydrolysieren. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen.



**Abbildung 3.18: Temperaturoptimum der lysosomalen  $PLA_1$ .** Das  $PLA_1$ -Assay wurde bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Ansätze wurden mit MLVs für 40 min inkubiert. Durch Kontrollen ohne Enzymzugabe wurde ausgeschlossen, dass das Substrat durch Erhitzen enzymunabhängig hydrolysiert wird.

Wie man es bei einem lysosomalen Enzym erwartet, arbeitet die lysosomale  $PLA_1$  also nur in sauren pH-Bereichen. Bei  $pH > 5$  ist kaum noch Aktivität messbar. Wie gezeigt, nimmt auch die Bindungsfähigkeit an Liposomen ab  $pH 5,5$  stark ab. Demnach bestimmt der pH-Wert des Mediums die lysosomale  $PLA_1$ -Aktivität u. a. dadurch, dass er die Membranbindung des Enzyms beeinflusst.

### 3.2.7 Temperaturoptimum

Die van 't Hoff'sche Regel<sup>8</sup> besagt: Bei chemischen Reaktionen führt eine Temperaturerhöhung von  $10^\circ\text{C}$  zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit. Ab bestimmten Temperaturen sinkt die Aktivitätskurve von Enzymen jedoch rapide ab, was durch die Hitzedenaturierung dieser Biokatalysatoren zu erklären ist. Die Temperaturkurve gibt damit einen Hinweis auf die Stabilität des Enzyms bei Wärme. Für viele Enzyme fällt die Kurve bereits ab  $40^\circ\text{C}$ , zunächst langsam, ab.

In Abbildung 3.18 ist die Temperaturkurve der  $PLA_1$  dargestellt. Der Peak dieses Enzyms liegt bei  $50^\circ\text{C}$  und auch bei  $60^\circ\text{C}$  ist noch eine deutliche Aktivität messbar. Durch Kontrollen ohne Enzymzugabe konnte ausgeschlossen werden, dass das Substrat enzymunabhängig hydrolysiert wird. Der Anteil an gemessenem Lyso-PC sind also ausschließlich auf die Katalyse durch lysosomale  $PLA_1$  zurückzuführen.

Das ermittelte Temperaturoptimum ist recht hoch, jedoch nicht außergewöhnlich für lysosomale Enzyme. So hat die lysosomale  $\alpha$ -Glucosidase der Ratte ein Temperaturoptimum von  $60^\circ\text{C}$  [148]. Die lysosomale Protease Cathepsin D arbeitet, wie die hier untersuchte lysosomale  $PLA_1$ , ebenfalls bei  $50^\circ\text{C}$  am besten [208].

<sup>8</sup>Auch als Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (RGT-Regel) bekannt.

### 3.2.8 Effekte einzelner Lipide

Die Beschaffenheit der Grenzfläche beeinflusst die Aktivität der meisten lipolytischen Enzyme. Wie die vorangegangenen Versuche verdeutlichen, ist am zwitterionischen Grundliposom so gut wie keine lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität messbar.

Dagegen kann PC hydrolysiert werden, wenn es in ein Liposom eingebettet ist, welches, wie das Komplettliposom, anionische Phospholipide enthält. Im Komplettliposom tragen die Kopfgruppen der Phospholipide PS, PI und BMP eine negative Ladung.

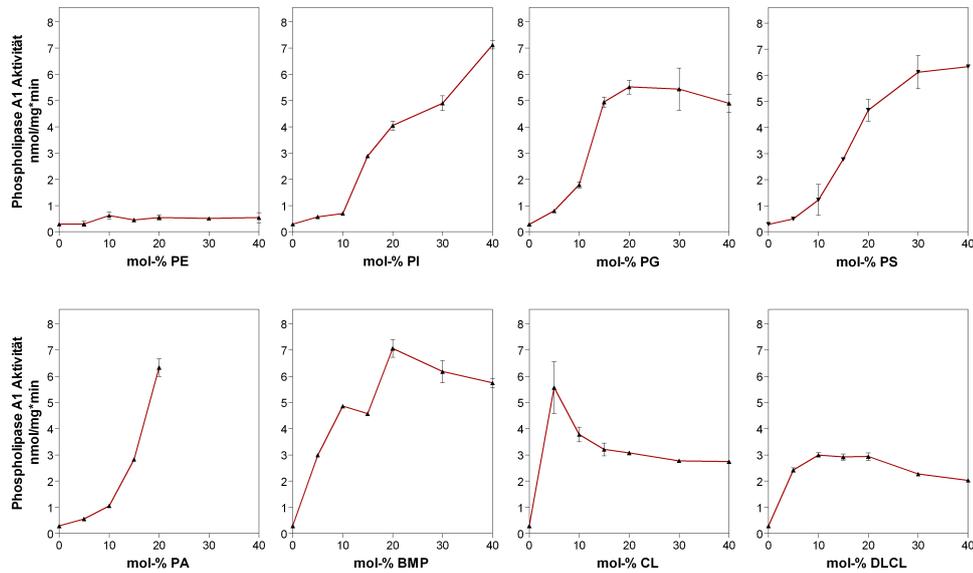
Im Folgenden sollte ermittelt werden, welche Wirkung einzelne Phospholipide auf die PLA<sub>1</sub> Aktivität haben. Zu diesem Zweck wurde jeweils nur ein einziges weiteres Phospholipid zu einem Grundliposom bestehend aus PC und SM hinzu titriert. Das zu testende Lipid „x“ wurde gegen SM ausgetauscht und die Konzentration des Substrates PC konstant bei 50 mol% gehalten. Zur Verdeutlichung ist in Tabelle 3.8 die Lipidzusammensetzung der eingesetzten Liposomen aufgeführt.

**Tabelle 3.8:** *Liposomen-Titrationstabelle.*

Lipid X	PC	SM
0% Lipid X	50%	50%
5% Lipid X	50%	45%
10% Lipid X	50%	40%
15% Lipid X	50%	35%
20% Lipid X	50%	30%
30% Lipid X	50%	20%
40% Lipid X	50%	10%

Man kann bei Abbildung 3.19 deutlich erkennen, dass das zwitterionische Phospholipid PE keinen aktivierenden Effekt auf die PLA<sub>1</sub>-Aktivität ausübt, während alle anionischen Phospholipide die PLA<sub>1</sub>-Aktivität konzentrationsabhängig positiv beeinflussen können. Die einzelnen Aktivitätskurven der negativ geladenen Lipide unterscheiden sich jedoch teilweise stark voneinander. BMP, CL und DLCL bewirken schon bei einer vergleichsweise geringen Konzentration von 5 mM Lipid eine deutliche Aktivitätssteigerung. Bei den Phospholipiden PS, PG, PI und PA steigt die Aktivität bis zu einer Konzentration von 10 mM noch langsam an, um dann in einen steileren Verlauf überzugehen. Für die meisten Phospholipide geht die Titrationskurve in eine Plateauphase über. Bei CL und DLCL erreicht die Kurve einen Höhepunkt, um anschließend wieder abzufallen. Diese Unterschiede sollen später noch näher diskutiert werden.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch die Auswirkung von Cholesterol auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität getestet wurde. Dieses Steroid bietet zwar keine anionische Ladung, reguliert jedoch die Membranfluidität und könnte auf diese Weise den Zugang der PLA<sub>1</sub> zu ihrem Substrat beeinflussen. Diese Möglichkeit konnte jedoch im Konzentrationsbereich von 5-40 mM Cholesterol ausgeschlossen werden (Daten nicht



**Abbildung 3.19: Anionische Phospholipide erhöhen die lysosomale  $PLA_1$ -Aktivität.** Dem Grundliposom wurde jeweils ein einziges weiteres Lipid in steigender Konzentration im Austausch gegen SM hinzugefügt. Ziel war es, die Auswirkung der einzelnen Lipide auf die Aktivität zu untersuchen. Die Assays wurden jeweils 40 min inkubiert. PE: Phosphatidylethanolamin; PI: Phosphatidylinositol; PG: Phosphatidylglycerol; PS: Phosphatidylserin; PA: Phosphatidsäure; BMP: Bis(monoacylglycerol)phosphat; CL: Cardiolipin (aus Rinderherz); DLCL: Dilysoardiolipin (aus Rinderherz).

gezeigt). In sämtlichen anderen Assays wurde auf den Einsatz von Cholesterol verzichtet, da dieses Lipid in gesunden Zellen kontinuierlich aus den internen Membranen der späten Endosomen/Lysosomen herausgeschleust wird [37].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle anionischen Phospholipide die  $PLA_1$ -Aktivität an den Modellmembranen deutlich erhöhen, ihre Titrationskurven jedoch unterschiedliche Verläufe nehmen.

### 3.2.9 BMP steigert PS und PE-Degradation

BMP ist ein besonderes Phospholipid, das fast ausschließlich in den intralysosomalen Membranen gefunden wird [105, 108]. Diese Tatsache legt nahe, dass es dort eine besondere Aufgabe erfüllen könnte, welcher mit der Funktion dieser Membranen zusammenhängt. Die vorangegangenen Versuche zeigen, dass der Abbau von PC durch die  $PLA_1$  an Liposomen gesteigert wird, wenn BMP zugegen ist. Es stellte sich die Frage, ob BMP auch den Abbau anderer Phospholipide als PC beschleunigt. Für die Phospholipide PS und PE wurde dieses getestet. Dafür wurden Liposomen mit 5%, 15% und 25% BMP hergestellt und mit radioaktiv markiertem PS oder PE ergänzt. Die Degradation beider Phospholipide stieg mit der BMP-Konzentration signifikant

### 3. ERGEBNISSE

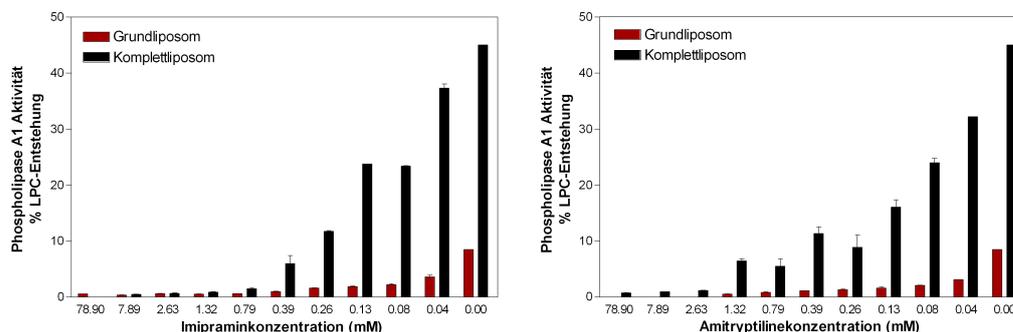


Abbildung 3.20: *Inhibition der PLA<sub>1</sub> durch CADs.* Dem PLA<sub>1</sub>-Assay wurden steigende Konzentrationen der trizyklischen Antidepressiva Imipramin oder Amitryptilin hinzugefügt. Als PLA<sub>1</sub>-Fraktion diente teilgereinigter RAW B-Überstand. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37°C.

an. So wurden in Gegenwart von 5% BMP ca. 16% PS abgebaut, bei 15% BMP war es schon die dreifache Menge mit ca. 46% und bei 25% schließlich 54% (Ergebnisse nicht gezeigt).

#### 3.2.10 Inhibitoren der PLA<sub>1</sub>-Aktivität

Kationische amphiphile Pharmazeutika (*cationic amphiphilic drugs*, CADs) können als Nebenwirkung Phospholipidosen auslösen, indem sie lysosomale Phospholipasen inhibieren. Der genaue Mechanismus der Inhibition wird noch diskutiert und scheint bei den einzelnen CADs durchaus unterschiedlich zu sein [9].

Für einige CADs wird vermutet, dass sie (ebenfalls) negative Ladungen auf der Membranoberfläche neutralisieren und auf diese Weise die Bindung der Phospholipasen an die Grenzfläche verhindern.

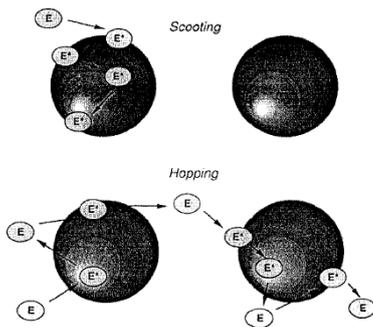
Hier wurden für zwei unterschiedliche Substanzen, Imipramin und Amitryptilin aus der Klasse der trizyklischen Antidepressiva, Titrationskurven im PLA<sub>1</sub>-Assay angefertigt (Abbildung 3.20).

Beide Substanzen inhibieren konzentrationsabhängig die PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Ab einer Konzentration von 0,79 mM Imipramin oder 2,63 mM Amitryptilin ist keine Aktivität am Komplettliposom mehr messbar. In beiden Fällen erfolgt bei ca. 0,1 mM des jeweiligen Antidepressivums eine PLA<sub>1</sub>-Aktivitätsreduktion von 50%.

#### 3.2.11 Katalysemodus

Lipolytische Enzyme können nach dem *scooting*-Modus oder dem *hopping*-Modus (siehe Seite 25) arbeiten. Mit folgendem Versuch sollte geklärt werden, welchem Modus die PLA<sub>1</sub> unterliegt.

Es wurden mit radioaktivem PC markierte und nicht-markierte Komplettliposomen hergestellt. 20 nmol der nicht-markierten MLVs wurden in Reaktionsröhrchen vorgelegt und die PLA<sub>1</sub>-Fraktion hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Gemische für verschiedene Zeiträume inkubiert, um dem Enzym die Möglichkeit zu geben an die in dem Ansatz bereits vorhandenen, nicht-markierten Vesikel zu binden.

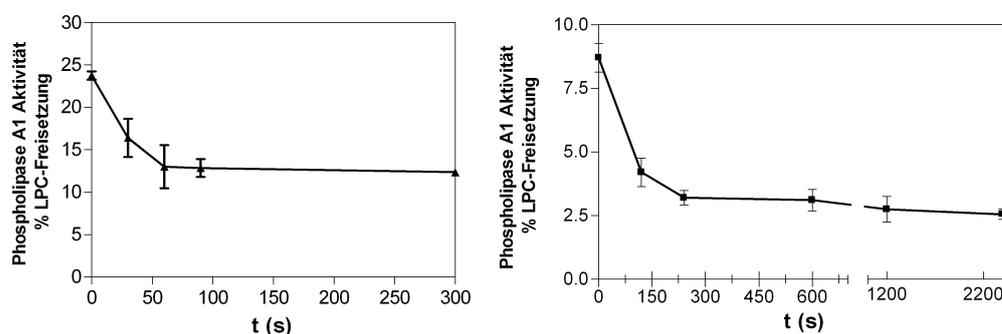


**Abbildung 3.21:** *Scooting-Modus vs. hopping-Modus.* Modell aus [23].

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden ebenfalls 20 nmol der radioaktiv-markierten Liposomen hinzugefügt, die Reaktion nach 20 min gestoppt und ermittelt, wie viel des radioaktiven PC-Substrates abgebaut worden war. Für den Null-Wert wurden beide Liposomenarten gleichzeitig in die Reaktion gegeben.

Wenn das Enzym im *hopping*-Modus arbeitet, kann es nach den einzelnen Hydrolysezyklen das Vesikel wechseln, da es von der Grenzfläche dissoziiert. In diesem Falle ist der Wechsel von nicht-markierten Vesikeln auf solche mit radioaktivem PC genauso wahrscheinlich, wie der Wechsel auf ein anderes, nicht-markiertes Vesikel. Arbeitet es hingegen nach dem *scooting*-Modus, bleibt es für viele Hydrolysen am Liposom gebunden und wechselt kaum noch oder gar nicht mehr auf Vesikel mit radioaktivem PC. Dementsprechend wird weniger markiertes PC abgebaut. Abbildung 3.21 veranschaulicht modellhaft den Unterschied zwischen den beiden Arbeitsmodi, Abbildung 3.22 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Versuche.

Wird die Enzymfraktion mit unmarkierten Liposomen vorinkubiert, so sinkt der prozentuale Abbau von PC aus den später hinzugefügten, radioaktiv markierten, Liposomen. Für diesen Effekt reichen wenige Sekunden Vorinkubationszeit. Bereits nach 60-90 min tritt eine Sättigung des Effektes ein. Längere Vorinkubation führt dann nicht zu einer weiteren Reduktion der Aktivität an markierten Liposomen. Das bedeutet, dass die unmarkierten Liposomen bereits in der ersten Inkubationsminute mit PLA<sub>1</sub> abgesättigt werden. Die von unmarkierten Liposomen gebundene Enzymmenge steht nicht mehr zur Verfügung, um an den markierten Liposomen aktiv zu sein. Aus dem Ergebnis folgt, dass das Enzym nicht im *hopping*-, sondern im *scooting*-Modus arbeitet.



**Abbildung 3.22:** Die lysosomale  $PLA_1$  arbeitet im *scooting-Modus*. Dieser Versuch soll eine Abschätzung ermöglichen, ob die  $PLA_1$  eher im *scooting-* oder im *hopping-Modus* arbeitet. Die Enzymfraktion wurden zunächst für die angegebenen Zeitspannen mit unmarkierten Komplettliposomen inkubiert. Die Inkubationszeiten sind auf der x-Achse abgetragen. Nach dieser Zeit wurden Komplettliposomen mit radioaktiv markiertem PC hinzugefügt, 20 min lang bei  $37^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend über HPTLC ermittelt, wie viel des radioaktivem PC in dieser Zeit abgebaut wurde.

### 3.2.12 Zur Substratspezifität

Bei Untersuchungen an bisher bekannten Phospholipasen hat man gesehen, dass einige Enzyme sehr spezialisiert nur ein oder zwei Phospholipidsorten als Substrat akzeptieren. Andere Enzyme sind weniger spezifisch. Oftmals beeinflussen die FS-Ketten die jeweiligen Aktivitäten. Hierbei können sowohl der Sättigungsgrad, als auch die Kettenlänge eine Rolle spielen. Es liegt auf der Hand, dass man für derart feine Untersuchungen mit einer reinen Enzymfraktion arbeiten muss, die keinesfalls Restaktivitäten von anderen Phospholipasen enthalten darf. Dieses war für unsere teilgereinigte Fraktion nicht ganz auszuschließen.

Auch wenn an dieser Stelle keine detaillierten Untersuchungen zur Substratspezifität erfolgen können, haben wir getestet, inwiefern die teilgereinigte Enzymfraktion (nach ConA-Batchverfahren und IEF) in der Lage ist, unter sauren Bedingungen andere Phospholipide als PC zu spalten. Die Tests erfolgten in Gegenwart von Triton X-100. Nach HPTLC-Entwicklung wurden die Lipide mit den Sprühreagenzien Rhodamin B oder  $\alpha$ -Naphthol auf der Platte sichtbar gemacht.

Als Positivkontrolle wurden die Phospholipide mit einer kommerziell erworbenen  $PLA_2$  (s $PLA_2$  aus Schweinepankreas, Assay hier bei pH 7,4) geschnitten<sup>9</sup>. Außerdem wurde jedes Lipid mit einer hitzeinaktivierten (30 min,  $80^\circ\text{C}$ )  $PLA_1$ -Fraktion inku-

<sup>9</sup>Eine  $PLA_1$  war kommerziell nicht erhältlich. Bei der  $PLA_2$ -Hydrolyse entstehen jedoch ebenfalls ein Lysophospholipid und eine freie FS, welche in der HPTLC das gleiche Laufverhalten zeigen, wie die Produkte der  $PLA_1$ -Hydrolyse, sofern sn-1 und sn-2-Position des Glycerols mit derselben FS verestert sind. Ist dies nicht der Fall, so ist das Laufverhalten der Hydrolyseprodukte von  $PLA_1$  und  $PLA_2$  zumindest sehr ähnlich.

biert und das eingesetzte Lipid ohne sonstige Zusätze als Standard auf der HPTLC mitlaufen gelassen.

Alle Assays enthielten ausschließlich das jeweils zu testende Lipid (keine Lipidmischungen) in Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,5 mit 0,1 mM EDTA und 0,1% Triton X-100. Als Substrataggregate dienten hier also nicht Liposomen, sondern Detergenzmizellen.

Die Ergebnisse fasst Tabelle 3.9 zusammen: sPLA<sub>2</sub> ist in der Lage, mit Ausnahme von BMP, alle getesteten Lipide zu schneiden. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> zeigt ebenfalls eine breite Substratspezifität und schneidet bis auf BMP und SM alle untersuchten Phospholipide.

Lipid	sPLA <sub>2</sub>	PLA <sub>1</sub>
PE	ja	ja
PS	ja	ja
PI	ja	ja
PA	ja	ja
PG	ja	ja
SM	ja	nein
CL	ja	ja
BMP	nein	nein

**Tabelle 3.9: Von sPLA<sub>2</sub> und PLA<sub>1</sub>-Fraktion geschnittene Phospholipidsubstrate.** Die Assays enthielten nur das zu testende Lipid in 50 mM Natrium-Acetat Puffer, pH 4,5, 0,1 mM EDTA und 0,1% Triton X-100 und wurden nach Enzymzugabe für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach HPTLC-Lauf wurden die Lipide mit dem Sprühreagenz Rhodamin-B auf der Platte sichtbar gemacht. Ein „Ja“ kennzeichnet die Proben, in welchen das eingesetzte Lipid prozessiert wurden, bei „nein“ erfolgte keine Hydrolyse.



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden zum ersten Mal Daten zur möglichen Identität und zu den Katalysemechanismen der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus Makrophagen präsentiert. Über Con A-Sepharose, IEF, Affinitätschromatographie und Gelfiltration wurden aus NH<sub>4</sub>Cl-behandelten RAW-B-Zellkulturüberständen zwei Proteinsequenzen identifiziert, welche beide für die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität verantwortlich sein könnten: PLD4 und LOC71772. Dabei ist PLD4 aufgrund seines Vorkommens in allen Proben mit angereicherter PLA<sub>1</sub>-Aktivität der sehr viel wahrscheinlichere Kandidat.

Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde diese Enzymaktivität gefunden und untersucht [58, 155]. In den 80er und 90er Jahren beschrieben eine Reihe von Publikationen eine saure PLA<sub>1</sub>-Aktivität in verschiedenen Organen, wobei die damaligen Studien hauptsächlich Leber und Niere als Ausgangsmaterialien für die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität verwendeten. Es kam während dieser Studien jedoch nie zu einer Sequenzierung des Enzyms. Infolgedessen ist auch das codierende Gen bis heute unbekannt geblieben und man weiß bis heute sehr wenig über die physiologische Rolle dieser Hydrolase und ihre Katalysemechanismen.

In dieser Arbeit werden auch die katalytischen Eigenschaften der lysosomale PLA<sub>1</sub> erstmals ausführlich charakterisiert. Wir konzentrierten uns hier auf die PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus Makrophagen, da diese Zellen als professionelle Phagozyten in besonderem Maße auf die Hydrolyse von aufgenommenen Phospholipiden angewiesen sind. Dabei konnten wir zeigen, dass die Aktivität der PLA<sub>1</sub> von der Lipidzusammensetzung der Membran, an welcher sie arbeitet, moduliert wird. Anionische Phospholipide wirken dabei stark aktivierend. Darunter auch das spezielle Lipid BMP, welches nur in späten Endosomen/Lysosomen vorkommt und dort möglicherweise genau die Aufgabe hat, den Lipidabbau im Lysosom zu regulieren.

Von unserer Gruppe konnte bereits gezeigt werden, dass DLCL aus Mykobakterien, an CD1-Moleküle gebunden, an T-Zellen präsentiert werden kann. DLCL entsteht durch Einwirkung von PLA<sub>1</sub> oder PLA<sub>2</sub> auf Cardiolipin [54]. Die lysosomalen PLAs

scheinen daher auch für die Prozessierung von Lipidantigenen eine Rolle zu spielen.

Eine wichtige Voraussetzung, um die physiologische Rolle der lysosomalen PLA<sub>1</sub> detailliert zu erforschen, ist die Aufklärung ihrer Struktur und das Auffinden des sie codierenden Gens. Während die lysosomale PLA<sub>2</sub> in den letzten Jahren identifiziert und untersucht werden konnte [197], ist zu der lysosomalen PLA<sub>1</sub> bis heute sehr wenig bekannt. Diese Arbeit trägt dazu bei, diese Lücke zu schließen.

### 4.1 Entwicklung der Reinigungsstrategie der lysosomalen PLA<sub>1</sub>

Für die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> mussten drei Fragen beantwortet werden:

1. Wie wird das Protein nachgewiesen?
2. Aus welchem Material soll gereinigt werden?
3. Welche Methoden eignen sich zur Reinigung?

Die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität wurde mittels HPTLC unter Verwendung von radioaktiv markiertem PC gemessen. Ein angemessenes Assaysystem für die Proteinreinigung muss untereinander vergleichbare Ergebnisse liefern. Während der Reinigung wird die Enzymfraktion in unterschiedlichen Puffern mit unterschiedlichen Ionenkonzentrationen vorliegen. Wie im Charakterisierungsteil gezeigt, hängt die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität stark von den Pufferbedingungen ab. Bietet man das Substrat hingegen als Detergenzmizelle mit Triton X-100 an, so spielt die Ionenkonzentration des Puffers keine Rolle mehr. Im Reinigungsteil wurde die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität daher durchgängig in Anwesenheit von 0,1% Triton X-100 gemessen. Um Ca<sup>2+</sup>-abhängige PLA-Aktivitäten zu unterbinden, wurde dem Puffer 1 mM EDTA zugesetzt. Der pH-Wert des Assaypuffers wurde auf 4 eingestellt. Bei jedem Assay wurde sicher gestellt, dass der pH-Wert in den Versuchsansätzen auch nach Zugabe der Probe bei 4 lag.

Der Ausgangspunkt unseres Interesses an der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität war die Vermutung, dass sie bei der Prozessierung von Lipidantigenen im Makrophagen eine Rolle spielen könnte. Eine Hauptaufgabe von Makrophagen ist die Aufnahme und der Verdau von fremden und körpereigenem partikulärem Material [216]. Es ist daher denkbar, dass das Makrophagenlysosom über eine spezielle Ausstattung an Lipasen für diese Aufgabe verfügt. Der Makrophage exprimiert möglicherweise eine lysosomale PLA<sub>1</sub>, welche sich von den in anderen Zelltypen synthetisierten unterscheidet. Aus die-

sem Grund entschieden wir uns, die Isolierung des Enzyms aus der Mausmakrophagen-ähnlichen Zelllinie RAW B vorzunehmen und nicht, wie frühere Publikationen, aus ganzen Organen wie Leber oder Niere.

Für die ersten Reinigungsversuche präparierten wir mittels subzellulärer Fraktionierung Lysosomen aus den RAW B-Zellen. Diese aufwendige Methode eignete sich jedoch nicht, die benötigten großen Mengen an Ausgangsmaterial für die PLA<sub>1</sub>-Isolation bereit zu stellen. Wir testeten daher die Möglichkeit, lysosomale PLA<sub>1</sub> aus Zellkulturüberständen aufzureinigen. Durch Zusatz von NH<sub>4</sub>Cl in die Zellkultur kann die Sekretion von lysosomalen Proteinen erzwungen werden. Dieses lysomotrophe Amin führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes der sauren intrazellulären Kompartimente wie spätes Endosom und Lysosom und unterbindet damit die Dissoziation des Komplexes aus MPR und lysosomalem Enzym [154]. Die MPRs können nun nicht mehr zum TGN zurückkehren, um weitere M6P-markierte lysosomale Proteine zum späten Endosom zu transportieren. Dadurch erschöpft sich ihr Kontingent im GA schnell, was zur Sekretion der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme in das Medium führt [27, 64]. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode zur Materialbeschaffung für die Reinigung war, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> als aktives Enzym sezerniert wird. Häufig werden lysosomale Enzyme als inaktive Pro-Enzyme synthetisiert und erst im späten Endosom/Lysosom durch proteolytische Spaltung aktiviert [73]. Auf diese Weise sind ER, GA und Transportvesikel vor einem hydrolytischen Angriff dieser Enzyme geschützt.

Wie der Test der Zellkulturüberstände ergab, findet sich hier bereits ohne Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl saure PLA<sub>1</sub>-Aktivität (Abbildung 3.1). Dies ist nicht ungewöhnlich, da in der Regel bis zu 30% der neusynthetisierten lysosomalen Enzymvorstufen physiologisch sezerniert werden [110]. Der genaue Anteil variiert zwischen den unterschiedlichen Zellarten. (Über den MPR-300 können diese wieder von der Zelle oder von Nachbarzellen internalisiert und normal prozessiert werden [72])

Etwas ungewöhnlicher ist hingegen die Tatsache, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> im Zellkulturüberstand aktiv ist. Offenbar wird dieses Enzym nicht als inaktives Pro-Enzym synthetisiert. Dieses könnte damit erklärt werden, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> ausschließlich bei sehr sauren pH-Werten von 4-5 aktiv sein kann, wie sie allein im Lysosom vorkommen. Wie die in dieser Arbeit präsentierten Daten belegen (Abbildung 3.17), ist das Enzym bei höheren pH-Werten, wie sie im GA oder im Extrazellularraum herrschen, komplett inaktiv.

Der Zusatz von NH<sub>4</sub>Cl in die Zellkultur erhöht die von den RAW B-Zellen ausgeschiedene Enzymmenge noch deutlich (Abbildung 3.1). Dies deutet darauf hin, dass

die lysosomale PLA<sub>1</sub> (zumindest auch<sup>1</sup>) über den M6P-abhängigen Segregationsweg in das Lysosom gelangt. Ein weiteres Indiz für diese Schlussfolgerung ist die Tatsache, dass bei Patienten mit Mukopolidose II und III die Serumkonzentration an lysosomaler PLA-Aktivität ansteigt. Bei diesen lysosomalen Speicherkrankheiten werden die lysosomalen Enzyme im TGN nicht mit dem M6P-Sortierungssignal ausgestattet. Grund hierfür sind Gendefekte, welche die beteiligten Enzyme betreffen. In der Folge werden die normalerweise M6P-sortierten lysosomalen Enzymvorstufen sezerniert [93].

Die Versuche zeigten, dass für die Isolierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> mit NH<sub>4</sub>Cl-behandelte RAW B-Zellkulturüberstand verwendet werden konnten.

Um die geeigneten Reinigungsmethoden der lysosomalen PLA<sub>1</sub> zu ermitteln, testeten wir eine Reihe von üblichen Proteinreinigungsmethoden. Das Spektrum reicht von unspezifischeren Methoden, wie fraktionierende Ammoniumsulfatfällung oder Triton X-114 Phasentrennung über Ionenaustausch-Chromatographien bis hin zu den spezifischeren Lektin-Chromatographien. Die Tabelle 3.1 fasst die getesteten Methoden zusammen. Dabei zeigte sich, dass die meisten dieser Methoden für die Isolierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> nicht geeignet waren.

Grundsätzlich kann man den Erfolg eines Reinigungsschrittes anhand von zwei Parametern bestimmen: dem Reinigungsfaktor und der Ausbeute. Der Reinigungsfaktor ergibt sich aus dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten vor und nach einem Reinigungsschritt, wobei die spezifische Aktivität als der Quotient aus Aktivität pro Volumen und Proteinkonzentration definiert ist. Man berechnet also, um welchen Faktor das Enzym in Relation zu allen in der Lösung befindlichen Proteinen angereichert wurde. Die Ausbeute hingegen gibt darüber Aufschluss, wie viel des Enzyms durch den Reinigungsschritt verloren wurde. Hierzu vergleicht man die Gesamtaktivitäten der Probe vor und nach dem Reinigungsschritt. Ein Verlust des zu reinigenden Proteins kann dadurch verursacht werden, dass es nicht vollständig vom Säulenmaterial eluiert werden kann. Da man zusätzlich nur mit den Fraktionen mit dem besten Anreicherungsfaktor weiterarbeitet, verliert man einen Anteil des Proteins durch das Verwerfen der nicht ganz so reinen Fraktionen. Beim Umgang mit Enzymen kann ein Verlust an Gesamtaktivität auch durch einen Aktivitätsverlust des Enzyms bei der Reinigung verursacht werden.

Hubert Rehm empfiehlt in seinem Buch, von Reinigungsstufen mit einer Ausbeute von weniger als 30% oder mit einem Reinigungsfaktor von weniger als 5 Abstand zu nehmen [171]. Es zeigte sich, dass die meisten getesteten Reinigungsmethoden die-

---

<sup>1</sup>Dies schließt nicht aus, dass parallel auch ein alternativer Segregationsweg verwendet wird.

se Voraussetzungen nicht erfüllten. Bei vielen dieser Methoden wurde nur eine sehr schlechte Anreicherung erhalten. Dies kann teilweise daran gelegen haben, dass die Aktivität auf der Säule verloren ging. Solch ein Aktivitätsverlust fand wahrscheinlich bei der Kationenaustausch-Chromatographie und der HPLC statt. In den meisten anderen Fällen lag das Problem in einer unzureichenden Fraktionierung. Die Aktivität eluierte nicht als definierter Peak, sondern „schmierte“ über einen breiten Bereich der aufgefangenen Fraktionen. Dieses Problem konnte bei den Anionenaustauschern, der IEF und der Gelfiltration beobachtet werden.

Erklärt werden kann dieses Verhalten mit dem wahrscheinlich hohen Glykosylierungsgrad der lysosomalen PLA<sub>1</sub>. Lysosomale Enzyme werden bei ihrer Synthese in ER und GA glykosyliert. So besitzen alle lysosomalen Proteine über Asparaginreste N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidseitenketten, bei einigen sind auch O-Glykosylierungen bekannt [123]. Die N-glykosidisch verknüpften Zuckerketten sind häufig vom mannosereichen Typ, es wurden aber auch Oligosaccharide vom komplexen oder hybriden Typ gefunden [95, 111, 207].

Eine generelles Phänomen glykosylierter Proteine ist, dass sie selten als einzige, reine Spezies vorliegen. Vielmehr findet man, dass dieselbe Polypeptidkette mit variierenden Glykosylierungsgraden vorkommt. Man bezeichnet dieses als „Mikroheterogenität“ von Glykoproteinen. Sie kann durch inkomplette Biosynthese verursacht werden. Oftmals findet sie aber auch aufgrund post-synthetischer partieller Degradationsprozesse innerhalb der Zelle oder während der Isolierung des Proteins statt [187]. Als Folge entstehen verschieden geladene Varianten der glykosylierten Polypeptidkette, was in Chromatographien oder IEF zu breiten Banden und/oder mehreren Peaks desselben Polypeptids führen kann [176]. Diesen Effekt haben wir sowohl bei den Anionenaustausch-Chromatographien, als auch bei der IEF der lysosomalen PLA<sub>1</sub> gesehen (siehe Abbildung 3.3).

Lysosomale Proteine tragen zusätzlich Phosphorylierungen an den M6P-Resten, welche negativ geladen sind. Eine partielle Degradation der M6P-Reste trägt hier ebenfalls zur Entstehung unterschiedlich geladener Proteinspezies bei. In Studien des lysosomalen Proteoms konnten Sleat *et al.* sehen, dass lysosomale Proteine im Durchschnitt zwei M6P-Reste tragen, manche nur einen, andere aber sogar fünf, wie das hier gefundene LOC196463 [207].

Es wäre zudem denkbar, dass es zelltypische und/oder stoffwechselabhängige Unterschiede in den Glykosylierungs- und Phosphorylierungsmustern gibt.

In 2D-Gelen schlägt sich die Mikroheterogenität eines Glyko- und/oder phosphorylierten Proteins oft in einem typischen „Kettenmuster“ nieder, welches auf die un-

terschiedlichen isoelektrischen Punkte der Isoformen zurückzuführen ist.

Unterschiedliche Glykosylierungsgrade wirken sich nicht nur auf die Ladung, sondern auch auf die Größe der Protein-Isoformen aus. Damit wird auch die Fraktionierung aufgrund von Größenunterschieden schwierig. In der Gelfiltration eluieren Glykoproteine in der Regel bei einem höheren apparenten Molekulargewicht als globuläre Proteine gleicher Masse. Auch hier ist die Elution in breiten Peaks häufig zu sehen [176]. Wie man in Abbildung 3.8 sieht, eluiert auch die lysosomale PLA<sub>1</sub> über mehrere Fraktionen.

Ein nahe liegender Gedanke war, die lysosomale PLA<sub>1</sub> vor Beginn der Reinigungsschritte zu deglykosylieren. Die Notwendigkeit, das Enzym über seine Aktivität zu identifizieren, erlaubte nur den Einsatz einer nativen, enzymatischen Deglykosylierung. Ein Problem von Glykosidase-Behandlung unter nativen Bedingungen kann sein, dass aufgrund der Proteinfaltung nicht alle Zuckerketten zugänglich sind und daher nicht vollständig abgebaut werden können. Ein zweites, daraus folgendes, Problem ist die Notwendigkeit, lange Inkubationszeiten anzusetzen. Oft muss eine Probe zur vollständigen Deglykosylierung über mehrere Tage bei 37°C inkubiert werden. Wir haben die Verwendung der nativen Deglykosylierung mit den Endoglykosidasen F (F1, F2, F3) und H getestet. Der Verdau führte jedoch zum Verlust der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus der Probe (nicht gezeigte Beobachtung). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Glykosylierungen für die Stabilität des Enzyms wichtig sind. Für andere lysosomale Hydrolasen konnte bereits gezeigt werden, dass Glykosylierungen für Stabilität und Aktivität wichtig sind, in manchen Fällen auch für die Beibehaltung der korrekten Proteinkonformation [53, 66, 246]. Zusätzlich schützen Glykosylierungen die Polypeptidkette gegen proteolytischen Abbau [115]. Dies ist eine wichtige Voraussetzung dafür, dass sich die lysosomalen Hydrolasen im Lysosom nicht gegenseitig verdauen. Eine Entfernung der Zuckerketten kann daher den proteolytischen Abbau des Enzyms begünstigen. Aufgrund des Verlustes der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität beim Glykosidase-Verdau war es nicht möglich, die Reinigung an einer deglykosylierten Form des Enzyms durchzuführen.

Glykosylierungen bringen jedoch keineswegs nur Probleme mit sich, sondern können für die Proteinreinigung auch ausgenutzt werden: Bestimmte Moleküle, die so genannten Lektine, sind in der Lage, Glykoproteine über ihre Zuckerstrukturen zu binden und erlauben so ihre Anreicherung. Lektine sind per Definition multivalente Proteine nicht-immunologischen Ursprungs und ohne katalytische Aktivität, welche relativ spezifisch an Kohlenhydrate binden [168]. Für die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> haben wir drei Lektine mit unterschiedlichen Spezifitäten getestet: WGA,

Jacalin und Con A.

WGA bindet N-Acetylglucose, GlcNAc und, mit geringerer Affinität, Sialinsäurereste. In unseren Versuchen variierte die Affinität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> zu WGA in den unterschiedlichen Proben erheblich. Es wurde ein variabler Anteil des Enzyms gebunden, eine quantitative Bindung fand nicht statt. Da GlcNAc häufig als abschließendes Monosaccharid auf den Zuckerketten sitzt (siehe Seite 2), ist es bezüglich einer Degradation besonders anfällig. Das heterogene Bindungsverhalten der Proben mit lysosomaler PLA<sub>1</sub>-Aktivität kann daher auch hier mit partieller Degradation erklärt werden.

Jacalin ist spezifisch für O-glykosidische Bindung. Die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität wurde von diesem Lektin nicht gebunden und scheint demnach keine O-Glykosylierungen zu besitzen.

Con A-Matrices binden spezifisch an Mannosyl- und Glukosylreste. Dieses Lektin war in der Lage, die lysosomale PLA<sub>1</sub> quantitativ zu binden. Das war zu erwarten, da lysosomale Proteine häufig N-Glykosylierungen des mannosereichen Typs aufweisen [111]. Allerdings erfolgte die Elution mit  $\alpha$ -D-Methylmannopyrannosid auch hier in einem breiten Peak. Wir sind daher dazu übergegangen, das Enzym im Batch-Verfahren mittels eines Stufengradienten zu eluieren. Wie sich an der Reinigungstabelle 3.3 zeigt, wurden bei dieser Methode Ausbeuten von über 100% erreicht. Ein solches, theoretisch nicht mögliches, Ergebnis kann damit erklärt werden, dass möglicherweise inhibitorisch wirkende Substanzen durch den Batch abgetrennt wurden. Etwas ähnliches wurde von Löffler *et al.* beschrieben, welche sich in den 80er Jahren mit der Reinigung einer sauren PLA<sub>1</sub> aus Rattenleber beschäftigten [127]. Aufgrund der damals gemessenen spezifischen Aktivitäten vermuteten diese Autoren ebenfalls, dass in den Ausgangsfractionen ein Inhibitor der PLA<sub>1</sub>-Aktivität vorhanden gewesen war, der im Laufe der Isolierung abgetrennt worden war.

Von den von uns getesteten klassischen Proteinreinigungsmethoden haben wir für die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität nur noch den Con A-Batch, die IEF und die Gelfiltration eingesetzt. Dabei diente der Con A-Batch der Abtrennung der nicht-glykosylierten Kontaminanten. Der Einsatz der IEF war trotz der breiten Fokussierungspeaks gerechtfertigt, da die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität in sehr niedrigen pI-Bereichen von unter 4,5 fokussierte, was eine Isolierung von vielen anderen, weniger sauren, Proteinen erlaubte. Das endgültige Reinigungsverfahren wird weiter unten noch diskutiert werden. Zunächst sollen auf die Versuche zur Rückgewinnung der PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus SDS-Gelen eingegangen werden.

## 4.2 Renaturierung der PLA<sub>1</sub>-Aktivität

Da die klassischen Methoden zur Proteinreinigung im Falle der lysosomalen PLA<sub>1</sub> keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, entwickelten wir eine Methode, PLA<sub>1</sub>-Aktivität nach SDS-PAGE zu renaturieren. In der Literatur existieren recht viele Protokolle, um rekombinante Proteine aus Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) von Bakterien in die native Proteinfaltung zu überführen [38]. Im Gegensatz dazu gibt es nur sehr wenige Veröffentlichungen zur Renaturierung von Proteinen nach SDS-PAGE. Bei den bisher aus SDS-PAGE renaturierten Enzymen handelt es sich vor allem um DNA-bindende Proteine, RNase-Polymerase und einige bakterielle Enzyme aus *Escherichia coli* [5, 29, 71, 121, 156, 236]. Die Autoren verwendeten hier Protokolle, welche die Elution der Proteine, ihre Fällung, ihre komplette Entfaltung mittels Guanidinium-Hydrochlorid und ihre Renaturierung über Verdünnung oder Dialyse beinhalteten. Für verschiedene Kinasen und eine virale Neuraminidase existieren Methoden, die Enzyme im Gel zu reaktivieren und ihren Nachweis mit Hilfe von fluoreszierenden Substraten ebenfalls im Gel zu erbringen [121, 236]. Letzteres war mangels eines entsprechenden Substrates für die lysosomale PLA<sub>1</sub> leider nicht möglich.

Wir testeten die von den oben genannten Autoren verwendeten Protokolle für die Renaturierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>. Es war auf diese Art jedoch nicht möglich, Aktivität zurückzugewinnen.

Zur Renaturierung von Proteinen nach Entfaltung durch SDS ist ein Entfernen der SDS-Moleküle von der Polypeptidkette notwendig. Mitte der 90er Jahre konnten Rozema und Gellmann zeigen, dass Cyclodextrine (CDs) diesen Zweck erfüllen können [182]. Diese ringförmigen Moleküle sind in der Lage, SDS zu komplexieren und dadurch diese Detergenzmoleküle von der Aminosäurekette zu entfernen. Die aufeinander folgende Verwendung von denaturierendem Detergenz und CDs ähnelt dem Wirkmechanismus der Chaperone GroEL/S im ER, weshalb die Methode *artificial chaperone-assisted refolding* („von künstlichen Chaperonen vermittelte Rückfaltung“) genannt wurde [40, 182].

In Vortests konnten wir zeigen, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> sowohl nach SDS-, als auch nach Urea-Denaturierung unter Verwendung von  $\beta$ -CD rückfaltbar war. Des Weiteren war es möglich, das Enzym nach reduzierendem und nicht-reduzierendem SDS-PAGE aus dem Gel zu eluieren, zu renaturieren und seine Aktivität in einem Größenbereich von 28-50 kDa nachzuweisen. Wir fanden in diesem Bereich zwei Peaks: einen bei ca. 34 kDa und einen weiteren bei ca. 45 kDa. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass sich die Aktivität nicht aus allen Gelstücken gleichmäßig zurück-

gewinnen ließ. Es wäre jedoch auch denkbar, dass wir es mit zwei Isoenzymen zu tun haben. Für letztere Erklärung spricht, dass auch in der IEF zwei Peaks erhalten wurden.

Ungeachtet der favorisierten Erklärung wird deutlich, dass die PLA<sub>1</sub>-Aktivität auch im SDS-PAGE eher in einer breiten „Wolke“ denn in einer distinkten Bande läuft. Auch dies ist ein für Glykoproteine typisches Verhalten und wird ebenfalls durch ihre Mikroheterogenität verursacht [176]. Zusätzlich binden Glykoproteine weniger SDS-Moleküle in Relation zu ihrer Masse als nicht-glykosylierte Proteine. Dadurch erhalten sie eine geringere negative Gesamtladung, woraus eine verminderte Mobilität im Gel resultiert. In der Folge laufen sie bei höheren apparenten Molekulargewichten, als es ihrer tatsächlichen Masse entsprechen würde.

### 4.3 Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität

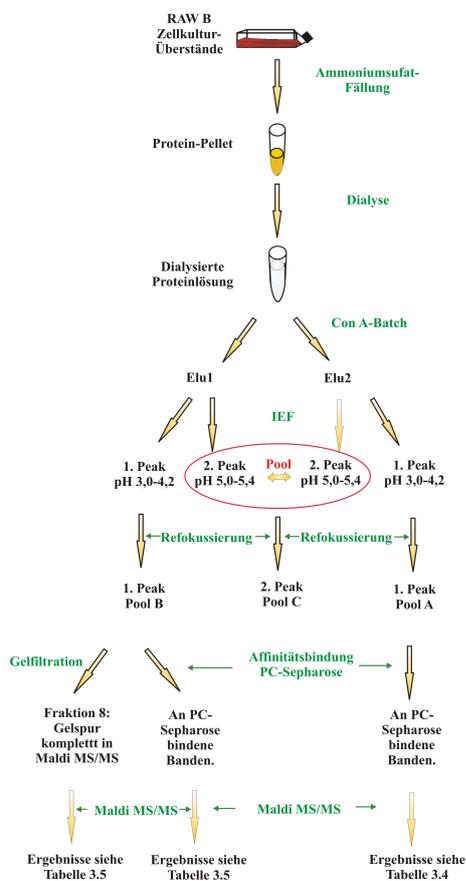
Um ausreichend große Mengen an Ausgangsmaterial für die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> bereit zu stellen, wurden über einen Zeitraum von fünf Monaten Zellkulturüberstände von mehr als 1000 großen Zellkulturflaschen gesammelt. Auf diese Weise konnten wir für die Reinigung von einer Proteinmenge von 1,8 g nach Ammoniumsulfatfällung ausgehen (siehe Tabelle 3.3). Nach Con A-Batch konnte in allen Fraktionen (ÜS-, Wasch- und Elutionsfraktionen) zusammen nur noch ca. 1,1 g wiedergefunden werden. Der hohe Verlust an Gesamtprotein ist durch unerwünschte Proteinpräzipitation während des Batches verschuldet. Es ist zusätzlich möglich, dass die PLA<sub>1</sub>-Aktivität nicht vollständig von der Con A-Matrix eluiert werden konnte. Wie aus Tabelle 3.3 ebenfalls hervor geht, konnte die PLA<sub>1</sub>-Aktivität fast quantitativ an das Säulenmaterial gebunden werden. So konnten insgesamt nur ca. 5% der Aktivität in der Überstands- und Waschfraktion (je 2,6%) wiedergefunden werden. Die 1. Elution führte zu einer 7-fachen, die 2. Elution zu einer 15-fachen und die 3. Elution zu einer 14-fachen Anreicherung der PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Die Ausbeuten lagen bei diesen Elutionsfraktionen bei 45%, 135% und 7,7%. Gemessen an den bereits erwähnten Richtlinien (s.o. und [171]), eine 3-fache Anreicherung und eine Ausbeute von 30% nicht zu unterschreiten, sind diese Zahlen recht zufriedenstellend. Insgesamt konnten durch den Batch 840 mg der gesamten in der Fraktion befindlichen Proteine von der PLA<sub>1</sub>-Aktivität abgetrennt werden.

Wie weiter oben bereits angesprochen, kann die Ausbeute von 135% damit erklärt werden, dass möglicherweise ein Inhibitor der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität bei dem Batch abgetrennt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Proben der IEF unterworfen. Die Aktivität fokussierte in zwei Peaks, einen breiten ersten Peak im sehr sauren Bereich von weniger als pH 4 und einem zweiten Peak im Bereich pH 5,0-5,4. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität von zwei Isoenzymen verursacht wird. Bei der IEF von Lysosomenpräparationen aus RAW B-Zellen erhielten wir ein entsprechendes Aktivitätsmuster mit zwei distinkten Scheitelpunkten. Das zeigt zum einen, dass die potenziellen Isoenzyme nicht nur in der sezernierten lysosomalen Fraktion zu finden sind, sondern auch innerhalb der Zelle in dieser Weise vorkommen. Zum anderen rechtfertigt dieses Ergebnis das Vorgehen, die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus Zellkulturüberständen aufzureinigen. Die so gewonnene PLA<sub>1</sub>-Aktivität scheint mit der in Lysosomen vorhandenen identisch zu sein.

Während der zweite Peak (pH 5,0-5,4) in der SDS-PAGE noch sehr viele Proteinbanden aufwies, war die Gelspur des ersten Peaks (<4.0) schon wesentlich „sauberer“. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns im Folgenden auf die Reinigung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus den sauren Peaks der Con A-Elutionsfraktionen.

Da die klassischen Proteinreinigungsmethoden für die hier durchgeführte Enzymreinigung versagten, konstruierten wir eine PLA<sub>1</sub>-bindende Affinitäts-Matrix. Wir wählten zwei potentielle Affinitätsliganden für die Bindung an aktivierte Sepharose. Zum einen Rosenthals Inhibitor, zum anderen 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine. Rosenthals Inhibitor wurde 1960 von Rosenthal und Geyer [179] als Hemmstoff für PLA aus Schlangengift synthetisiert und wurde bereits erfolgreich als Affinitätsligand für die Isolierung von PLA<sub>2</sub>-Enzymen aus Echsen, Schlangen oder Amöben verwendet [228]. 1-O-Hexadecyl-2-Azelaoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine ist ein PC-Analogon, bei welchem die sn-1 Position über eine Etherbindung mit der Alkylgruppe verknüpft ist. Wahrscheinlich kann diese Bindung nicht von der lysosomale



**Abbildung 4.1:** Diagramm der Reinigungsschritte, welche zur Anreicherung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität eingesetzt wurden.

PLA<sub>1</sub> hydrolysiert werden. Derivate dieses Moleküls wurden bereits zur Isolierung von PLA<sub>2</sub>-Enzymen aus verschiedenen Organismen eingesetzt [17, 46, 178, 219].

Die hergestellten Affinitätsmatrices wurden mit einer Probe aus Pool B der IEF auf die Fähigkeit getestet, lysosomale PLA<sub>1</sub> zu binden. Während die Enzymaktivität bei Inkubation der Probe mit Rosenthal-Sepharose im ÜS verblieb, war sie nach Inkubation der Probe mit PC-Sepharose im ÜS nicht mehr messbar (Abbildung 3.6). Das deutet darauf hin, dass das Enzym an die Matrix gebunden hatte. Dieser Effekt unterlag einer Sättigung, welche der Bindungskapazität der Affinitätsmatrix entspricht. Der Verlust der Aktivität aus dem ÜS ging mit einem Verlust von zwei Proteinbanden aus dem Bandenmuster im SDS-Page einher. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Banden für die Enzymaktivität verantwortlich sind. Daher behandelten wir anschließend je eine Probe aus Pool A und Pool B mit PC-Sepharose und analysierten diejenigen Proteinbanden mittels LC/MS/MS, welche an die Matrix gebunden hatten.

#### 4.4 Interpretation der Massenanalysen

In allen Proteinbanden, welche an die PC-Sepharose gebunden hatten, befand sich das gleiche Protein: PLD4 (Tabelle 3.4). Seine Proteinsequenz wurde aus cDNA-Datenbanken abgeleitet und aufgrund von Homologien zu anderen PLDs PLD4 genannt. Soweit uns bekannt ist, wurde die Sequenz bisher nie auf Proteinebene nachgewiesen. Neben diesem Protein kommt auch Preprocathepsin B in allen untersuchten Banden vor, welches eine lysosomale Protease ist. Der Vorläufer der lysosomalen Aktivatorproteine (Prosaposin) und der Proteasen Cathepsin Z und O sind ebenfalls in einigen Banden vorhanden. Da unsere Proteinreinigung aus Zellkulturüberständen erfolgte, ist ein Vorkommen von lysosomalen Vorläufern zu erwarten. Wie weiter oben geschildert, werden viele lysosomale Proteine erst im sauren Milieu des späten Endosoms proteolytisch aktiviert. Zusätzlich zu diesen lysosomalen Proteinen finden wir solche, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, wie der Makrophagen-koloniestimulierende Faktor Rezeptor, CD44 oder der Interleukin-6-Rezeptor. Diese Moleküle sind wahrscheinlich durch proteolytische Abspaltung von der Plasmamembran in den Zellkulturüberstand gelangt.

Von den in diesen Proben gefundenen Proteinen ist nur für PLD4 bisher keine Funktion bekannt. Die Sequenz besitzt das für PLDs und verwandte Phosphodiesterasen typische HKD-Motiv. Es stellte sich daher die Frage, ob wir ungewollt eine PLD kogeinigt hatten. In einer Serie von sorgfältigen Tests konnten wir jedoch ausschließen, dass sich in unserer Probe PLD-Aktivität befand. Somit ist es unwahrscheinlich, dass

sich hinter der PLD4 eine PLD-Aktivität verbirgt.

Die Massenanalyse der Gelfiltrationsprobe lieferte im Wesentlichen eine Liste von 24 Proteinen (Tabelle 3.5). Interessanterweise finden sich hier hauptsächlich lysosomale Proteine. Auch hier findet man vor allem Vorläuferproteine. In einigen Fällen kann aus den gefundenen Peptidmassen nicht zwischen Vorläufer und reifem Protein unterschieden werden.

Von den meisten der hier gefundenen lysosomalen Proteinen weiß man, dass sie über M6P-Signal sortiert werden. Sie werden auch von Sleat *et al.* und Journet *et al.* in ihren globalen Studien zum lysosomalen Proteom gefunden [96, 205]. Diese Gruppen reinigten über MPR-Säulen Proteine mit M6P-Signal aus verschiedenen Quellen und analysierten die erhaltenen Fraktionen nach 2D-Gelelektrophorese in der Massenspektrometrie. Viele der von uns gefundenen Proteine wurden auch von diesen Autoren in M6P-positiven Fraktionen gefunden. Wir haben die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus mit NH<sub>4</sub>Cl-behandelten Zellkulturüberständen gereinigt. NH<sub>4</sub>Cl führt zu verstärkter Sekretion von M6P-sortierten lysosomalen Proteinen. Dieses konzentrierte Vorkommen von lysosomalen Proteinen in der analysierten Probe, welche auch von anderen Arbeitsgruppen als M6P-sortierte Proteine identifiziert wurden, kann gewissermaßen als positive Qualitätskontrolle für unsere Reinigung angesehen werden. Außerdem weist es darauf hin, dass die gefundenen Proteine im Lysosom mit einer gewissen Abundanz vorhanden sind.

Neben den bereits der Funktion nach bekannten Enzymen identifizierten wir in den Gelfiltrationsbanden, wie bereits in den Banden aus Affinitätsreinigung, die PLD4-Sequenz. Das konsistente Vorkommen dieser Sequenz in allen Proben weist darauf hin, dass es sich hierbei sehr wahrscheinlich um die gesuchte lysosomale PLA<sub>1</sub> handelt.

Zusätzlich fanden wir ein weiteres, in der Datenbank als „hypothetisches Protein LOC71772“ bezeichnetes Protein, welches aufgrund seiner Homologie zu PLB aus *D. discoideum* ebenfalls eine Phospholipase sein könnte.

Zu keinem dieser beiden Proteine gibt es bisher Daten bezüglich ihrer Funktion. Beide sind jedoch, was die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität angeht, viel versprechende Kandidaten. Welche Argumente sprechen nun für das eine oder andere Protein?

Zunächst soll die PLD4 betrachtet werden, da sie der wahrscheinlichere PLA<sub>1</sub>-Kandidat ist. Ihre Sequenz wurde aus cDNA-Banken abgeleitet. Sie wurde aufgrund der in ihr vorkommenden konservierten HKD/E-Motive PLD4 getauft. Das HKD-Motiv setzt sich aus der Sequenz HxK(x)<sub>4</sub>D(x)<sub>6</sub>GSxN zusammen und dient in fast allen bisher bekannten PLDs als katalytisch aktive Domäne. Um katalytisch aktiv zu sein muss es als Duplikat im Protein vorliegen, wobei beide HKD-Sequenzen für

die Substrathydrolyse assoziieren [217]. Die PLDs gehören zu einer Superfamilie von Phosphodiesterasen, in welcher auch PS- und CL-Synthasen, Virushüllproteine und Endonukleasen zu finden sind [109, 165].

Wir konnten in unseren PLD4-positiven Proben nach umfangreichen Untersuchungen keine PLD-Aktivität detektieren. Für die zu PLD4 homologen Sequenzen hPLD3 (Hu-K4), mPLD3 (Sam-9) und K4L aus Vaccinia Virus wurde eine PLD-Aktivität ebenfalls ausgeschlossen [158, 218]. Möglicherweise ist die fehlende Aktivität auf die Mutationen des zweiten HKD-Motivs in diesen Proteinen zurückzuführen, welches anstelle von  $\text{HxK(x)}_4\text{D(x)}_6\text{GSxN}$  die Sequenz  $\text{HxK(x)}_4\text{E(x)}_4\text{IGTSN}$  besitzt. Auch PLD4 trägt dieses zweite, mutierte HKD-Motiv. Offenbar erfüllen die hier erwähnten homologen Proteine eine andere Aufgabe als ihr Name bzw. ihre konservierten Sequenzmotive implizieren.

Könnte PLD4 also tatsächlich eine  $\text{PLA}_1$ -Aktivität besitzen? Im Gegensatz zu den PLDs, welche der Enzymklasse der Phosphodiesterasen angehören, sind  $\text{PLA}_1$  und  $\text{PLA}_2$  Acylesterasen. Daher erscheint es zunächst unwahrscheinlich, dass eine solche Aktivitätsverschiebung stattgefunden haben könnte. Dennoch wurde 1997 von Baek *et al.* berichtet, dass p37 aus Vaccinia Virus  $\text{PLA}_1$ ,  $\text{PLA}_2$  und PLC-Aktivität besitzt, jedoch keine PLD-Aktivität. p37 ist über einen Bereich von 186 Aminosäuren zu 30,6% mit der in dieser Arbeit gefundenen mPLD4 und über einen Bereich von 187 Aminosäuren zu 29,4% mit hPLD4 identisch, wobei in allen drei Polypeptiden dieselben Aminosäuresequenzen konserviert sind. Zwar ist das HKD-Motiv in p37 zu NKD mutiert, das Einführen von Histidin anstelle des Asparagins hat jedoch die Enzymaktivitäten nicht verändert. Das Vorkommen von  $\text{PLA}$ - und  $\text{PLC}$ -Aktivitäten in derselben Polypeptidkette ist sehr ungewöhnlich. Vielleicht hat sich die spezifische Aktivität des HKD-Motivs in Richtung Acylesterase verschoben. Es wäre auch möglich, dass es in p37 zwei unterschiedliche katalytische Zentren gibt, wobei eines Acylesterase und das andere Phosphodiesterase-Aktivität aufweisen könnte. Für die hier gefundene PLD4 bedeutet dies, dass das Vorkommen der HKD-Sequenz eine  $\text{PLA}_1$ -Aktivität nicht ausschließt. Interessant ist, dass die Bereiche, in welchen hPLD4 und p37 zu 30,6% identisch sind, nicht die Regionen der HKD-Motive betreffen. Im Gegensatz dazu bestehen außerhalb des HKD-Sequenzmotives *keinerlei* Homologien zwischen PLD4 und den bekannten humanen PLDs (PLD1 und PLD2). Wenn die  $\text{PLA}$ -Aktivität von p37 tatsächlich ein von HKD-unabhängiges katalytisches Zentrum verwendet, liegt das womöglich in jenen Sequenzbereichen, in welchen Homologie zu PLD4 besteht.

Auch zur Lokalisation von PLD4 ist bisher nichts bekannt. Die bioinformatischen Analysen räumen eine lysosomale Lokalisation, zumindest für hPLD4, ein. Von der

homologen PLD3 weiß man jedoch, dass sie in den LROs, wie den Melanosomen und den Neuromelanin Granula, vorkommt. Außerdem scheint PLD3, wie lysosomale Hydrolasen auch, über M6P-Signal sortiert zu werden. PLD3 soll vor allem im Gehirn exprimiert werden. Das Enzym ist relativ spezifisch für dieses Gewebe. Es wäre daher denkbar, dass in anderen Zelltypen homologe Proteine, wie die PLD4 oder auch die PLD5, ähnliche Aufgaben wie PLD3 übernehmen. Folgt man dieser Hypothese, so würde man auch für PLD4 eine Lokalisation im Lysosom erwarten.

Die stärksten Argumente dafür, dass PLD4 die gesuchte lysosomale PLA<sub>1</sub> ist, liegen jedoch in den Ergebnissen der Reinigung selber. PLD4-Peptide wurden in allen Banden gefunden, welche beim Affinitäts-Batchverfahren an die PC-Sepharose gebunden hatten. Nach Behandlung der Probe mit PC-Sepharose gingen jeweils zwei Proteinbanden aus dem Muster im SDS-PAGE verloren. Gleichzeitig wies die Überstandsfraktion des Batches keine PLA<sub>1</sub>-Aktivität mehr auf. Der Verlust der Banden korrelierte also mit einem Verlust an PLA<sub>1</sub>-Aktivität, was die Vermutung nahe legt, dass die nach dem Batch fehlenden Proteinbanden für die Aktivität verantwortlich waren. In jeder dieser Banden (auf 14 kDa, 20 kDa und 32 kDa) haben wir PLD4-Sequenzen gefunden. Die Elution der an die Affinitätssäule gebundenen Proteine stellte sich als sehr schwierig heraus. Durch Kochen der PC-Sepharose in Probenpuffer konnten wir jedoch im SDS-PAGE je zwei feine Banden bei den B-Proben auf Höhe von 14 kDa und 35 kDa, und bei den C-Proben auf Höhe von 20 kDa und 50 kDa finden.

Bei den Renaturierungsversuchen konnten wir auf zwei Höhen lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität zurückgewinnen: Im Bereich von 30-34 kDa und im Bereich von 45-50 kDa. Das korreliert gut mit den Molekulargewichtsbereichen der Proteine, welche an PC-Sepharose binden und weist einmal mehr darauf hin, dass PLD4 für die gereinigte PLA<sub>1</sub>-Aktivität verantwortlich ist.

Der andere von uns gefundene Kandidat, LOC71772, wurde nur in einer Gelfiltrationsprobe gefunden, wobei seine Identifikation leicht unter der Signifikanzgrenze lag. Folgende Betrachtung verdeutlichen, warum er dennoch interessant ist: Das stärkste Argument dafür ist seine Homologie zu der PLB aus *D. discoideum*. PLBs entfernen beide Acylgruppen aus Phospholipiden. Zu LOC71772 und dem humanen Homolog LOC196463 wurden kürzlich zwei Studien veröffentlicht [45, 95]. Diese konnten eine lysosomale Lokalisation für die Proteine nachweisen. Somit könnte es sich tatsächlich um eine lysosomale Phospholipase handeln. Des Weiteren wurden verschiedene Reifungsformen dieser Proteine identifiziert. Für das Mausprotein LOC71772 finden Deuschl *et al.* einen 75 kDa großen Vorläufer und fünf Fragmente mit apparenten Molekulargewichten von 66 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 28 kDa und 15 kDa [45]. In unseren

Renaturierungsversuchen konnten wir bei 30-34 kDa und 45-50 kDa Aktivität aus dem SDS-PAGE wiedergewinnen. Diese Daten passen nicht optimal zusammen, allerdings kann das Laufverhalten von Glykoproteinen mit der Polyacrylamid-Konzentration im Gel variieren [176]. Im 2D-Gel fand die Gruppe 5 Proteinpunkte (Spots) mit ca. 66 kDa im Bereich von pH 5-5,5, 7 Spots um ca. 40 kDa mit einem pI von 6,2-6,6 und 5 Spots mit apparenten Molekulargewicht von 30 kDa bei pH 4,2-4,5 [107]. Während wir bei pH>5,4 keine Aktivität in den IEFs fanden, erhielten wir zwei Aktivitätspeaks in den pH Bereichen von 5-5,4 und <4,4, also dort, wo die 66 kDa und die 30 kDa großen Fragmente von LOC71772 auch fokussieren. In unseren Massenanalysen haben wir LOC71772 jedoch nur in der Gelfiltrationsprobe auf Höhe von 45-50 kDa gefunden (nach Fokussierung bei pH<4,4).

Wie die Ausführungen zeigen, kann die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität durch beide gefundenen Kandidaten, PLD4 oder LOC71772, verursacht werden. Beide Kandidaten haben Homologien zu Phospholipasen, welche Acylketten von Phospholipiden entfernen können. PLD4 ist jedoch der wesentlich wahrscheinlichere Kandidat für die PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Damit hat man zum ersten Mal genauere Hinweise darauf, durch welche Proteinsequenz die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität codiert wird. Um jedoch sicher sagen zu können, welches der gefundenen Proteine tatsächlich die gesuchte lysosomale PLA<sub>1</sub> ist, bedarf es der Klonierung, rekombinanten Expression, Isolation und anschließendem Nachweis der PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Diese Arbeiten werden momentan von uns durchgeführt.

#### 4.4.1 Vergleich unserer Daten mit bisher publizierten Ergebnissen zur lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität

Bereits in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben eine Reihe von Publikationen eine saure PLA<sub>1</sub>-Aktivität in verschiedenen Organen. Einige Gruppen reinigten das verantwortliche Enzym mit hohen Anreicherungsfaktoren aus Leber und Niere, um grundlegende biochemische Tests durchzuführen. Dabei wurden Isoenzyme mit unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten gefunden. Die damals gewonnenen Daten sollen an dieser Stelle kurz mit unseren und denen von Deuschl *et al.* [45] und Jensen *et al.* [95] publizierten verglichen werden. Tabelle 4.1 fasst die wichtigsten Ergebnisse dieser Publikationen zusammen.

Die damaligen Reinigungen der PLA<sub>1</sub>-Aktivität wurden vor allem aus Leber und Niere von Ratte und Mensch vorgenommen. Die Autoren fanden, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität im Wesentlichen bei zwei apparenten Molekulargewichten (Gelfiltra-

#### 4. DISKUSSION

**Tabelle 4.1:** Bisherige Isolationen von PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus Säugerorganen

Autor	Organ/Zelle	MW (kDa)	pI	pH-Optimum
Hostetler <i>et al.</i> , 1982 [86]	Leber (Ratte)	34, 44	5,2	
Hostetler <i>et al.</i> , 1986 [85]	Niere (Ratte)	30	5,4	3,6-3,8
Löffler & Kunze <i>et al.</i> , 1987 [126]	Leber (Mensch)			4,7
Löffler & Kunze <i>et al.</i> , 1989 [127]	Leber (Ratte)	27, 55	5,3; 4,2-5	
Kunze & Löffler, 1989 [116]	Leber (Ratte, Mensch)	29	5,3	
Robinson & Waite <i>et al.</i> , 1983 [177]	Leber (Ratte)	56	<4,4	3,8-4
<b>LOC71772 und LOC196463</b>				
Jensen <i>et al.</i> , 2007 [95]	U-937 Monozyten (Mensch)	76, 45, 32	5, 7-8	-
Deuschl <i>et al.</i> , 2006 [45]	Fibroblasten (Maus)	75, 66, 50, 40, 28, 15	4,2-4,5; 5,0-5,5; 6,2-6,6	-
<b>Ergebnisse dieser Arbeit</b>				
Renaturierung		34, 45-50	<4,4	4-4,5
Affinitätsreinigung A-Pool		13, 32	<4,4	4-4,5
Affinitätsreinigung B-Pool		13, 20	<4,4	4-4,5
Affinitätsreinigung C-Pool		20, 50	5-5,4	4-4,5

tion) läuft: Bei ca. 30 kDa und bei ca. 56 kDa. Bezüglich der pI wurde eine breite Fraktion im sehr sauren Bereichen (pH<4,4) und ein Peak bei pH 5,2-5,4 gefunden. Dies stimmt sehr gut mit unseren Ergebnissen zur lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität überein, welche aus Makrophagen gewonnen wurden. Es ist daher möglich, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität ubiquitär exprimiert wird. Die damaligen Autoren konnten allerdings nur Aktivität gegen PC und PE detektieren, jedoch nicht gegen PS und PI. Im Gegensatz dazu hydrolysierten unsere Fraktionen auch PI, PS, PG und PA. Es bleibt daher unklar, ob und inwiefern die in Leber und Niere gefundene PLA<sub>1</sub> zu der von uns aus Makrophagen gereinigten homolog ist.

LOC71772 wird in der Maus in Leber und Niere kaum exprimiert [45]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass dieses Protein für die in den 80er Jahren in diesen Organen gefundenen PLA<sub>1</sub>-Aktivität verantwortlich ist. Dies ist ein weiterer Indiz dafür, dass die PLD4 für die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität verantwortlich ist. *Real time* PCR-Untersuchungen zeigen, dass PLD4 in Leber, Lunge, Niere und Milz exprimiert wird

(eigene Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe).

## 4.5 Zur Charakterisierung

Der zweite Teil dieser Arbeit diente der näheren Charakterisierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Dabei sollte ermittelt werden, unter welchen Bedingungen dieses Enzym am besten arbeitet, wie die Membranbeschaffenheit seine Aktivität beeinflusst und welches seine biochemischen Eigenschaften sind. Lipide und Membranproteine, welche zur Degradation bestimmt sind, gelangen in intralysosomale Membranstapel [108]. Hier stehen sie für den Abbau durch lysosomale Hydrolasen zur Verfügung. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch die lysosomale PLA<sub>1</sub> ihre Substrate in diesen internen Membranen findet.

Viele lipolytische Enzyme zeigen ein charakteristisches Aktivierungsverhalten bei der Bindung an hydrophil-hydrophobe Phospholipid-Wasser-Grenzflächen. Ihre Reaktionsgeschwindigkeit steigt sprunghaft an, wenn die Substrate in Aggregaten, z. B. Mizellen oder Membranen, organisiert sind. Monomere Substrate werden nicht oder nur sehr langsam umgesetzt [7].

Die besonderen Eigenschaften von grenzflächenaktiven Enzymen wurden insbesondere am Beispiel der sezernierten PLA<sub>2</sub>s untersucht. Dementsprechend existiert eine Fülle von Publikationen, welche sich mit den Besonderheiten dieser Enzymklasse und ihren Ursachen beschäftigt [242]. Auch einige Lipasen wurden ausgiebig untersucht [7]. Aus diesen Studien konnten eine Reihe von generellen Mechanismen abgeleitet werden, welchen Grenzflächenenzyme unterliegen können.

Zum Katalysemodus und den Grenzflächeneigenschaften der lysosomalen PLAs gibt es bisher wenig Daten. In den 80er Jahren durchgeführte Untersuchungen zur lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität verwendeten die unterschiedlichsten Assaysysteme unter Zugabe oder Ausschluss von Detergenzien. Dadurch ist es nicht möglich, die damals publizierten Daten untereinander und mit denen in dieser Arbeit beschriebenen zu vergleichen [162]. Nur in wenigen Artikeln wurden definierte Liposomen als Modellmembranen zur Präsentation der Phospholipidsubstrate eingesetzt. Als PLA<sub>1</sub>-haltiges Material dienten hier Lysosomen aus der Rattenleber [135, 137, 161].

Zu den Charakteristika der lysosomalen PLA<sub>1</sub> aus Makrophagen gibt es bisher keine Daten. Makrophagen sind als Phagozyten jedoch in besonderem Maße auf die Funktion ihrer lysosomalen Hydrolasen angewiesen. Sie dienen nicht nur der Degradation von phagozytiertem Material und dem Abbau körpereigener Moleküle, sondern sind auch

an der Generierung von Antigenen für die Präsentation an MHC- und CD1-Molekülen beteiligt [83]. Wir nehmen an, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> ebenfalls an der Generation von Lipidantigenen und am Abbau von phagozytiertem Material beteiligt ist.

### 4.5.1 Entwicklung eines angemessenen Assaysystems

Für die Beantwortung der Frage, welche Bedingungen die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität beeinflussen, müssen zwei wesentliche Anforderungen an das Assaysystem gestellt werden:

1. Das Substrat soll in einer Form angeboten werden, welche seiner Organisation im Lysosom möglichst nahe kommt.
2. Die Assays müssen hinsichtlich der Inkubationszeit und Enzymkonzentration (oder auch Substratkonzentration) im linearen Bereich liegen.

Um die erste Anforderung zu erfüllen wurden die Untersuchungen an Modellmembranen (Liposomen) vorgenommen, welche die im Lysosom vorkommende innere Membranfraktionen so gut wie möglich imitieren. Die intralysosomalen Membranen zeichnen sich zum einen durch das spezifische Vorkommen eines speziellen Phospholipids, BMP, aus [104]. Aus diesem Grund benutzten wir BMP als festen Bestandteil in den eingesetzten Liposomen. Im Gegensatz dazu wird Cholesterol in gesunden Zellen kontinuierlich aus dem intralysosomalen Membransystem heraus transportiert [36, 149]. Auf die Integration dieses Steroids in die verwendeten Modellmembranen wurde daher verzichtet.

Die Lipidzusammensetzung der verwendeten Liposomen (Komplettliposomen) orientierte sich an der von Kobayashi *et al.*, 2002, publizierten Analyse zur Zusammensetzung für späte endosomale Kompartimente: 50% PC, 15% PE und 6% SM, 7% PI, 7% PS und 15% BMP. Neben den zwitterionischen Lipiden PC, PE und SM sind hier die anionischen Phospholipide PI, PS und BMP vertreten. Daneben wurden auch neutrale Liposomen, „Grundliposomen“, eingesetzt, welche nur aus den zwitterionischen Phospholipiden PC, PE und SM zusammengesetzt waren. Es sei hier kritisch angemerkt, dass die Zusammensetzung der intralysosomalen Membranen natürlich mit dem hereinkommenden Cargo variiert. Je nach Stoffwechselzustand oder Phagozytoseaktivität des Makrophagen ändert sich der Anteil der abzubauenen Lipide. Zudem ist anzunehmen, dass auch zwischen den verschiedenen Makrophagenpopulationen (z. B. Alveolarmakrophagen, Osteoklasten, Kupfferzellen...) qualitative und quantitative Unterschiede bezüglich der Lipidzusammensetzung der intralysosomalen Membranen existieren.

Es war wichtig zu wissen, ob die Größe der Liposomen, und damit die Krümmung der Membran, Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Für einige lipolytischen Enzyme wurde berichtet, dass die Membrankrümmung die Enzymaktivität beeinflusst. Darunter findet sich das ebenfalls lysosomale Enzym Glucosylceramidase. Ohne die lysosomalen Aktivatorproteine Saposin A und C schneidet dieses Enzym sein Substrat Glucosylceramid kaum, wenn dieses in LUVs eingebettet ist. Im Gegensatz dazu ist seine Aktivität an SUVs um ein Vielfaches höher [227]. Ein weiteres Beispiel ist die PI-spezifische PLC aus *Bacillus cereus*, welche an SUVs eine wesentlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit zeigt, als an LUVs [3]. Erklärt werden kann diese Beobachtung damit, dass die Phospholipidkopfgruppen in der äußeren Schicht von SUVs aufgrund der starken Krümmung des Vesikels weniger dicht gepackt sind, als in LUVs. Dieses ermöglicht offenbar manchen Enzymen einen besseren Zugang zu ihren Substraten und erleichtert das Ausbilden von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Membrankern.

Wie aus Abbildung 3.12 hervor geht, ist ein solches Verhalten bei der lysosomalen PLA<sub>1</sub> nicht zu beobachten. Sie arbeitet an SUVs, LUVs und MLVs mit gleicher Effizienz. Dies zeigt, dass die Krümmung der Membran keine Rolle für die Bindung des Enzyms an die Grenzfläche und den nachfolgenden Substratumsatz spielt. Dieses gilt zumindest für Liposomen mit der hier verwendeten Phospholipidzusammensetzung. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden LUVs und MLVs gleichermaßen als Modellliposomen eingesetzt.

Die zweite Anforderung an das PLA<sub>1</sub>-Assaysystem betrifft die optimale Inkubationszeit und die eingesetzte Enzymmenge. Mit Hilfe einer Kinetik (siehe Abbildung 3.13) sollte sicher gestellt werden, dass in einem Zeitbereich gearbeitet wird, in welchem der Substratumsatz noch proportional zur Zeiteinheit ist. Dieses ist im linearen Bereich der Reaktionskurve der Fall. Gleichzeitig sollte die während der Inkubation eingesetzte Enzymmenge nicht mehr als 25% des insgesamt verfügbaren Substrates umsetzen. Bei dem Einsatz von Liposomen ist daran zu denken, dass sie aus Lipiddoppelschichten bestehen. Etwas weniger als die Hälfte des eingesetzten Substrates befindet sich im inneren Blatt der Doppelschicht, wo es für von außen zugefügtes Enzym nicht erreichbar ist. Nur die Substratmoleküle, welche in das äußere Blatt integriert sind, können von der lysosomalen PLA<sub>1</sub> umgesetzt werden. Für die weiteren Versuche wurde eine Inkubationsdauer von 30-40 min gewählt.

Es ist an dieser Stelle nicht möglich, die kinetischen Parameter wie  $K_m$  und  $V_{max}$  für die lysosomale PLA<sub>1</sub> zu berechnen. Die bekannte Mathematik der Michaelis-Menten-Kinetik kann in ihrer Form nicht auf grenzflächenaktive Enzyme angewendet werden. Schon aus diesen ersten Versuchen wird der Grund dafür deutlich. Die Reak-

tionsgeschwindigkeit hängt bei diesen Enzymen von der Komposition der Modellmembran (oder allg.: von der Organisation des Substrates) ab. Hier wurde die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität am Grund- und am Komplettliposom gegen dasselbe Substrat, PC, bestimmt. Dennoch erhält man sehr unterschiedliche Reaktionskurven und würde in beiden Fällen komplett unterschiedliche Werte für die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  erhalten. Dieses liegt daran, dass die apparente Reaktionsgeschwindigkeit von zwei Prozessen abhängt: 1. Der Bindung des Enzyms an die zweidimensionale Membranoberfläche und 2. dem eigentlichen Substratumsatz. Durch das einfache Messen der Reaktionskurve können diese beiden Schritte nicht differenziert werden.

Studien an sPLA<sub>2</sub>s konnten zeigen, dass oftmals alle Enzyme dieser Klasse eine vergleichbare katalytische Effizienz aufweisen, wenn die Grenzflächenbindung im Assay kein Faktor ist [249]. Dies ist der Fall, wenn kurzkettige und damit wasserlösliche Lipidsubstrate angeboten werden. Hier umgeht man die Notwendigkeit des 1. Schrittes und kann  $K_m$  und  $V_{max}$  für die angebotenen Substrate berechnen.

### 4.5.2 Negative Ladung auf der Membranoberfläche verstärkt Membranbindung und damit Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub>

Bei Betrachtung von Abbildung 3.12 fällt auf, dass am Grundliposom, im Gegensatz zum Komplettliposom, kaum PC umgesetzt wird. Das Komplettliposom unterscheidet sich vom Grundliposom durch das Vorhandensein der anionischen Phospholipide PS, PI und BMP. Es ist bekannt, dass viele lipolytischen Enzyme durch negative Ladung auf der Membranoberfläche aktiviert werden [31]. Auch für die lysosomale PLA<sub>1</sub> aus Rattenleber wurde ein entsprechender Effekt beschrieben [162].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> sogar in extremer Weise davon abhängt, dass anionische Phospholipide in die Membran integriert sind. Am neutralen Grundliposom wird so gut wie kein Substrat umgesetzt. Dieser Effekt wird auch in Abbildung 3.13A deutlich. Nach 17 h Inkubation ist gerade so viel PC an den Grundliposomen umgesetzt worden, wie bereits nach 7 min an den Komplettliposomen.

Für einige sPLA<sub>2</sub>s wurde ein so genanntes *lag-burst*-Verhalten beschrieben, wenn sie an reinen PC-Liposomen arbeiten. Dabei wird am Anfang der Reaktion, während der Verzögerungsphase (*lag*), kaum Substratumsatz festgestellt. Nach einer gewissen Zeit steigt die Reaktionsgeschwindigkeit plötzlich an (*burst*) [23]. Man schreibt diesen Effekt der Anreicherung der Hydrolyseprodukte im Reaktionsverlauf zu. Da die entstehende FFS eine negative Ladung trägt, wird das Liposom im Reaktionsverlauf immer anionischer.

Die Reaktionskurve der lysosomalen PLA<sub>1</sub> lässt einen solchen Effekt bei der Hydrolyse am Grundliposom jedoch nicht erkennen. Die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt auch nach 17 h konstant langsam.

Am Komplettliposom steigert die Depletion der Reaktionsprodukte mittels der Substanz  $\beta$ -CD die Reaktionsgeschwindigkeit sogar (Abbildung 3.14). Auf diesen Effekt soll weiter unten noch näher eingegangen werden.

Es stellte sich die Frage, auf welche Weise die anionischen Phospholipide die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> begünstigen.

Allgemeine Modelle zur Grenzflächenbindung von peripheren Membranproteinen gehen davon aus, dass Proteine zunächst aufgrund von elektrostatischer Anziehung zur Membran finden. Dort bilden sich dann starke Protein-Membran-Komplexe, welche neben der elektrostatischen Komponente auch auf hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beruhen [31, 213]. Daneben wird für manche Enzyme zusätzlich in Erwägung gezogen, dass die Membranbindung eine Konformationsveränderung im Enzym und damit seine Aktivierung bewirkt [238].

Kinetisch gesehen stellen die Bindung lipolytischer Enzyme an die Membranoberfläche und der anschließende katalytische Substratumsatz zwei voneinander unabhängige Schritte dar [7]. Die apparente Substratspezifität wird nicht nur von der Natur des Substrates bestimmt, sondern auch von dem Organisationsumfeld, in welchem es sich befindet. Bei den sPLA<sub>2</sub>s ist die so genannte Grenzflächenerkennungsdomäne (*interfacial recognition site*, IRS) für die Erkennung der und die Bindung an die Membran zuständig. Die Membranbindung bewirkt eine allosterische Aktivierung im Enzym, welche schließlich die Diffusion des Substrats in das katalytische Zentrum des Enzyms und dessen Hydrolyse erlaubt [242].

Im Falle der lysosomalen PLA<sub>1</sub> wären demnach zwei Erklärungen bezüglich des aktivierenden Effektes der anionischen Phospholipide denkbar:

1. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> bindet nur an negativ geladene Membranen: Am Grundliposom findet kein Substratumsatz statt, weil das Enzym in Lösung bleibt und nicht an das Liposom bindet.
2. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> kann zwar an die Grundliposomen binden. Für die katalytische Aktivität bedarf es jedoch einer allosterischen Aktivierung, welche der Gegenwart von anionischen Phospholipiden bedarf.

Um zu testen, welche dieser beiden möglichen Erklärungen zutrifft, wurden Liposomensedimentationsexperimente mit Grund- und Komplettliposomen, sowie unter verschiedenen Bedingungen (Abbildung 3.16) durchgeführt. Diese beweisen eindeutig,

dass die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität nur an negativ geladene Liposomen bindet. Nach Inkubation mit Komplettliposomen geht fast die gesamte lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität aus dem Überstand verloren, d. h. sie wird mit den Liposomen sedimentiert. Im Gegensatz dazu sind Grundliposomen nicht in der Lage, die Aktivität aus dem Überstand zu binden.

Wenn elektrostatische Interaktionen für die Membranbindung kritisch sind, müsste eine Erhöhung der Ionenkonzentration des Puffers zur Reduktion der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Bindung an Liposomen führen. Hydrophobe Interaktionen würden durch Salzzugabe nicht betroffen oder sogar verstärkt werden. Abbildung 3.16B zeigt, dass eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Puffer tatsächlich die Bindungsfähigkeit von lysosomaler PLA<sub>1</sub> an die Komplettliposomen vermindert.

Die Reduktion der Bindungsfähigkeit drückt sich entsprechend in einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Salzzugabe aus (Abbildung 3.15). Dabei spielt es keine Rolle, welches Salz verwendet wurde. Somit kann ein spezifischer Effekt eines bestimmten Ions ausgeschlossen werden. Wie kann der Ioneneffekt erklärt werden? Salzkationen reichern sich an der anionischen Membranoberfläche an und können daher die Bindungsfähigkeit von Enzymen an die Membran herabsetzen [220, 221]. Bei der Bindung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> an negativ geladene Membranen scheinen demnach elektrostatische Interaktionen, im Vergleich zu hydrophoben Wechselwirkungen, eine dominierende Rolle zu spielen. In der Abbildung 4.2 wird schematisch verdeutlicht, wie der Ioneneffekt auf die Membranbindungsfähigkeit der lysosomalen PLA<sub>1</sub> erklärt werden kann.

Locatelli-Hoops *et al.* konnten zeigen, dass das glykosylierte lysosomale Aktivatorprotein Saposin A ebenfalls sensibel auf die Ionenkonzentration reagiert. Saposin A ist ein essentielles Hilfsprotein für die Degradation von Galactosylceramid. Seine Aufgabe ist es, Lipide aus intralysosomalen Membranen zu mobilisieren und sie somit den jeweiligen Hydrolasen zugänglich zu machen. Die Autoren schlagen vor, dass eine Änderung der lokalen Ionenkonzentration im Lysosom generell zur Regulation von lysosomalen Proteinen dienen könnte, welche an Membranen arbeiten [124].

Bietet man das Substrat in Form von Detergenzmizellen mit Triton X-100 an, so wirkt eine Erhöhung der Salzkonzentration nicht inhibitorisch auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Für die Hydrolyse von PC aus Detergenzmizellen spielt elektrostatische Anziehung offenbar keine Rolle.

#### 4.5.2.1 Zur Inhibition der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität durch CADs

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> aus Makrophagen durch die trizyklischen Antidepressiva Imipramin und Amitryptilin konzentrationsabhängig inhibiert wird (Abbildung 3.20). Diese Medikamente gehören der Substanzklasse der CADs an, zu welcher auch Aminoglykosid-Antibiotika (wie Gentamycin und Streptomycin) oder das Malariamittel Chloroquine gehören [9].

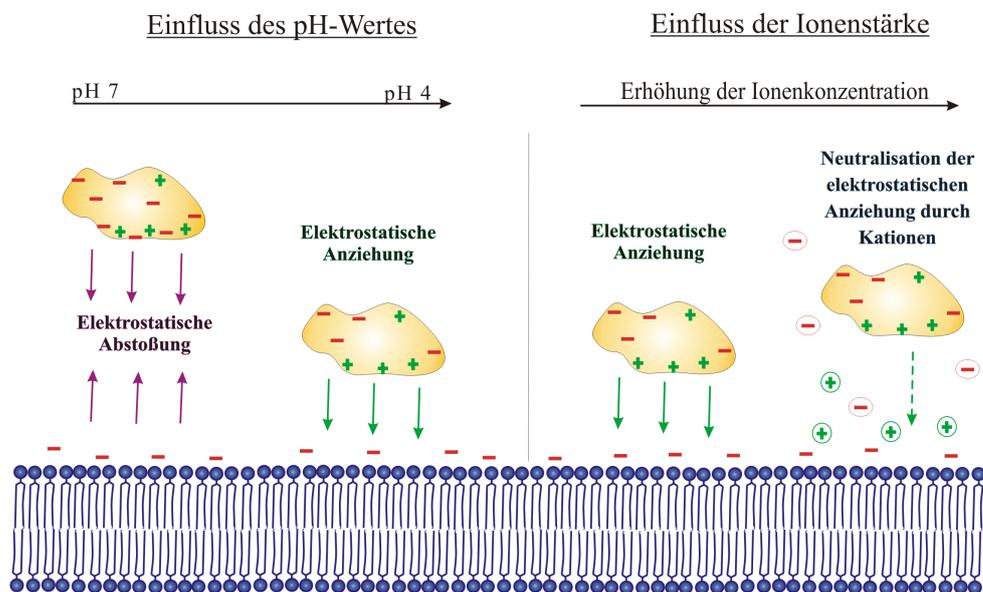
*In vivo* kann es nach Einnahme dieser Medikamente zu einer Anreicherung von nicht-metabolisierbaren Phospholipiden in den Lysosomen und zu einer damit einhergehenden Ausbildung von multilamellaren Körperchen kommen. Dieser Zustand wird durch den Begriff „Phospholipidose“ beschrieben [9].

Die meisten CADs werden nach ihrem Eintritt in das Lysosom protoniert. Dadurch können sie anschließend nicht mehr den hydrophoben Membrankern durchdringen und werden im Lysosom eingeschlossen. Mingeot-Leclercq und Mitarbeiter haben am Ende der 80er Jahre die Inhibition der lysosomalen PLA<sub>1</sub> durch Aminoglykosid-Antibiotika untersucht [135–137, 161]. Sie verwendeten für diese Untersuchungen Lysosomenpräparationen aus Rattenleber. Im Zuge dieser Studien entwickelten die Autoren die „Hypothese der negativen Ladung“, nach welcher CADs negativ geladene Membranoberflächen neutralisieren und auf diese Weise die Aktivität von lysosomalen PLAs reduzieren können. Der Effekt wäre also der Neutralisation durch Erhöhung der Salzkonzentration vergleichbar.

Danach wäre die hier gezeigte Inhibition der lysosomalen PLA<sub>1</sub> aus Makrophagen durch Imipramin und Amitryptilin mit einer Ladungsneutralisation der negativ geladenen Phospholipidkopfgruppen erklärbar. Zusätzlich kommt es womöglich auch zu einer sterischen Abschirmung der Membran. Interessanterweise sehen wir im Assay mit Triton X-100 ebenfalls eine Inhibition der PLA<sub>1</sub>-Aktivität bei höheren Konzentrationen (nicht gezeigt). Unsere Daten lassen keine Schlüsse darauf zu, ob diese Inhibition durch direkte Bindung der trizyklischen Antidepressiva das Enzym oder an die Lipidsubstrate verursacht wird.

#### 4.5.3 Zur Ursache des sauren pH-Optimums der lysosomalen PLA<sub>1</sub>

Nicht nur die Salzkonzentration, sondern auch der pH-Wert des Mediums hat Einfluss auf das Bindungsvermögen der PLA<sub>1</sub> an Komplettliposomen. Während bei pH 4,5 der Großteil der eingesetzten Enzymmenge mit Komplettliposomen sedimentiert werden kann, ist das Bindungsvermögen bereits bei pH 5,5 deutlich reduziert. Bei neutralem pH-Wert findet quasi keine Liposomenbindung mehr statt. Ein solches Verhalten ist



**Abbildung 4.2: pH-Wert und Ionenstärke modulieren die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen der lysosomalen PLA<sub>1</sub> und der negativ geladenen Membranoberfläche.** Dieses Modell verdeutlicht, auf welche Weise pH-Wert und Ionenstärke die Membranbindung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> beeinflussen. **Effekt des pH-Wertes:** Die Erniedrigung des pH-Wertes führt zur Protonierung negativ geladener Proteinseitenketten, wie die von Asparagin- und Glutaminsäure. Dies hat eine Neutralisation der negativen Nettoladung zur Folge. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> hat pI-Werte von 5,2-5,4 und <4,4. An den entsprechenden pH-Werten besitzen die jeweiligen Isoenzyme keine Nettoladung und werden nicht mehr elektrostatisch von der Membran abgestoßen. Wahrscheinlich befinden sich in der IRS gehäuft positive Ladungen, wodurch die korrekte Orientierung des Enzyms an der Membran gewährleistet wird. Wird der pH-Wert weiter erniedrigt, erhält das Enzym eine positive Nettoladung. **Effekt der Ionenstärke:** Salzkationen reichern sich an der anionischen Membranoberfläche an und neutralisieren damit ihre Ladung. In der Folge wird die lysosomale PLA<sub>1</sub> von der Membranoberfläche weniger stark elektrostatisch angezogen.

für lysosomale Enzyme nicht unbekannt. Die lysosomalen Aktivatorproteine Saposine A, C und D binden unter sauren Bedingungen ebenfalls wesentlich besser an anionische Membranen, als bei neutralem pH-Wert [124, 226]. Aber auch Enzyme, welche bei neutralem pH-Wert arbeiten, zeigen eine pH-abhängige Bindungsfähigkeit an anionische Lipiddoppelschichten. Dazu gehört beispielsweise die bakterielle PI-PLC [235]. Dieses Enzym bindet bei pH < 7 wesentlich besser an negativ geladene Modellmembranen, als bei höheren pH-Werten. Bei pH 8,5 findet fast keine Membranbindung mehr statt. Der Effekt kann mit dem Ionisationsgrad bestimmter Aminosäurereste erklärt werden. Das Ansäuern des Mediums führt dazu, dass negativ geladene Aminosäurereste protoniert und damit neutralisiert werden [235]. In der Folge kommt es zu einer Reduktion der elektrostatischen Abstoßung zwischen negativ geladener Grenzfläche und insgesamt negativ geladenem Protein. Für die lysosomale PLA<sub>1</sub> wäre ein solcher Effekt ebenfalls denkbar.

Wie im Reinigungsteil beschrieben, zeigt die lysosomale PLA<sub>1</sub> in der IEF zwei pIs, einen bei pH 5,3 und einen breiteren Peak bei pH 3,8-4,4. Oberhalb von pH 5,3 trägt das Protein demnach eine negative Nettoladung, welche aufgrund von elektrostatischer Abstoßung eine Bindung an negativ geladene Membranen verhindern könnte. Wie aus Abbildung 3.17 hervor geht, ist oberhalb von pH 5,4 auch kaum noch PLA<sub>1</sub>-Aktivität messbar. Die Aktivität scheint mit der Bindungsfähigkeit der PLA<sub>1</sub> an die Membran zu korrespondieren. Auch das pH-Optimum des Enzyms im pH-Bereich von 4-4,4 liegt möglicherweise darin begründet, dass das Enzym hier keine negative Nettoladung mehr trägt, welche seine Membranbindung verhindern könnte. Bei der Betrachtung der Nettoladung muss beachtet werden, dass es innerhalb des Enzyms durchaus negativ und positiv geladene Regionen geben kann. So ist es durchaus möglich, dass das Enzym auch an seinem pI eine positiv geladene IRS besitzt, welche die korrekte Ausrichtung des Enzyms an der Membran erlaubt. Eine Ansäuerung des Mediums führt zur Protonierung von Aminosäureseitenketten, speziell von Asparaginsäure und Glutaminsäure. Die pK-Werte dieser Aminosäuren liegen im Protein in den Bereichen von 3,7-4,0 und 4,2-4,5, wobei die Mikroumgebung im Protein und die Ionenstärke diese Werte auch noch verschieben können. Somit hat eine Erniedrigung des pH-Wertes die Neutralisation (Protonierung) der Seitenketten zufolge. Abbildung 4.2 verdeutlicht modellhaft den Effekt des pH-Wertes auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>. Die Expression und kristallographische Strukturaufklärung der lysosomalen PLA<sub>1</sub> wird zukünftig genauere Aussagen zu der IRS dieses Enzyms und seinen Membranbindungsmechanismen erlauben.

Das endolysosomale System besteht aus eine Reihe von sauren membranumschlossenen Vesikeln, wie späte Endosomen, Übergangsstadien aus späten Endosomen und Lysosomen und reife Lysosomen. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrem Grad der Ansäuerung [132, 133]. Der pH-Wert in späten Endosomen liegt typischerweise unter 5,5, der von Lysosomen kann unter 4,5 fallen [24, 112]. Möglicherweise kann jene Isoform der lysosomalen PLA<sub>1</sub>, welche bei pH 5,3 fokussiert, bereits im weniger sauren späten Endosom aktiv sein. Eine weitere Ansäuerung würde nach und nach auch jene Isoform aktivieren, welche in pH-Bereichen <4,4 fokussiert, indem ihre Membranbindungsfähigkeit ansteigt. Somit hätte das Vorhandensein dieser zwei Isoformen den biologischen Sinn, die Aktivität über den pH-Wert zu regulieren.

Eine solche Regulation kennt man von der gastrischen Lipase, welche bei sauren pH-Werten arbeitet. Die meisten anderen Lipasen haben pH-Optima über pH 7. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass der Histidin-Rest in ihrer katalytischen Triade einen pK<sub>a</sub>-Wert von 6,5 aufweist [7]. Obwohl sich die gastrische Lipase desselben katalytischen Zentrums bedient, arbeitet sie am besten in sauren pH-Bereichen [34, 181]. Dieser

scheinbare Widerspruch gilt jedoch nur für den Fall, dass die Triglycerid-Substrate, in Aggregaten angeboten werden, wie es unter biologischen Bedingungen der Fall ist. Bietet man dem Enzym lösliche kurzkettige Substrate im Experiment an, werden diese bei leicht basischem pH am besten geschnitten. Dieses ist der pH-Wert, bei dem das katalytische Zentrum am besten arbeiten sollte. Es stellte sich heraus, dass die Adsorption des Enzyms an die Lipid-Wasser-Grenzfläche pH-abhängig ist und den limitierenden Schritt des gesamten katalytischen Prozesses darstellt. Obwohl das katalytische Zentrum bei leicht basischem pH-Wert sein Optimum erreicht, bindet das Enzym nur bei saurem pH an die Membran [35]. Dies ist ein eindrückliches Beispiel dafür, dass die Aktivität von grenzflächenaktiven Enzymen nicht allein vom katalytischen Zentrum, sondern auch durch ihre IRS und damit ihre Membranbindung bestimmt wird.

### 4.5.4 Die Wirkung von BSA und $\beta$ -CD auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>

Die natürlichen Substrate von lipolytischen Enzymen sind langkettige Lipide. Bei ihrer Hydrolyse entstehen wasserunlösliche Produkte, welche sich in der Grenzfläche anreichern. Dieses führt zu einer qualitativen Veränderung der Grenzfläche, was sich wiederum inhibierend oder aktivierend auf das jeweilige Enzym auswirken kann [7]. Die Produkte der lysosomalen PLA<sub>1</sub> sind eine freie FS und das entsprechende Lyso-phospholipid. Es wurde gezeigt, dass  $\beta$ -CDs als wasserlösliche Akzeptoren zur Solubilisation dieser Produkte und damit ihrer Entfernung aus der Grenzfläche verwendet werden können [6, 89]. Dabei wirkt diese Substanzklasse, im Unterschied zu BSA, nicht tensioaktiv. Es war daher wichtig zu untersuchen, wie sich die Anwesenheit von  $\beta$ -CD und BSA auf die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> auswirken. Aus den Abbildungen 3.13 und 3.14 geht hervor, dass  $\beta$ -CD einen aktivierenden Effekt hat. Die Reaktionskurve in Abbildung 3.13 nimmt einen wesentlich steileren Verlauf, wenn diese Substanz zugegen ist.

BSA hat bis zu einer Konzentration von 5 mM eine stark aktivierende Wirkung, welche jedoch bei höheren Konzentrationen wieder stark abfällt. BSA ist in der Lage, an negativ geladene Membranoberflächen zu binden [248]. Es wäre daher denkbar, dass es mit der lysosomalen PLA<sub>1</sub> um die Bindungsfläche am Liposom konkurriert und daher in höheren Konzentrationen das Liposom gegen das Enzym abschirmt.

Wie könnten die aktivierenden Effekte von BSA und  $\beta$ -CD erklärt werden? Die langkettigen, stark hydrophoben Hydrolyseprodukte verbleiben in der Grenzfläche. Nach der Katalyse findet eine Reorganisation statt, indem die Produkte im zweidimensionalen Membrangefüge weg diffundieren und durch neue Substratmoleküle ersetzt

werden. BSA und  $\beta$ -CD komplexieren jedoch diese Produkte und entfernen sie damit aus der Grenzfläche. Das kann zu einer Beschleunigung der Reorganisation derselben führen [7], was sich möglicherweise auf den Zugriff der lysosomalen PLA<sub>1</sub> auf ihre Substrat auswirkt.

Bei Untersuchungen verschiedener sPLA<sub>2</sub>s an monomolekularen Filmen konnte gezeigt werden, dass die Enzymkinetik an langkettigen Substraten der von mittelkettigen gleicht, wenn  $\beta$ -CD zugegen ist. Mittelkettige FS können ohne Solubilisierungshilfe in der wässrigen Phase gelöst werden [6].

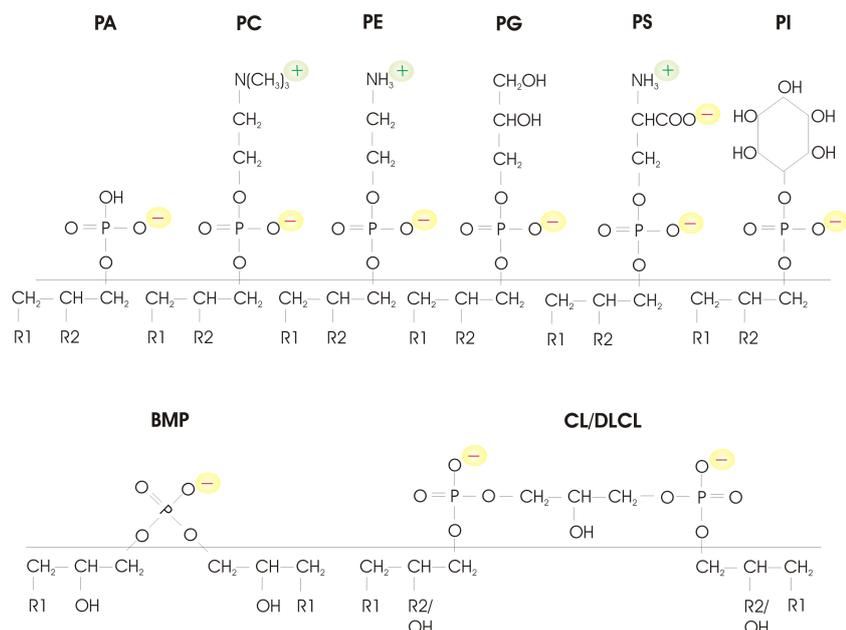
#### 4.5.5 Lysosomale PLA<sub>1</sub> arbeitet im *Scooting*-Modus

Lipolytische Enzyme können nach ihrer Prozessivität charakterisiert werden. Diese besagt, wie viele Katalysezyklen nach der Enzymbindung an die Membran stattfinden. Die Abbildung 3.21 aus dem Übersichtsartikel von Berg *et al.* [23] verdeutlicht die beiden möglichen Katalysemodi.

Von den sPLA<sub>2</sub>s ist bekannt, dass sie an anionischen Membranen im *scooting*-Modus arbeiten. Sie können im Extremfall, wenn sie einmal an ein Liposom gebunden haben, das komplette äußere Blatt der Lipiddoppelschicht hydrolysieren, ohne einmal von der Membran zu dissoziieren [23]. Auch die 85 kDa cPLA<sub>2</sub> arbeitet an anionischen Vesikeln in diesem Modus [19]. Wie die Abbildung 3.22 zeigt, wird innerhalb der ersten 2 min etwa  $\frac{2}{3}$  der eingesetzten lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität gebunden, was einen Abfall der Aktivität an neu hinzugefügten Vesikeln zur Folge hat. Dieses Ergebnis schließt aus, dass das Enzym im *hopping*-Modus arbeitet, da in diesem Falle in jedem Reaktionsansatz ähnlich viel radioaktives Substrat umgesetzt worden wäre. Die lysosomale PLA<sub>1</sub> scheint nach Membranbindung über einen längeren Zeitraum am Liposom zu verbleiben und erst nach einer gewissen Zeit auf ein anderes Liposom zu wechseln. Demnach arbeitet das Enzym *scooting*-Modus.

#### 4.5.6 Zur Rolle einzelner anionischer Phospholipide

Eine anionische Ladung auf der Grenzfläche wirkt, wie gezeigt, aktivierend auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>. Die Frage war, welchen Effekt einzelne anionische Phospholipide dabei haben. Die Abbildung 3.19 zeigt die Titration je eines bestimmten Lipids zum Grundliposom. Es ist zunächst festzustellen, dass alle anionischen Lipide die Fähigkeit haben, die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität im Vergleich zum Grundliposom anzuheben. Das zwitterionische Phospholipid PE ist dazu nicht in der Lage. Sphingomyelin, welches mit den zu testenden Lipiden ausgetauscht wurde, verhält sich in Bezug auf die



**Abbildung 4.3: Struktur und Ladung der untersuchten Phospholipide** Dieses Schema verdeutlicht die Struktur der untersuchten Phospholipide und deutet an, an welcher Stelle im Lipid negative und positive Ladungen sitzen. Man erkennt, dass PI, PG, PA und BMP eine negative Ladung an der Kopfgruppe tragen. PS weist drei Ladungen auf, zwei negative und eine positive und ist dadurch im Resultat einfach negativ geladen. Die zwitterionischen Lipide PC und PE enthalten je eine positive und eine negative Ladung, die sich gegenseitig neutralisieren. CL und DLCL zeichnen sich durch das Vorhandensein von zwei negativen Ladungen aus.

lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität ebenfalls neutral (nicht gezeigt).

Bei den anionischen Phospholipiden fällt auf, dass sich die einzelnen Kurvenverläufe ihrer Form nach unterscheiden. Wenn man zunächst die geringeren Konzentrationen von bis zu 15% anionischen Phospholipids im Liposom betrachtet, stellt man fast, dass die Kurve bei manchen Lipiden sofort linear ansteigt. Dazu gehören BMP, CL und DLCL. Schon eine Konzentration von 5% hat eine deutliche Aktivitätssteigerung zur Folge. Im Gegensatz dazu nehmen die Kurven von PG, PI, PS und PA einen eher sigmoiden Verlauf. Sie steigen bis zu einer Konzentration von 10% nur langsam an, um dann in einen steileren Verlauf über zu gehen. Auch in höheren Konzentrationsbereichen stellt man unterschiedliche Verlaufsformen fest. So geht die Kurve von PG bei 20% in eine Plateauphase über, während die von PS bei 40% noch ansteigt. Bei Zusatz von CL fällt die Kurve bereits bei 10% wieder ab, BMP erreicht bei einer Konzentration von 20% seine höchste Wirksamkeit.

Wie kommt es zu diesen unterschiedlichen Kurvenverläufen? Einerseits könnte dies mit der Lokalisation der Ladung innerhalb der Phospholipidkopfgruppe zu tun haben. Wie aus Abbildung 4.3 deutlich wird, befindet sich eine negative Ladung am

Phosphatrest. Dieser wird bei PG, PS und PI sterisch von der Glycerol-, Serin- oder Inositolgruppe abgeschirmt (siehe dazu auch [117]). Im Gegensatz dazu ist die negativ geladene Phosphatgruppe bei BMP, CL und DLCL von außen frei zugänglich. Zusätzlich sind CL und DLCL doppelt negativ geladen. Nicht zuletzt weisen alle drei Lipide, BMP, CL und DLCL eine kegelförmige Struktur auf, wodurch sich die Packungsdichte der polaren Kopfgruppen in der Membran reduziert. Dieses könnte den Zugriff der lysosomalen Phospholipase A<sub>1</sub> auf den hydrophoben Membrankern erleichtern [33]. Damit die lysosomale PLA<sub>1</sub> ihre lipophilen Substrate hydrolysieren kann, muss sie entweder teilweise in den Membrankern eindringen oder das Substrat muss von dem Enzym aus dem Membranverbund herausgezogen werden. Was weiß man diesbezüglich von anderen grenzflächenaktivierten Enzymen? Enzyme des Glykosphingolipid-Metabolismus sind auf die Zusammenarbeit mit Aktivatorproteinen, den Saposinen, angewiesen, welche eben die Aufgabe erfüllen, Glykosphingolipide aus der Membran zu mobilisieren und den Enzymen zugänglich zu machen [108].

Im Gegensatz dazu bilden sPLA<sub>2</sub>s bei Membranbindung eine hydrophobe Tasche zur Membranoberfläche aus, in welchen das Phospholipidsubstrat hinein diffundieren kann [242]. Dabei ist die Bindung der IRS an die Membran so eng, dass Wassermoleküle aus dem Enzym-Membran-Kontakt verdrängt werden. Auf diese Weise wird eine eigene Mikroumgebung geschaffen, welche die Mobilisation des Lipidsubstrats erlaubt. Abbildung 4.4 aus [23] stellt dieses modellhaft dar. Es ist wahrscheinlich, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> einen den sPLA<sub>2</sub>-ähnlichen Mechanismus verwendet. In hier nicht gezeigten Untersuchungen konnten wir ausschließen, dass Saposine die PLA<sub>1</sub>-Aktivität erhöhen können.

Es soll im Folgenden auf die biologische Relevanz der untersuchten Lipide eingegangen werden:

Das wahrscheinlich wichtigste Lipid in dieser Untersuchung stellt **BMP** dar. Dieses

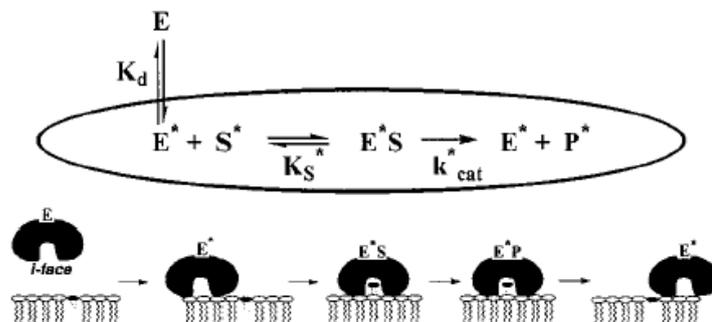


Abbildung 4.4: Arbeitsweise der sPLA<sub>1</sub>. Abbildung aus [23]. Erklärung siehe Text.

Lipid findet sich ausschließlich in späten Endosomen/Lysosomen [104], wo es, wahrscheinlich aus PG und/oder CL, synthetisiert wird [8, 233, 233]. Im Gegensatz dazu werden die anderen untersuchten Lipide über endosomale oder phagozytische Prozesse in des Lysosom transportiert. In den letzten Jahren beschäftigten sich einige Autoren mit der Frage, welche spezielle Rolle BMP im späten Endosom/Lysosom erfüllen könnte. Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass es für den Export von Cholesterol aus diesen Kompartimenten wichtig sei [37, 103]. Es wird des Weiteren angenommen, dass BMP, in Kombination mit Proteinen wie Alix und/oder Saposin C, bei der Ausbildung der intralysosomalen Membranen eine Rolle spielt. Aufgrund seiner kegelförmigen Struktur soll es die Membrankrümmung erleichtern und die gestapelte Packung der intralysosomalen Membranen vermitteln [39, 47, 128].

Anionische Phospholipide spielen eine Schlüsselrolle bei der Degradation von Glykosphingolipiden im Lysosom. So benötigen die Glucosylceramidase und ihr Aktivatorprotein Saposin C negativ geladene Membranoberflächen, um aktiv zu sein [184]. Für die saure Ceramidase ist ähnliches beschrieben worden [238, 239] und auch die lysosomalen Aktivatorproteine Saposin A und D favorisieren Membranen mit anionischer Oberfläche [185, 227]. Eine Funktion von BMP könnte es demnach sein, die Degradation von Lipiden aus den intralysosomalen Membranen zu ermöglichen. Von allen anionischen Phospholipiden stellt es eine Konstante im späten Endosom/Lysosom dar. BMP erreicht die internen Membranstapel nicht, um abgebaut zu werden, sondern wird hier kontrolliert synthetisiert. Seine ungewöhnliche Stereokonfiguration, wahrscheinlich sn-2:sn-2<sup>2</sup>, macht es selbst weitgehend resistent gegenüber den Abbau durch lysosomale Hydrolasen [68].

Wir konnten zeigen, dass BMP die Aktivität der lysosomalen PLA<sub>1</sub> und die damit einhergehende Degradation von PC, PS und PE stark erhöht. Es wird vermutet, dass die Konzentration von BMP im endosomalen/lysosomalen Kompartiment um die 15% beträgt, für manche Membranen wurde sogar eine lokale Konzentration von 70-80% beschrieben [105]. Wie gezeigt, wirkt schon eine Konzentration von 5% BMP in der Membran stark aktivierend auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass BMP wichtig für die Aktivität von sauren Lipasen ist und eine seiner biologischen Funktionen darin liegt, den Lipidmetabolismus zu kontrollieren. Damit würde sich auch seine ungewöhnliche Stereokonfiguration erklären, welche es selbst resistent gegen den Abbau durch Hydrolasen macht.

Wie gelangen aber die anderen untersuchten Phospholipide in das Lysosom des

---

<sup>2</sup>Es existiert in der Literatur eine Kontroverse darüber, ob innerhalb der Zelle eher die sn-2:sn-2 oder die sn-1:sn-1-Konfiguration vorliegt [82].

Makrophagen?

Hierbei spielen zwei Prozesse eine wesentliche Rolle: Die Autophagie und die Phagozytose.

Während der Autophagie werden Zellorganellen und Teile des Zytoplasmas von doppelten Membranvesikeln (Autophagosomen) umschlossen und zum Lysosom transportiert [119]. Bei der anschließenden Fusion von Autophagosom und Lysosom wird das eingeschlossene Material in das Lysosomeninnere entlassen, um dort anschließend von den lysosomalen Hydrolasen degradiert zu werden [170]. Auf diese Art gelangen Membranfraktionen verschiedener Organellen in das Lysosom.

Die Phagozytose hingegen ist eine spezielle Funktion von Makrophagen und DCs, bei welcher körpereigenes und körperfremdes partikuläres Material aufgenommen und abgebaut wird.

Die Makrophagen tragen über die Phagozytose u. a. zum *tissue remodeling* (Gewebeumbau) bei, beseitigen sterbende Erythrozyten und entfernen Trümmer von Zellen, welche bei Entzündungsprozessen zu Schaden gekommen oder in Apoptose gegangen sind [216]. Des Weiteren sind diese Zellen in der Lage, mikrobielle Krankheitserreger aufzunehmen, ihre Antigene zu prozessieren und zu präsentieren. Damit unterstützen Makrophagen die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort gegen die Erreger. Die Aufnahme von apoptotischen Vesikeln infizierter Zellen ermöglicht ihm auch die Kreuzpräsentation von Erregerantigenen aus anderen infizierten Zellen [190, 240].

In welchen Membranfraktionen sind nun die untersuchten Lipide zu finden?

**PS** befindet sich in der inneren Lipidschicht der Plasmamembran aller eukaryontischer Zellen. Gesunde Zellen halten mit Hilfe von speziellen Transportern eine asymmetrische Lipidverteilung in der Plasmamembran aufrecht. So finden sich die Aminophospholipide PS und PE nur auf der zytoplasmatischen Seite, während die exoplasmatische Seite von den zwitterionischen Phospholipiden PC und SM, sowie von Glykosphingolipiden dominiert wird [164]. Während der Apoptose bricht diese Asymmetrie zusammen und PS gelangt in das äußere Blatt der Lipiddoppelschicht, wo es von Makrophagen über spezielle Rezeptoren erkannt wird [245]. Der apoptotische Partikel wird phagozytiert und zum Abbau in späte Endosomen/Lysosomen transportiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass das Vorhandensein von PS auf der Membranoberfläche den Abbau des apoptotischen Vesikels durch die lysosomale PLA<sub>1</sub> erleichtert, wenn nicht sogar erst ermöglicht.

Neben PS gelangt auch **CL** während der Apoptose auf die Zelloberfläche [209, 210] und kann ebenfalls durch seine negative Ladung den hydrolytischen Abbau der Membran erleichtern. CL, welches aufgrund seiner einzigartigen Diphosphatidylstruktur

vier FS-Ketten besitzt, findet sich jedoch typischerweise in der inneren Mitochondrienmembran. Durch Autophagie von Mitochondrien, der so genannten Mitophagie, kann mitochondriales CL in das Lysosom gelangen [98]. Daneben stellt CL, zusammen mit **PG**, einen bedeutenden Bestandteil von Bakterienmembranen dar, welche durch PG und CL eine stark anionische Oberfläche erhalten [41]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die negativ geladenen Lipide den Abbau der Bakterienmembranen durch die lysosomale PLA<sub>1</sub> und möglicherweise anderen Lipasen beschleunigen. In unseren Untersuchungen konnten wir auch feststellen, dass das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) im Liposom integriert aktivierend auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität wirkt (nicht gezeigt).

Am Beispiel der Gruppe IIa sPLA<sub>2</sub> zeigt sich, wie wichtig die Regulation der Enzymaktivität über die Lipidzusammensetzung von Membranen sein kann. Dieses stark kationische Enzym (pI>10,5) hat antibakterielle Wirkung [32, 57]. Es ist in der Lage, die anionische Membran von Gram-negativen Bakterien zu hydrolysieren. Im Gegensatz dazu bleiben zwitterionische Membranen, wie die Plasmamembran der Wirtszelle, unversehrt [101]. Nur aufgrund der Asymmetrie der Plasmamembran kann diese sPLA<sub>2</sub> seine immunologische Rolle erfüllen, ohne dem Wirtsorganismus zu schaden.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass die Membranbeschaffenheit der von Makrophagen aufgenommenen Partikel deren Abbaugeschwindigkeit bestimmen kann. Viele lysosomalen Hydrolasen und Aktivatorproteine sind mehr oder weniger auf anionische Ladung zur Grenzflächenerkennung angewiesen. Es wäre denkbar, dass die Zelle den Abbau von Lipiden dadurch kontrolliert, dass sie die lokale Membranzusammensetzung der intralysosomalen Membranstapel verändert. Kobayashi *et al* [105] haben im Lumen von späten Endosomen zwei verschiedene Membranpopulationen gefunden. Eine zeichnet sich durch eine hohe Konzentration von BMP aus (70% der gesamten Phospholipide), die andere ist reich an PC. Ob und inwiefern diese Membranregionen unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen, ist noch unbekannt [47]. Es wurde vorgeschlagen, dass die BMP-reichen Regionen als Plattformen für den Abbau verschiedener Lipide dienen [238]. Diese Autoren konnten auch zeigen, dass BMP den Abbau von Glucosylceramid in Liposomen beschleunigt. Unsere Daten beweisen, dass auch die Degradation von Phospholipiden stimuliert wird, wenn BMP in den Modellmembranen zugegen ist. Während die meisten Lipide das Lysosom erreichen, um dort hydrolysiert zu werden, wird BMP hier aus PG und CL reguliert synthetisiert. Interessanterweise sind gerade diese Phospholipide, also PG und CL, wichtige Bestandteile bakterieller Membranen. Werden Makrophagen exogen mit PG gefüttert, so steigert diese deutlich die BMP-Produktion in ihren Lysosomen [233]. Möglicherweise indu-

zieren phagozytiertes PG und CL ebenfalls die BMP-Synthese und tragen somit zum beschleunigten Abbau der bakteriellen Membranen, insbesondere dem von PE, bei.

Es wird immer deutlicher, welche Rolle dieses besondere Lipid im Lysosom spielt: Als Drehscheibe im Lipidstoffwechsel beschleunigt BMP den Katabolismus von Phospholipiden und Sphingolipiden und vermittelt außerdem den Export von Cholesterol aus diesen Kompartimenten [37].

Aus den Studien zur Charakterisierung der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität konnten wichtige Erkenntnisse über die Reaktionsmechanismen und die Bedingungen gewonnen werden, unter welchen das Enzym am besten arbeitet. So wurde deutlich, dass anionische Phospholipide in der Membran die PLA<sub>1</sub>-Bindungsfähigkeit an Liposomen drastisch erhöhen. Die Neutralisierbarkeit dieses Effektes durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration legt nahe, dass die Membranbindung durch elektrostatische Interaktionen vermittelt wird. Die Tatsache, dass eine Membranbindung nur bei sauren pH-Werten stattfindet, unterstützt diese Vermutung. Die Ansäuerung des Mediums vermindert wahrscheinlich die negative Nettoladung des Enzyms und erzeugt einen Ionisationszustand in der IRS, welcher die Assoziation mit der Membran erlaubt. Aus den hier gewonnenen Daten haben wir das in Abbildung 4.2 schematisch dargestellte Modell entwickelt. Es zeigt, auf welche Weise pH-Wert und Ionenkonzentration die lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität beeinflussen können. Nach Membranbindung verbleibt die lysosomale PLA<sub>1</sub> für mehrere Katalysezyklen am Liposom, sie arbeitet also im *scooting*-Modus. Das Entfernen ihrer Reaktionsprodukte aus der Membran (mittels  $\beta$ -CD oder BSA) fördert die Reaktionsgeschwindigkeit, wahrscheinlich durch eine Beschleunigung der Reorganisation der Membranlipide. Eine Produkthemmung wäre jedoch auch eine mögliche Erklärung. Es wird deutlich, dass die Beschaffenheit von Membranen ihren Abbau im Lysosom beeinflussen kann. So ist das Erscheinen von PS und CL [209, 210] auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen womöglich nicht nur wichtig, damit diese vom Makrophagen als solche erkannt und phagozytiert werden können, sondern auch, um die anschließende Degradation durch lipolytische Enzyme im Lysosom zu beschleunigen oder überhaupt zu ermöglichen. Des Weiteren hat BMP als spezifisches Lipid in internen Membranen von späten Endosomen/Lysosomen womöglich gerade diese Aufgabe, die Lipiddegradation im Lysosom durch lipolytische Enzyme, wie die lysosomale PLA<sub>1</sub>, zu ermöglichen und/oder zu modulieren.

Diese Arbeit präsentiert zum ersten Mal umfangreiche Daten zur Charakterisierung des Katalysemechanismus der lysosomale PLA<sub>1</sub> aus *Makrophagen*.

Ein aktivierender Effekt von anionischen Phospholipiden auf die lysosomale PLA<sub>1</sub>-

Aktivität in Lysosomen von *Rattenleber* wurde bereits von einer anderen Gruppe beobachtet [136, 162]. Die Autoren verwendeten Modellmembranen aus PC, SM, Cholesterol und einem anionischen Phospholipid (meist PI, nicht gezeigte Daten mit PA, PS und PG). Interessanterweise fanden die Experimente in diesen Arbeiten bei pH 5,4 statt, einem Wert, bei dem die von uns untersuchte lysosomale PLA<sub>1</sub> aus RAW B-Makrophagen kaum noch aktiv ist. Diese Autoren zeigen jedoch keine weiterführende Daten zu den möglichen Ursachen des beobachteten Effektes.

Im Gegensatz dazu bieten wir in der vorliegenden Arbeit systematische Studien zum Effekt der einzelnen anionischen Phospholipide und dessen Ursache. Unter den von uns untersuchten anionischen Phospholipiden befinden sich auch in Bezug auf ihre Lokalisation speziellere Lipide wie BMP, CL und DLCL. Wir konnten zeigen, dass die anionische Ladung die lysosomale PLA<sub>1</sub> in Makrophagen aktiviert, indem sie die Bindung des Enzyms an die Membranoberfläche begünstigt. Diese Bindung wird von der Ionenkonzentration des umgebenden Mediums und dem pH-Wert bestimmt. Die Ergebnisse tragen dazu bei, den Abbau von phagozytiertem Material durch die lysosomale PLA<sub>1</sub> besser zu verstehen.

### 4.6 Zur Rolle des Enzyms

Wie aus der Arbeit deutlich wird, leistet die lysosomale PLA<sub>1</sub> einen wichtigen Betrag zum Phospholipidumsatz im Makrophagen und anderen Zellen.

Jede Zelle erneuert kontinuierlich ihren Phospholipidbestand. So wird der gesamte Phospholipidbestand einer Zelle alle 10 000 sec ausgetauscht [243]. Die Umsatzrate für die Phospholipide der Plasmamembran beträgt im Fibroblasten ca. 5400 sec, im phagozytierenden Makrophagen liegt sie mit ca. 1800 sec sogar deutlich darüber [175]. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass der Makrophage seine Plasmamembran zur Bildung von Phagosomen heranzieht. Das phagozytierte Material wird schließlich von den diversen lysosomalen Hydrolasen, darunter die lysosomale PLA<sub>1</sub>, abgebaut.

Makrophagen degradieren auf diese Weise nicht nur mikrobielle Erreger und initiieren die spezifische Immunantwort gegen diese, sondern kümmern sich in erster Linie um die Beseitigung von körpereigenen Zelltrümmern und gealterten Erythrozyten [216]. Auch bei dem Abbau des phagozytierten Materials spielen die lysosomalen Hydrolasen eine zentrale Rolle.

Die Hemmung der lysosomalen Phospholipasen durch pharmakologische Substanzen wie die CADs führt zu der Entwicklung einer Phospholipidose, einer Akkumulation von nicht abgebauten Phospholipiden in der Zelle. Dies ist oftmals von der Ausbildung

Myelin-ähnlicher Strukturen, den lamellaren Körperchen begleitet, welche vor allem nicht abgebaute Phospholipide enthalten [9]. Diese Tatsache lässt Rückschlüsse darauf zu, wie wichtig die lysosomalen Phospholipaseaktivitäten für die Zellen sind.

Interessanterweise findet man in der langen Liste von bekannten lysosomalen Speicherkrankheiten keinen Fall von erblich bedingter, natürlich vorkommender Phospholipidose. Lysosomale Speicherkrankheiten werden durch einen genetisch bedingten Defekt saurer Hydrolasen hervorgerufen. Der Verlust an Aktivität eines oder mehrerer dieser Enzyme führt zu einer Anreicherung der entsprechenden Substrate (Lipide, Proteine, Glykoproteine, Glykosaminoglykane) im Lysosom [62]. Das Fehlen von Phospholipidspeicherkrankheiten lässt zwei mögliche Interpretationen zu: Entweder ist ein Defekt der lysosomalen PLA-Aktivität bereits im Uterus letal oder die lysosomale PLA-Aktivität ist redundant, so dass der Ausfall eines Enzyms durch andere kompensiert werden kann.

Für letztere Erklärung spricht, dass es neben der lysosomalen PLA<sub>1</sub>-Aktivität auch lysosomale PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten gibt. Zwei dafür verantwortliche Enzyme wurden vor einigen Jahren gereinigt und kloniert [79, 100]. Es handelt sich hierbei um die bereits in der Einleitung erwähnten Enzyme aiPLA<sub>2</sub> und LPLA<sub>2</sub> (siehe Seite 21).

AiPLA<sub>2</sub> ist ein bifunktionelles Enzym, welches neben der sauren PLA<sub>2</sub>-Aktivität auch Peroxidase-Aktivitäten (Peroxiredoxin 6) aufweist. Es wurde sowohl in lysosomalen Kompartimenten, als auch im Zytosol gefunden und wird in der Lunge wesentlich stärker exprimiert als in anderen Geweben [99, 173].

LPLA<sub>2</sub> kann FS von Phospholipiden auf H<sub>2</sub>O oder auf N-Acetylspingosin übertragen und somit als Phospholipase oder als 1-O-Acylceramid Synthase fungieren. Das 45 kDa große Glykoprotein wird ubiquitär exprimiert. Die Alveolarmakrophagen der Lunge bilden jedoch auffallend große Mengen von diesem Enzym. Die Expression in peripheren Blutmonozyten und Peritonealmakrophagen ist vergleichsweise gering [1].

Für beide Enzyme wird diskutiert, dass sie für den Umsatz des Surfactant in der Lunge eine Rolle spielen, was mit Hilfe von Knock-Out-Mäusen belegt werden konnte [1, 56]. „Surfactant“ steht für *surface active agent*, was so viel wie „grenzflächenaktive Substanz“ bedeutet. Seine Aufgabe ist es, die Oberflächenspannung in den Alveolen zu reduzieren, um deren Entfaltung zu ermöglichen und ein Zusammenfallen beim Ausatmen zu verhindern. Der Surfactant besteht aus einem Phospholipid-Protein-Komplex, wobei Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (DPPC) den weitaus größten Anteil an der Lipidfraktion hat. Neben Typ II Pneumocyten scheinen auch Makrophagen einen wichtigen Betrag zum Surfactant-Metabolismus zu leisten [1, 199].

Bei aiPLA<sub>2</sub>-negativen Mäusen ist der DPPC-Abbau in der Lunge beeinträchtigt,

was sich in einer progressiven, zeitabhängigen Anreicherung von Phospholipiden äußert. Der Ausfall der aiPLA<sub>2</sub> kann von anderen Enzymen teilweise kompensiert werden. Diesbezüglich werden von den Autoren andere, nicht-lysosomale PLA<sub>2</sub>s, sowie PLC- und PLD-Aktivitäten vorgeschlagen. Die Autoren schätzen, dass die aiPLA<sub>2</sub> für etwa 40% des DPPC-Abbaus verantwortlich ist [56].

Lpla<sub>2</sub>-negative Mäuse entwickeln sich normal, zeigen aber im Alter von drei Monaten eine Anreicherung von PE und PC in Alveolarmakrophagen und verwandten monozytischen Zellen. Im Alter von einem Jahr kommen eine Anreicherung des Phospholipidgehalts im Surfactant und eine Milzvergrößerung hinzu. Bezüglich dieser Lipide entwickelt sich also eine Phospholipidose. Der Gehalt an anderen zellulären Phospholipiden, wie PS, PI oder SM, ist in den Mäusen unverändert, ein Ergebnis, das sich mit der Präferenz des Enzyms für PC und PE deckt [78]. Es ist wichtig zu betonen, dass diese Mäuse noch eine lysosomale PLA<sub>1</sub>-Aktivität besitzen [78]. Unsere Daten zeigen, dass die lysosomale PLA<sub>1</sub> aus der Makrophagen-Zelllinie RAW B auch PS und PI degradieren kann.

Beide lysosomalen PLA<sub>2</sub> scheinen also eine gewisse Rolle beim Umsatz des Lungensurfactant zu spielen. Offenbar wird jedoch der Ausfall eines dieser Enzyme in den Mäusen teilweise kompensiert. Es ist durchaus denkbar, dass die hier untersuchte lysosomale PLA<sub>1</sub> diese Kompensation übernimmt.

Derzeit bleibt die physiologische Rolle der lysosomalen PLA<sub>1</sub> jedoch noch Spekulation. Durch die in der vorliegenden Arbeit erreichten Identifikation von zwei Kandidatengen, welche die lysosomale PLA<sub>1</sub> codieren könnten, wird der Grundstein für weiterführende Untersuchungen gelegt. Dabei stellt die hier identifizierte PLD4 den sehr viel wahrscheinlicheren Kandidaten für die lysosomale PLA<sub>1</sub> dar. Eine rekombinante Darstellung der Kandidaten als Fusionsproteine wird endgültig darüber Aufschluss geben, welches Gen tatsächlich die Aktivität codiert. Dies wird im Weiteren die Generation von Knock-Out-Mäusen ermöglichen, aus welchen sich Hinweise auf die physiologische Rolle ergeben werden. Man wird sehen, inwiefern die lysosomale PLA<sub>1</sub> am *phospholipid remodeling*, an der Degradation von phagozytiertem Material, an der Prozessierung von Lipidantigenen oder am Surfactant-Umsatz beteiligt ist.

# Literaturverzeichnis

- [1] ABE, A. ; HIRAOKA, M. ; WILD, S. ; WILCOXEN, S. E. ; PAINE, R. ; SHAYMAN, J. A.: Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Oct, Nr. 41, 42605–42611. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407834200>. – DOI 10.1074/jbc.M407834200
- [2] ACKERMANN, E. J. ; KEMPNER, E. S. ; DENNIS, E. A.: Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Mar, Nr. 12, S. 9227–9233
- [3] AHYAYAUCH, H. ; VILLAR, A. V. ; ALONSO, A. ; GOÑI, F. M.: Modulation of PI-specific phospholipase C by membrane curvature and molecular order. In: *Biochemistry* 44 (2005), Aug, Nr. 34, 11592–11600. <http://dx.doi.org/10.1021/bi050715k>. – DOI 10.1021/bi050715k
- [4] AKOH, C. C. ; LEE, G.-C. ; LIAW, Y.-C. ; HUANG, T.-H. ; SHAW, J.-F. : GDSL family of serine esterases/lipases. In: *Prog Lipid Res* 43 (2004), Nov, Nr. 6, 534–552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>. – DOI 10.1016/j.plipres.2004.09.002
- [5] AL-KHOURI, A. M. ; PAULE, M. R.: A novel RNA polymerase I transcription initiation factor, TIF-IE, commits rRNA genes by interaction with TIF-IB, not by DNA binding. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), Feb, Nr. 3, S. 750–761
- [6] ALAHVERDJIEVA, V. ; IVANOVA, M. ; VERGER, R. ; PANAIOTOV, I. : A kinetic study of the formation of beta-cyclodextrin complexes with monomolecular films of fatty acids and glycerides spread at the air/water interface. In: *Colloids Surf B Biointerfaces* 42 (2005), Apr, Nr. 1, 9–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.01.003>. – DOI 10.1016/j.colsurfb.2005.01.003
- [7] ALOULOU, A. ; RODRIGUEZ, J. A. ; FERNANDEZ, S. ; OOSTERHOUT, D. van ; PUCCINELLI, D. ; CARRIÈRE, F. : Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Sep, Nr. 9, 995–1013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.06.009>. – DOI 10.1016/j.bbaliip.2006.06.009
- [8] AMIDON, B. ; BROWN, A. ; WAITE, M. : Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycero)phosphate. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nov, Nr. 44, 13995–14002. <http://dx.doi.org/10.1021/bi961164o>. – DOI 10.1021/bi961164o
- [9] ANDERSON, N. ; BORLAK, J. : Drug-induced phospholipidosis. In: *FEBS Lett* 580 (2006), Oct, Nr. 23, 5533–5540. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.061>. – DOI 10.1016/j.febslet.2006.08.061
- [10] ANGÉNIEUX, C. ; FRAISIER, V. ; MAÎTRE, B. ; RACINE, V. ; WEL, N. van d. ; FRICKER, D. ; PROAMER, F. ; SACHSE, M. ; CAZENAVE, J.-P. ; PETERS, P. ; GOUD, B. ; HANAU, D. ; SIBARITA, J.-B. ; SALAMERO, J. ; SALLE, H. de l.: The cellular pathway of CD1e in immature and maturing dendritic cells. In: *Traffic* 6 (2005), Apr, Nr. 4, 286–302. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00272.x>. – DOI 10.1111/j.1600-0854.2005.00272.x
- [11] AOKI, J. ; INOUE, A. ; MAKIDE, K. ; SAIKI, N. ; ARAI, H. : Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. In: *Biochimie*

- 89 (2007), Feb, Nr. 2, 197–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.021>. – DOI 10.1016/j.biochi.2006.09.021
- [12] APITZ-CASTRO, R. ; JAIN, M. K. ; HAAS, G. H. D.: Origin of the latency phase during the action of phospholipase A2 on unmodified phosphatidylcholine vesicles. In: *Biochim Biophys Acta* 688 (1982), Jun, Nr. 2, S. 349–356
- [13] ASAI, K. ; HIRABAYASHI, T. ; HOJOU, T. ; UOZUMI, N. ; TAGUCHI, R. ; SHIMIZU, T. : Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2 $\gamma$ ). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Mar, Nr. 10, 8809–8814. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212117200>. – DOI 10.1074/jbc.M212117200
- [14] ATSUMI, G. ; MURAKAMI, M. ; KOJIMA, K. ; HADANO, A. ; TAJIMA, M. ; KUDO, I. : Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Jun, Nr. 24, 18248–18258. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M000271200>. – DOI 10.1074/jbc.M000271200
- [15] BAEK, S. H. ; KWAK, J. Y. ; LEE, S. H. ; LEE, T. ; RYU, S. H. ; UHLINGER, D. J. ; LAMBETH, J. D.: Lipase activities of p37, the major envelope protein of vaccinia virus. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Dec, Nr. 51, S. 32042–32049
- [16] BALSINDE, J. ; DENNIS, E. A.: Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jun, Nr. 26, S. 16069–16072
- [17] BARSUKOV, L. I. ; DAM, C. W. ; BERGELSON, L. D. ; MUZJA, G. I. ; WIRTZ, K. W.: Affinity chromatography of the phosphatidylcholine exchange protein from bovine liver. In: *Biochim Biophys Acta* 513 (1978), Nov, Nr. 2, S. 198–204
- [18] BAUER, A. ; HÜTTINGER, R. ; STAFFLER, G. ; HANSMANN, C. ; SCHMIDT, W. ; MAJDIC, O. ; KNAPP, W. ; STOCKINGER, H. : Analysis of the requirement for beta 2-microglobulin for expression and formation of human CD1 antigens. In: *Eur J Immunol* 27 (1997), Jun, Nr. 6, S. 1366–1373
- [19] BAYBURT, T. ; GELB, M. H.: Interfacial catalysis by human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 on anionic vesicles in the scooting mode. In: *Biochemistry* 36 (1997), Mar, Nr. 11, 3216–3231. <http://dx.doi.org/10.1021/bi961659d>. – DOI 10.1021/bi961659d
- [20] BAZAN, N. G. ; TURCO, E. B. R. ; ALLAN, G. : Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. In: *J Neurotrauma* 12 (1995), Oct, Nr. 5, S. 791–814
- [21] BEATTY, W. L. ; RHOADES, E. R. ; ULLRICH, H. J. ; CHATTERJEE, D. ; HEUSER, J. E. ; RUSSELL, D. G.: Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. In: *Traffic* 1 (2000), Mar, Nr. 3, S. 235–247
- [22] BEHAR, S. M. ; PODREBARAC, T. A. ; ROY, C. J. ; WANG, C. R. ; BRENNER, M. B.: Diverse TCRs recognize murine CD1. In: *J Immunol* 162 (1999), Jan, Nr. 1, S. 161–167
- [23] BERG, O. G. ; GELB, M. H. ; TSAI, M. D. ; JAIN, M. K.: Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A(2)-paradigm. In: *Chem Rev* 101 (2001), Sep, Nr. 9, S. 2613–2654
- [24] BOHLEY, P. ; SEGLEN, P. O.: Proteases and proteolysis in the lysosome. In: *Experientia* 48 (1992), Feb, Nr. 2, S. 151–157
- [25] BRADSHAW, C. D. ; ELLA, K. M. ; QI, C. ; SANBURY, H. M. ; WISEHART-JOHNSON, A. E. ; MEIER, K. E.: Effects of phorbol ester on phospholipase D and mitogen-activated protein kinase activities in T-lymphocyte cell lines. In: *Immunol Lett* 53 (1996), Nov, Nr. 2-3, S. 69–76
- [26] BRAULKE, T. : Origin of lysosomal proteins. In: *Subcell Biochem* 27 (1996), S. 15–49

- [27] BRAULKE, T. ; GEUZE, H. J. ; SLOT, J. W. ; HASILIK, A. ; FIGURA, K. von: On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells. In: *Eur J Cell Biol* 43 (1987), Jun, Nr. 3, S. 316–321
- [28] BRENNAN, P. J.: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis (Edinb)* 83 (2003), Nr. 1-3, S. 91–97
- [29] BRIGGS, M. R. ; KADONAGA, J. T. ; BELL, S. P. ; TJIAN, R. : Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. In: *Science* 234 (1986), Oct, Nr. 4772, S. 47–52
- [30] BRIGL, M. ; BRENNER, M. B.: CD1: antigen presentation and T cell function. In: *Annu Rev Immunol* 22 (2004), 817–890. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608>. – DOI 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104608
- [31] BUCKLAND, A. G. ; WILTON, D. C.: Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. In: *Biochim Biophys Acta* 1483 (2000), Jan, Nr. 2, S. 199–216
- [32] BUCKLAND, A. G. ; WILTON, D. C.: The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). In: *Biochim Biophys Acta* 1488 (2000), Oct, Nr. 1-2, S. 71–82
- [33] BUCKLEY, J. T.: Cone-shaped lipids increase the susceptibility of phospholipids in bilayers to the action of phospholipases. In: *Can J Biochem Cell Biol* 63 (1985), Apr, Nr. 4, S. 263–267
- [34] CARRIÈRE, F. ; MOREAU, H. ; RAPHEL, V. ; LAUGIER, R. ; BENICOURT, C. ; JUNIEN, J. L. ; VERGER, R. : Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. In: *Eur J Biochem* 202 (1991), Nov, Nr. 1, S. 75–83
- [35] CHAHINIAN, H. ; SNABE, T. ; ATTIAS, C. ; FOJAN, P. ; PETERSEN, S. B. ; CARRIÈRE, F. : How gastric lipase, an interfacial enzyme with a Ser-His-Asp catalytic triad, acts optimally at acidic pH. In: *Biochemistry* 45 (2006), Jan, Nr. 3, 993–1001. <http://dx.doi.org/10.1021/bi0518803>. – DOI 10.1021/bi0518803
- [36] CHANG, T.-Y. ; CHANG, C. C. Y. ; OHGAMI, N. ; YAMAUCHI, Y. : Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 22 (2006), 129–157. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656>. – DOI 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656
- [37] CHERUKU, S. R. ; XU, Z. ; DUTIA, R. ; LOBEL, P. ; STORCH, J. : Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Oct, Nr. 42, 31594–31604. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M602765200>. – DOI 10.1074/jbc.M602765200
- [38] CHOW, M. K. M. ; AMIN, A. A. ; FULTON, K. F. ; FERNANDO, T. ; KAMAU, L. ; BATTY, C. ; LOUCA, M. ; HO, S. ; WHISSTOCK, J. C. ; BOTTOMLEY, S. P. ; BUCKLE, A. M.: The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Jan, Nr. Database issue, D207–D212. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj080>. – DOI 10.1093/nar/gkj080
- [39] CHU, Z. ; WITTE, D. P. ; QI, X. : Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. In: *Exp Cell Res* 303 (2005), Feb, Nr. 2, 300–307. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.029>. – DOI 10.1016/j.yexcr.2004.09.029
- [40] COUTHON, F. ; CLOTTES, E. ; VIAL, C. : Refolding of SDS- and thermally denatured MM-creatine kinase using cyclodextrins. In: *Biochem Biophys Res Commun* 227 (1996), Oct, Nr. 3, 854–860. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1996.1596>. – DOI 10.1006/bbrc.1996.1596
- [41] CRONAN, J. E.: Bacterial membrane lipids: where do we stand? In: *Annu Rev Microbiol* 57 (2003), 203–224. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090851>. – DOI 10.1146/annurev.micro.57.030502.090851

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [42] CUERVO, A. M. ; DICE, J. F.: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. In: *Science* 273 (1996), Jul, Nr. 5274, S. 501–503
- [43] CUERVO, A. M. ; DICE, J. F.: Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. In: *J Mol Med* 76 (1998), Jan, Nr. 1, S. 6–12
- [44] DERETIC, V. ; SINGH, S. ; MASTER, S. ; HARRIS, J. ; ROBERTS, E. ; KYEI, G. ; DAVIS, A. ; HARO, S. de ; NAYLOR, J. ; LEE, H.-H. ; VERGNE, I. : Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. In: *Cell Microbiol* 8 (2006), May, Nr. 5, 719–727. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00705.x> – DOI 10.1111/j.1462-5822.2006.00705.x
- [45] DEUSCHL, F. ; KOLLMANN, K. ; FIGURA, K. von ; LÜBKE, T. : Molecular characterization of the hypothetical 66.3-kDa protein in mouse: lysosomal targeting, glycosylation, processing and tissue distribution. In: *FEBS Lett* 580 (2006), Oct, Nr. 24, 5747–5752. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.029> – DOI 10.1016/j.febslet.2006.09.029
- [46] DIJKMAN, R. ; BEIBOER, S. H. ; VERHEIJ, H. M.: An affinity column for phospholipase A2 based on immobilised acylaminophospholipid analogues. In: *Biochim Biophys Acta* 1347 (1997), Jul, Nr. 1, S. 1–8
- [47] DIKIC, I. : ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis. In: *Bioessays* 26 (2004), Jun, Nr. 6, 604–607. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20068> – DOI 10.1002/bies.20068
- [48] DUVE C. de ; R., W. : Functions of lysosomes. In: *Annu Rev Physiol* 28 (1966), 435–492. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251> – DOI 10.1146/annurev.ph.28.030166.002251
- [49] ESKELINEN, E.-L. : Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. In: *Autophagy* 1 (2005), Apr, Nr. 1, S. 1–10
- [50] ESKELINEN, E.-L. ; TANAKA, Y. ; SAFTIG, P. : At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. In: *Trends Cell Biol* 13 (2003), Mar, Nr. 3, S. 137–145
- [51] EVANS, J. H. ; SPENCER, D. M. ; ZWEIFACH, A. ; LESLIE, C. C.: Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Aug, Nr. 32, 30150–30160. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M100943200> – DOI 10.1074/jbc.M100943200
- [52] FADOK, V. A. ; BRATTON, D. L. ; KONOWAL, A. ; FREED, P. W. ; WESTCOTT, J. Y. ; HENSON, P. M.: Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. In: *J Clin Invest* 101 (1998), Feb, Nr. 4, S. 890–898
- [53] FERLINZ, K. ; KOPAL, G. ; BERNARDO, K. ; LINKE, T. ; BAR, J. ; BREIDEN, B. ; NEUMANN, U. ; LANG, F. ; SCHUCHMAN, E. H. ; SANDHOFF, K. : Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Sep, Nr. 38, 35352–35360. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M103066200> – DOI 10.1074/jbc.M103066200
- [54] FISCHER, K. ; CHATTERJEE, D. ; TORRELLES, J. ; BRENNAN, P. J. ; KAUFMANN, S. H. ; SCHAIBLE, U. E.: Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2. In: *J Immunol* 167 (2001), Aug, Nr. 4, S. 2187–2192
- [55] FISCHER, K. ; SCOTET, E. ; NIEMEYER, M. ; KOEBERNICK, H. ; ZERRAHN, J. ; MAILLET, S. ; HURWITZ, R. ; KURSAR, M. ; BONNEVILLE, M. ; KAUFMANN, S. H. E. ; SCHAIBLE, U. E.: Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Jul, Nr. 29, 10685–10690. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307871101> – DOI 10.1073/pnas.0307871101

- [56] FISHER, A. B. ; DODIA, C. ; FEINSTEIN, S. I. ; HO, Y.-S. : Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal-type phospholipase A2. In: *J Lipid Res* 46 (2005), Jun, Nr. 6, 1248–1256. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400499-JLR200>. – DOI 10.1194/jlr.M400499-JLR200
- [57] FOREMAN-WYKERT, A. K. ; WEINRAUCH, Y. ; ELSBACH, P. ; WEISS, J. : Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. In: *J Clin Invest* 103 (1999), Mar, Nr. 5, S. 715–721
- [58] FRANSON, R. C. ; WAITE, M. : Lysosomal phospholipase A 1 and A 2 of normal and bacillus calmette guerin-induced alveolar macrophages. In: *J Cell Biol* 56 (1973), Mar, Nr. 3, S. 621–627
- [59] FRIEDLAND, N. ; LIOU, H.-L. ; LOBEL, P. ; STOCK, A. M.: Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Mar, Nr. 5, 2512–2517. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0437840100>. – DOI 10.1073/pnas.0437840100
- [60] FROHMAN, M. A. ; SUNG, T. C. ; MORRIS, A. J.: Mammalian phospholipase D structure and regulation. In: *Biochim Biophys Acta* 1439 (1999), Jul, Nr. 2, S. 175–186
- [61] FUNK, C. D.: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. In: *Science* 294 (2001), Nov, Nr. 5548, 1871–1875. <http://dx.doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>. – DOI 10.1126/science.294.5548.1871
- [62] FUTERMAN, A. H. ; MEER, G. van: The cell biology of lysosomal storage disorders. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004), Jul, Nr. 7, 554–565. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1423>. – DOI 10.1038/nrm1423
- [63] FÜRST, W. ; SANDHOFF, K. : Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. In: *Biochim Biophys Acta* 1126 (1992), Jun, Nr. 1, S. 1–16
- [64] GONZALEZ-NORIEGA, A. ; GRUBB, J. H. ; TALKAD, V. ; SLY, W. S.: Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. In: *J Cell Biol* 85 (1980), Jun, Nr. 3, S. 839–852
- [65] GOTTLIN, E. B. ; RUDOLPH, A. E. ; ZHAO, Y. ; MATTHEWS, H. R. ; DIXON, J. E.: Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Aug, Nr. 16, S. 9202–9207
- [66] GRACE, M. E. ; GRABOWSKI, G. A.: Human acid beta-glucosidase: glycosylation is required for catalytic activity. In: *Biochem Biophys Res Commun* 168 (1990), Apr, Nr. 2, S. 771–777
- [67] GROSENBACH, D. W. ; HRUBY, D. E.: Biology of vaccinia virus acylproteins. In: *Front Biosci* 3 (1998), Mar, S. d354–d364
- [68] GRUENBERG, J. : The endocytic pathway: a mosaic of domains. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), Oct, Nr. 10, 721–730. <http://dx.doi.org/10.1038/35096054>. – DOI 10.1038/35096054
- [69] GUMPERZ, J. E. ; ROY, C. ; MAKOWSKA, A. ; LUM, D. ; SUGITA, M. ; PODREBARAC, T. ; KOEZUKA, Y. ; PORCELLI, S. A. ; CARDELL, S. ; BRENNER, M. B. ; BEHAR, S. M.: Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. In: *Immunity* 12 (2000), Feb, Nr. 2, S. 211–221
- [70] GUMPERZ, J. E.: The ins and outs of CD1 molecules: bringing lipids under immunological surveillance. In: *Traffic* 7 (2006), Jan, Nr. 1, 2–13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00364.x>. – DOI 10.1111/j.1600-0854.2005.00364.x
- [71] HAGER, D. A. ; BURGESS, R. R.: Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. In: *Anal Biochem* 109 (1980), Nov, Nr. 1, S. 76–86

- [72] HANEWINKEL, H. ; GLÖSSL, J. ; KRESSE, H. : Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. In: *J Biol Chem* 262 (1987), Sep, Nr. 25, S. 12351–12355
- [73] HASILIK, A. : The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. In: *Experientia* 48 (1992), Feb, Nr. 2, S. 130–151
- [74] HASSAN, A. J. ; ZENG, J. ; NI, X. ; MORALES, C. R.: The trafficking of prosaposin (SGP-1) and GM2AP to the lysosomes of TM4 Sertoli cells is mediated by sortilin and monomeric adaptor proteins. In: *Mol Reprod Dev* 68 (2004), Aug, Nr. 4, 476–483. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20096>. – DOI 10.1002/mrd.20096
- [75] HIGGS, H. N. ; HAN, M. H. ; JOHNSON, G. E. ; GLOMSET, J. A.: Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine testis. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Mar, Nr. 10, S. 5468–5477
- [76] HILLE-REHFELD, A. : Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. In: *Biochim Biophys Acta* 1241 (1995), Jul, Nr. 2, S. 177–194
- [77] HIRABAYASHI, T. ; KUME, K. ; HIROSE, K. ; YOKOMIZO, T. ; IINO, M. ; ITOH, H. ; SHIMIZU, T. : Critical duration of intracellular Ca<sup>2+</sup> response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Feb, Nr. 8, S. 5163–5169
- [78] HIRAOKA, M. ; ABE, A. ; LU, Y. ; YANG, K. ; HAN, X. ; GROSS, R. W. ; SHAYMAN, J. A.: Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. In: *Mol Cell Biol* 26 (2006), Aug, Nr. 16, 6139–6148. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00627-06>. – DOI 10.1128/MCB.00627-06
- [79] HIRAOKA, M. ; ABE, A. ; SHAYMAN, J. A.: Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Mar, Nr. 12, 10090–10099. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111977200>. – DOI 10.1074/jbc.M111977200
- [80] HODGKIN, M. N. ; PETTITT, T. R. ; MARTIN, A. ; MICHELL, R. H. ; PEMBERTON, A. J. ; WAKELAM, M. J.: Diacylglycerols and phosphatidates: which molecular species are intracellular messengers? In: *Trends Biochem Sci* 23 (1998), Jun, Nr. 6, S. 200–204
- [81] HOFLACK, B. ; FUJIMOTO, K. ; KORNFELD, S. : The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. In: *J Biol Chem* 262 (1987), Jan, Nr. 1, S. 123–129
- [82] HOLOPAINEN, J. M. ; SÖDERLUND, T. ; ALAKOSKELA, J.-M. ; SÄILY, M. ; ERIKSSON, O. ; KINNUNEN, P. K. J.: Intermolecular interactions of lysobisphosphatidic acid with phosphatidylcholine in mixed bilayers. In: *Chem Phys Lipids* 133 (2005), Jan, Nr. 1, 51–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.004>. – DOI 10.1016/j.chemphyslip.2004.08.004
- [83] HONEY, K. ; RUDENSKY, A. Y.: Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. In: *Nat Rev Immunol* 3 (2003), Jun, Nr. 6, 472–482. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1110>. – DOI 10.1038/nri1110
- [84] HORTON, P. ; PARK, K.-J. ; OBAYASHI, T. ; FUJITA, N. ; HARADA, H. ; ADAMS-COLLIER, C. J. ; NAKAI, K. : WoLF PSORT: protein localization predictor. In: *Nucleic Acids Res* (2007), May. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm259>. – DOI 10.1093/nar/gkm259
- [85] HOSTETLER, K. Y. ; GARDNER, M. F. ; GIORDANO, J. R.: Purification of lysosomal phospholipase A and demonstration of proteins that inhibit phospholipase A in a lysosomal fraction from rat kidney cortex. In: *Biochemistry* 25 (1986), Oct, Nr. 21, S. 6456–6461
- [86] HOSTETLER, K. Y. ; YAZAKI, P. J. ; BOSCH, H. van d.: Purification of lysosomal phospholipase A. Evidence for multiple isoenzymes in rat liver. In: *J Biol Chem* 257 (1982), Nov, Nr. 22, S. 13367–13373

- [87] HSING, L. C. ; RUDENSKY, A. Y.: The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. In: *Immunol Rev* 207 (2005), Oct, 229–241. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x>. – DOI 10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x
- [88] HU, Z.-Z. ; VALENCIA, J. C. ; HUANG, H. ; CHI, A. ; SHABANOWITZ, J. ; HEARING, V. J. ; APPELLA, E. ; WU, C. : Comparative Bioinformatics Analyses and Profiling of Lysosome-Related Organelle Proteomes. In: *Int J Mass Spectrom* 259 (2007), Jan, Nr. 1-3, 147–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2006.09.024>. – DOI 10.1016/j.ijms.2006.09.024
- [89] I. PANAIOTOV, R. V.: Enzymatic reactions at the interface. In: *Physical Chemistry of Biological Interfaces* ed. by W. Norde and A. Baszkin (2000), S. 359–400
- [90] INOUE, K. ; ARAI, H. ; AOKI, J. ; MÜLLER, G. (Hrsg.) ; PETRY, S. (Hrsg.): *Lipases and Phospholipases in Drug Development*. 1st Edition. Wiley-VCH, 2004
- [91] JACKMAN, R. M. ; STENGER, S. ; LEE, A. ; MOODY, D. B. ; ROGERS, R. A. ; NIAZI, K. R. ; SUGITA, M. ; MODLIN, R. L. ; PETERS, P. J. ; PORCELLI, S. A.: The tyrosine-containing cytoplasmic tail of CD1b is essential for its efficient presentation of bacterial lipid antigens. In: *Immunity* 8 (1998), Mar, Nr. 3, S. 341–351
- [92] JAIN, M. K. ; BERG, O. G.: The kinetics of interfacial catalysis by phospholipase A2 and regulation of interfacial activation: hopping versus scooting. In: *Biochim Biophys Acta* 1002 (1989), Apr, Nr. 2, S. 127–156
- [93] JANSEN, S. M. ; GROENER, J. E. ; POORTHUIS, B. J.: Lysosomal phospholipase activity is decreased in mucopolidosis II and III fibroblasts. In: *Biochim Biophys Acta* 1436 (1999), Jan, Nr. 3, S. 363–369
- [94] JENKINS, G. M. ; FROHMAN, M. A.: Phospholipase D: a lipid centric review. In: *Cell Mol Life Sci* 62 (2005), Oct, Nr. 19-20, 2305–2316. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5195-z>. – DOI 10.1007/s00018-005-5195-z
- [95] JENSEN, A. G. ; CHEMALI, M. ; CHAPEL, A. ; KIEFFER-JAQUINOD, S. ; JADOT, M. ; GARIN, J. ; JOURNET, A. : Biochemical characterization and lysosomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76 (hypothetical protein LOC196463). In: *Biochem J* 402 (2007), Mar, Nr. 3, 449–458. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20061205>. – DOI 10.1042/BJ20061205
- [96] JOURNET, A. ; CHAPEL, A. ; KIEFFER, S. ; ROUX, F. ; GARIN, J. : Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. In: *Proteomics* 2 (2002), Aug, Nr. 8, 1026–1040. <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-I>. – DOI 3.0.CO;2-I
- [97] KARABINA, S.-A. ; NINIO, E. : Plasma PAF-acetylhydrolase: an unfulfilled promise? In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Nov, Nr. 11, 1351–1358. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.05.008>. – DOI 10.1016/j.bbailip.2006.05.008
- [98] KIM, I. ; RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S. ; LEMASTERS, J. J.: Selective degradation of mitochondria by mitophagy. In: *Arch Biochem Biophys* (2007), Apr. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.034>. – DOI 10.1016/j.abb.2007.03.034
- [99] KIM, T. S. ; DODIA, C. ; CHEN, X. ; HENNIGAN, B. B. ; JAIN, M. ; FEINSTEIN, S. I. ; FISHER, A. B.: Cloning and expression of rat lung acidic Ca(2+)-independent PLA2 and its organ distribution. In: *Am J Physiol* 274 (1998), May, Nr. 5 Pt 1, S. L750–L761
- [100] KIM, T. S. ; SUNDARESH, C. S. ; FEINSTEIN, S. I. ; DODIA, C. ; SKACH, W. R. ; JAIN, M. K. ; NAGASE, T. ; SEKI, N. ; ISHIKAWA, K. ; NOMURA, N. ; FISHER, A. B.: Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jan, Nr. 4, S. 2542–2550
- [101] KINKAID, A. R. ; OTHMAN, R. ; VOYSEY, J. ; WILTON, D. C.: Phospholipase D and phosphatidic acid enhance the hydrolysis of phospholipids in vesicles and in cell membranes by human secreted phospholipase A2. In: *Biochim Biophys Acta* 1390 (1998), Feb, Nr. 2, S. 173–185

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [102] KINSKY, S. C. ; LOADER, J. E. ; BENEDICT, S. H.: Phorbol ester activation of phospholipase D in human monocytes but not peripheral blood lymphocytes. In: *Biochem Biophys Res Commun* 162 (1989), Jul, Nr. 2, S. 788–793
- [103] KOBAYASHI, T. ; BEUCHAT, M. H. ; LINDSAY, M. ; FRIAS, S. ; PALMITER, R. D. ; SAKURABA, H. ; PARTON, R. G. ; GRUENBERG, J. : Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. In: *Nat Cell Biol* 1 (1999), Jun, Nr. 2, 113–118. <http://dx.doi.org/10.1038/10084>. – DOI 10.1038/10084
- [104] KOBAYASHI, T. ; STANG, E. ; FANG, K. S. ; MOERLOOSE, P. de ; PARTON, R. G. ; GRUENBERG, J. : A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. In: *Nature* 392 (1998), Mar, Nr. 6672, 193–197. <http://dx.doi.org/10.1038/32440>. – DOI 10.1038/32440
- [105] KOBAYASHI, T. ; BEUCHAT, M.-H. ; CHEVALLIER, J. ; MAKINO, A. ; MAYRAN, N. ; ESCOLA, J.-M. ; LEBRAND, C. ; COSSON, P. ; KOBAYASHI, T. ; GRUENBERG, J. : Separation and characterization of late endosomal membrane domains. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Aug, Nr. 35, 32157–32164. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202838200>. – DOI 10.1074/jbc.M202838200
- [106] KODURI, R. S. ; GRÖNROOS, J. O. ; LAINE, V. J. O. ; CALVEZ, C. L. ; LAMBEAU, G. ; NEVALAINEN, T. J. ; GELB, M. H.: Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). In: *J Biol Chem* 277 (2002), Feb, Nr. 8, 5849–5857. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109699200>. – DOI 10.1074/jbc.M109699200
- [107] KOLLMANN, K. ; MUTENDA, K. E. ; BALLEININGER, M. ; ECKERMANN, E. ; FIGURA, K. von ; SCHMIDT, B. ; LÜBKE, T. : Identification of novel lysosomal matrix proteins by proteome analysis. In: *Proteomics* 5 (2005), Oct, Nr. 15, 3966–3978. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401247>. – DOI 10.1002/pmic.200401247
- [108] KOLTER, T. ; SANDHOFF, K. : Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 21 (2005), 81–103. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013>. – DOI 10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013
- [109] KOONIN, E. V.: A duplicated catalytic motif in a new superfamily of phosphohydrolases and phospholipid synthases that includes poxvirus envelope proteins. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Jul, Nr. 7, S. 242–243
- [110] KORNFELD, S. : Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. In: *J Clin Invest* 77 (1986), Jan, Nr. 1, S. 1–6
- [111] KORNFELD, S. : Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. In: *Annu Rev Biochem* 61 (1992), 307–330. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.001515>. – DOI 10.1146/annurev.bi.61.070192.001515
- [112] KORNFELD, S. ; MELLMAN, I. : The biogenesis of lysosomes. In: *Annu Rev Cell Biol* 5 (1989), 483–525. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.05.110189.002411>. – DOI 10.1146/annurev.cb.05.110189.002411
- [113] KREUZEDER, J. : *Zur Rolle der lysosomalen Phospholipase A2 bei der Antigenprozessierung im Makrophagen*, Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Diplomarbeit, 2002
- [114] KUDO, I. ; MURAKAMI, M. : Phospholipase A2 enzymes. In: *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002), Aug, S. 3–58
- [115] KUNDRÁ, R. ; KORNFELD, S. : Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Oct, Nr. 43, S. 31039–31046
- [116] KUNZE, H. ; LÖFFLER, B. M.: Acid phospholipase A1 in liver—a brief survey. In: *Klin Wochenschr* 67 (1989), Feb, Nr. 3, S. 126–130

- [117] LANGNER, M. ; KUBICA, K. : The electrostatics of lipid surfaces. In: *Chem Phys Lipids* 101 (1999), Aug, Nr. 1, S. 3–35
- [118] LEFRANCOIS, S. ; ZENG, J. ; HASSAN, A. J. ; CANUEL, M. ; MORALES, C. R.: The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. In: *EMBO J* 22 (2003), Dec, Nr. 24, 6430–6437. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg629>. – DOI 10.1093/emboj/cdg629
- [119] LEVINE, B. ; KLIONSKY, D. J.: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. In: *Dev Cell* 6 (2004), Apr, Nr. 4, S. 463–477
- [120] LIBERO, G. D. ; MORI, L. : Mechanisms of lipid-antigen generation and presentation to T cells. In: *Trends Immunol* 27 (2006), Oct, Nr. 10, 485–492. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2006.08.001>. – DOI 10.1016/j.it.2006.08.001
- [121] LICHTENSTEIGER, C. A. ; VIMR, E. R.: Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. In: *Vet Microbiol* 93 (2003), May, Nr. 1, S. 79–87
- [122] LIO, Y. C. ; DENNIS, E. A.: Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>. In: *Biochim Biophys Acta* 1392 (1998), Jun, Nr. 2-3, S. 320–332
- [123] LITYNSKA, A. ; PRZYBYLO, M. : Does glycosylation of lysosomal proteins show age-related changes in rat liver? In: *Mech Ageing Dev* 102 (1998), May, Nr. 1, S. 33–43
- [124] LOCATELLI-HOOPS, S. ; REMMEL, N. ; KLINGENSTEIN, R. ; BREIDEN, B. ; ROSSOCHA, M. ; SCHOENIGER, M. ; KOENIGS, C. ; SAENGER, W. ; SANDHOFF, K. : Saposin A mobilizes lipids from low cholesterol and high bis(monoacylglycerol)phosphate-containing membranes: patient variant Saposin A lacks lipid extraction capacity. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Oct, Nr. 43, 32451–32460. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M607281200>. – DOI 10.1074/jbc.M607281200
- [125] LUDWIG, T. ; MUNIER-LEHMANN, H. ; BAUER, U. ; HOLLINSHEAD, M. ; OVITT, C. ; LOBEL, P. ; HOFACK, B. : Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts. In: *EMBO J* 13 (1994), Aug, Nr. 15, S. 3430–3437
- [126] LÖFFLER, B. M. ; KUNZE, H. : Fractionation, biochemical characterization and lysosomal phospholipases of human liver. In: *FEBS Lett* 216 (1987), May, Nr. 1, S. 51–56
- [127] LÖFFLER, B. M. ; KUNZE, H. : An improved purification procedure for rat liver lysosomal phospholipase A<sub>1</sub>. In: *Biochem Int* 18 (1989), Jan, Nr. 1, S. 129–139
- [128] MATSUI, H. ; CHEVALLIER, J. ; MAYRAN, N. ; BLANC, I. L. ; FERGUSON, C. ; FAURÉ, J. ; BLANC, N. S. ; MATILE, S. ; DUBOCHET, J. ; SADOUL, R. ; PARTON, R. G. ; VILBOIS, F. ; GRUENBERG, J. : Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. In: *Science* 303 (2004), Jan, Nr. 5657, 531–534. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092425>. – DOI 10.1126/science.1092425
- [129] MAYOR, S. ; SABHARANJAK, S. ; MAXFIELD, F. R.: Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes. In: *EMBO J* 17 (1998), Aug, Nr. 16, 4626–4638. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.16.4626>. – DOI 10.1093/emboj/17.16.4626
- [130] MCDERMOTT, M. ; WAKELAM, M. J. O. ; MORRIS, A. J.: Phospholipase D. In: *Biochem Cell Biol* 82 (2004), Feb, Nr. 1, 225–253. <http://dx.doi.org/10.1139/o03-079>. – DOI 10.1139/o03-079
- [131] MEDZHITOV, R. ; JANEWAY, C. A.: Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. In: *Semin Immunol* 10 (1998), Oct, Nr. 5, S. 351–353
- [132] MELLMAN, I. : The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. In: *J Exp Biol* 172 (1992), Nov, S. 39–45

- [133] MELLMAN, I. ; FUCHS, R. ; HELENIUS, A. : Acidification of the endocytic and exocytic pathways. In: *Annu Rev Biochem* 55 (1986), 663–700. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003311>. – DOI 10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
- [134] MELLMAN, I. ; WARREN, G. : The road taken: past and future foundations of membrane traffic. In: *Cell* 100 (2000), Jan, Nr. 1, S. 99–112
- [135] MINGEOT-LECLERCQ, M. P. ; LAURENT, G. ; TULKENS, P. M.: Biochemical mechanism of aminoglycoside-induced inhibition of phosphatidylcholine hydrolysis by lysosomal phospholipases. In: *Biochem Pharmacol* 37 (1988), Feb, Nr. 4, S. 591–599
- [136] MINGEOT-LECLERCQ, M. P. ; PIRET, J. ; BRASSEUR, R. ; TULKENS, P. M.: Effect of acidic phospholipids on the activity of lysosomal phospholipases and on their inhibition by aminoglycoside antibiotics–I. Biochemical analysis. In: *Biochem Pharmacol* 40 (1990), Aug, Nr. 3, S. 489–497
- [137] MINGEOT-LECLERCQ, M. P. ; PIRET, J. ; TULKENS, P. M. ; BRASSEUR, R. : Effect of acidic phospholipids on the activity of lysosomal phospholipases and on their inhibition induced by aminoglycoside antibiotics–II. Conformational analysis. In: *Biochem Pharmacol* 40 (1990), Aug, Nr. 3, S. 499–506
- [138] MOODY, D. B. ; REINHOLD, B. B. ; GUY, M. R. ; BECKMAN, E. M. ; FREDERIQUE, D. E. ; FURLONG, S. T. ; YE, S. ; REINHOLD, V. N. ; SIELING, P. A. ; MODLIN, R. L. ; BESRA, G. S. ; PORCELLI, S. A.: Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. In: *Science* 278 (1997), Oct, Nr. 5336, S. 283–286
- [139] MOODY, D. B. ; BRIKEN, V. ; CHENG, T.-Y. ; ROURA-MIR, C. ; GUY, M. R. ; GEHO, D. H. ; TYKOCINSKI, M. L. ; BESRA, G. S. ; PORCELLI, S. A.: Lipid length controls antigen entry into endosomal and nonendosomal pathways for CD1b presentation. In: *Nat Immunol* 3 (2002), May, Nr. 5, 435–442. <http://dx.doi.org/10.1038/ni780>. – DOI 10.1038/ni780
- [140] MOOLENAAR, W. H. ; MEETEREN, L. A. ; GIEPMANS, B. N. G.: The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. In: *Bioessays* 26 (2004), Aug, Nr. 8, 870–881. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20081>. – DOI 10.1002/bies.20081
- [141] MORGAN, C. P. ; INSALL, R. ; HAYNES, L. ; COCKCROFT, S. : Identification of phospholipase B from *Dictyostelium discoideum* reveals a new lipase family present in mammals, flies and nematodes, but not yeast. In: *Biochem J* 382 (2004), Sep, Nr. Pt 2, 441–449. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040110>. – DOI 10.1042/BJ20040110
- [142] MORRIS, A. J. ; FROHMAN, M. A. ; ENGBRECHT, J. : Measurement of phospholipase D activity. In: *Anal Biochem* 252 (1997), Oct, Nr. 1, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1997.2299>. – DOI 10.1006/abio.1997.2299
- [143] MULGREW-NESBITT, A. ; DIRAVIYAM, K. ; WANG, J. ; SINGH, S. ; MURRAY, P. ; LI, Z. ; ROGERS, L. ; MIRKOVIC, N. ; MURRAY, D. : The role of electrostatics in protein-membrane interactions. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Aug, Nr. 8, 812–826. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.07.002>. – DOI 10.1016/j.bbaliip.2006.07.002
- [144] MULLOCK, B. M. ; BRIGHT, N. A. ; FEARON, C. W. ; GRAY, S. R. ; LUZIO, J. P.: Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. In: *J Cell Biol* 140 (1998), Feb, Nr. 3, S. 591–601
- [145] MUNCK, A. ; BÖHM, C. ; SEIBEL, N. M. ; HOSSEINI, Z. H. ; HAMPE, W. : Hu-K4 is a ubiquitously expressed type 2 transmembrane protein associated with the endoplasmic reticulum. In: *FEBS J* 272 (2005), Apr, Nr. 7, 1718–1726. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04601.x>. – DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.04601.x
- [146] MUNIER-LEHMANN, H. ; MAUXION, F. ; BAUER, U. ; LOBEL, P. ; HOFACK, B. : Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Jun, Nr. 25, S. 15166–15174

- [147] MURPHY, R. F.: Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. In: *Trends Cell Biol* 1 (1991), Oct, Nr. 4, S. 77–82
- [148] MUTO, N. ; NAKAMURA, T. ; YAMAMOTO, I. : Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid alpha-glucoside: purification and properties of alpha-glucosidases catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine. In: *J Biochem (Tokyo)* 107 (1990), Feb, Nr. 2, S. 222–227
- [149] MÖBIUS, W. ; DONSELAAR, E. van ; OHNO-IWASHITA, Y. ; SHIMADA, Y. ; HEIJNEN, H. F. G. ; SLOT, J. W. ; GEUZE, H. J.: Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. In: *Traffic* 4 (2003), Apr, Nr. 4, S. 222–231
- [150] NAKAJIMA, K. ichi ; SONODA, H. ; MIZOGUCHI, T. ; AOKI, J. ; ARAI, H. ; NAGAHAMA, M. ; TAGAYA, M. ; TANI, K. : A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Mar, Nr. 13, 11329–11335. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111092200>. – DOI 10.1074/jbc.M111092200
- [151] NALEFSKI, E. A. ; WISNER, M. A. ; CHEN, J. Z. ; SPRANG, S. R. ; FUKUDA, M. ; MIKOSHIBA, K. ; FALKE, J. J.: C2 domains from different Ca<sup>2+</sup> signaling pathways display functional and mechanistic diversity. In: *Biochemistry* 40 (2001), Mar, Nr. 10, S. 3089–3100
- [152] NEVALAINEN, T. J. ; HAAPAMÄKI, M. M. ; GRÖNROOS, J. M.: Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma. In: *Biochim Biophys Acta* 1488 (2000), Oct, Nr. 1-2, S. 83–90
- [153] NIELSEN, L. K. ; RISBO, J. ; CALLISEN, T. H. ; BJØRNHOLM, T. : Lag-burst kinetics in phospholipase A(2) hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy. In: *Biochim Biophys Acta* 1420 (1999), Aug, Nr. 1-2, S. 266–271
- [154] OHKUMA, S. ; POOLE, B. : Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978), Jul, Nr. 7, S. 3327–3331
- [155] OKAZAKI, T. ; STRAUSS, J. F. ; FLICKINGER, G. L.: Lysosomal phospholipase A activities of rat ovarian tissue. In: *Biochim Biophys Acta* 487 (1977), May, Nr. 2, S. 343–353
- [156] OSSIPOV, V. ; LAEMMLI, U. K. ; SCHIBLER, U. : A simple method to renature DNA-binding proteins separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Nucleic Acids Res* 21 (1993), Dec, Nr. 25, S. 6040–6041
- [157] PAI, J. K. ; SIEGEL, M. I. ; EGAN, R. W. ; BILLAH, M. M.: Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Sep, Nr. 25, S. 12472–12477
- [158] PEDERSEN, K. M. ; FINSEN, B. ; CELIS, J. E. ; JENSEN, N. A.: Expression of a novel murine phospholipase D homolog coincides with late neuronal development in the forebrain. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nov, Nr. 47, S. 31494–31504
- [159] PETTITT, T. R. ; MARTIN, A. ; HORTON, T. ; LIOSSIS, C. ; LORD, J. M. ; WAKELAM, M. J.: Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jul, Nr. 28, S. 17354–17359
- [160] PETTITT, T. R. ; MCDERMOTT, M. ; SAQIB, K. M. ; SHIMWELL, N. ; WAKELAM, M. J.: Phospholipase D1b and D2a generate structurally identical phosphatidic acid species in mammalian cells. In: *Biochem J* 360 (2001), Dec, Nr. Pt 3, S. 707–715

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [161] PIRET, J. ; KISHORE, B. K. ; TULKENS, P. M.: Effect of substrate organization on the activity and on the mechanism of gentamicin-induced inhibition of rat liver lysosomal phospholipase A1. In: *Biochem Pharmacol* 43 (1992), Feb, Nr. 4, S. 895–898
- [162] PIRET, J. ; SCHANCK, A. ; DELFOSSE, S. ; BAMBEKE, F. V. ; KISHORE, B. K. ; TULKENS, P. M. ; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P. : Modulation of the in vitro activity of lysosomal phospholipase A1 by membrane lipids. In: *Chem Phys Lipids* 133 (2005), Jan, Nr. 1, 1–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.08.002>. – DOI 10.1016/j.chemphyslip.2004.08.002
- [163] POHLMANN, R. ; BOEKER, M. W. ; FIGURA, K. von: The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nov, Nr. 45, S. 27311–27318
- [164] POMORSKI, T. ; MENON, A. K.: Lipid flippases and their biological functions. In: *Cell Mol Life Sci* 63 (2006), Dec, Nr. 24, 2908–2921. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6167-7>. – DOI 10.1007/s00018-006-6167-7
- [165] PONTING, C. P. ; KERR, I. D.: A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. In: *Protein Sci* 5 (1996), May, Nr. 5, S. 914–922
- [166] PRIGOZY, T. I. ; NAIDENKO, O. ; QASBA, P. ; ELEWAUT, D. ; BROSSAY, L. ; KHURANA, A. ; NATORI, T. ; KOEZUKA, Y. ; KULKARNI, A. ; KRONENBERG, M. : Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. In: *Science* 291 (2001), Jan, Nr. 5504, 664–667. <http://dx.doi.org/10.1126/science.291.5504.664>. – DOI 10.1126/science.291.5504.664
- [167] PRYOR, P. R. ; MULLOCK, B. M. ; BRIGHT, N. A. ; GRAY, S. R. ; LUZIO, J. P.: The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. In: *J Cell Biol* 149 (2000), May, Nr. 5, S. 1053–1062
- [168] RANI, P. G. ; BACHHAWAT, K. ; REDDY, G. B. ; OSCARSON, S. ; SUROLIA, A. : Isothermal titration calorimetric studies on the binding of deoxytrimannoside derivatives with artocarpin: implications for a deep-seated combining site in lectins. In: *Biochemistry* 39 (2000), Sep, Nr. 35, S. 10755–10760
- [169] RAUCH, J. ; GUMPERZ, J. ; ROBINSON, C. ; SKÖLD, M. ; ROY, C. ; YOUNG, D. C. ; LAFLEUR, M. ; MOODY, D. B. ; BRENNER, M. B. ; COSTELLO, C. E. ; BEHAR, S. M.: Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nov, Nr. 48, 47508–47515. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M308089200>. – DOI 10.1074/jbc.M308089200
- [170] REGGIORI, F. ; KLIONSKY, D. J.: Autophagosomes: biogenesis from scratch? In: *Curr Opin Cell Biol* 17 (2005), Aug, Nr. 4, 415–422. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2005.06.007>. – DOI 10.1016/j.ceb.2005.06.007
- [171] REHM, H. : *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, 4. Auflage*. 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, 2002
- [172] REUTENS, A. T. ; BEGLEY, C. G.: Endophilin-1: a multifunctional protein. In: *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002), Oct, Nr. 10, S. 1173–1177
- [173] RHEE, S. G. ; KANG, S. W. ; CHANG, T. S. ; JEONG, W. ; KIM, K. : Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. In: *IUBMB Life* 52 (2001), Jul, Nr. 1-2, S. 35–41
- [174] RHOADES, E. ; HSU, F.-F. ; TORRELLES, J. B. ; TURK, J. ; CHATTERJEE, D. ; RUSSELL, D. G.: Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. In: *Mol Microbiol* 48 (2003), May, Nr. 4, S. 875–888
- [175] R.K., M. ; D.K., G. ; A., M. P. ; V.W., R. : *Harper's Biochemistry*. 24th Edition. Appelton & Lange, 1996

- [176] ROBERTSON, E. R. ; KENNEDY, J. F.: Glycoproteins: a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterisation. In: *Bioseparation* 6 (1996), Feb, Nr. 1, S. 1–15
- [177] ROBINSON, M. ; WAITE, M. : Physical-chemical requirements for the catalysis of substrates by lysosomal phospholipase A1. In: *J Biol Chem* 258 (1983), Dec, Nr. 23, S. 14371–14378
- [178] ROCK, C. O. ; SNYDER, F. : Rapid purification of phospholipase A2 from *Crotalus adamanteus* venom by affinity chromatography. In: *J Biol Chem* 250 (1975), Aug, Nr. 16, S. 6564–6566
- [179] ROSENTHAL, A. F. ; GEYER, R. P.: A synthetic inhibitor of venom lecithinase A. In: *J Biol Chem* 235 (1960), Aug, S. 2202–2206
- [180] ROURA-MIR, C. ; CATÁLFAMO, M. ; CHENG, T.-Y. ; MARQUSEE, E. ; BESRA, G. S. ; JARAQUEMADA, D. ; MOODY, D. B.: CD1a and CD1c activate intrathyroidal T cells during Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. In: *J Immunol* 174 (2005), Mar, Nr. 6, S. 3773–3780
- [181] ROUSSEL, A. ; MILED, N. ; BERTI-DUPUIS, L. ; RIVIÈRE, M. ; SPINELLI, S. ; BERNA, P. ; GRUBER, V. ; VERGER, R. ; CABBILLAU, C. : Crystal structure of the open form of dog gastric lipase in complex with a phosphonate inhibitor. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Jan, Nr. 3, 2266–2274. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109484200>. – DOI 10.1074/jbc.M109484200
- [182] ROZEMA, D. ; GELLMAN, S. H.: Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. In: *Biochemistry* 35 (1996), Dec, Nr. 49, 15760–15771. <http://dx.doi.org/10.1021/bi961638j>. – DOI 10.1021/bi961638j
- [183] SALLE, H. de l. ; MARIOTTI, S. ; ANGENIEUX, C. ; GILLERON, M. ; GARCIA-ALLES, L.-F. ; MALM, D. ; BERG, T. ; PAOLETTI, S. ; MAÎTRE, B. ; MOUREY, L. ; SALAMERO, J. ; CAZENAVE, J. P. ; HANAU, D. ; MORI, L. ; PUZO, G. ; LIBERO, G. D.: Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e. In: *Science* 310 (2005), Nov, Nr. 5752, 1321–1324. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1115301>. – DOI 10.1126/science.1115301
- [184] SALVIOLI, R. ; TATTI, M. ; CIAFFONI, F. ; VACCARO, A. M.: Further studies on the reconstitution of glucosylceramidase activity by Sap C and anionic phospholipids. In: *FEBS Lett* 472 (2000), Apr, Nr. 1, S. 17–21
- [185] SALVIOLI, R. ; TATTI, M. ; SCARPA, S. ; MOAVERO, S. M. ; CIAFFONI, F. ; FELICETTI, F. ; KANESKI, C. R. ; BRADY, R. O. ; VACCARO, A. M.: The N370S (Asn370→Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C. In: *Biochem J* 390 (2005), Aug, Nr. Pt 1, 95–103. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20050325>. – DOI 10.1042/BJ20050325
- [186] SATAKE, Y. ; DIAZ, B. L. ; BALESTRIERI, B. ; LAM, B. K. ; KANAOKA, Y. ; GRUSBY, M. J. ; ARM, J. P.: Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Apr, Nr. 16, 16488–16494. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M313748200>. – DOI 10.1074/jbc.M313748200
- [187] SATISH, P. R. ; SUROLIA, A. : Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. In: *J Biochem Biophys Methods* 49 (2001), Oct, Nr. 1-3, S. 625–640
- [188] SCHAIBLE, U. E. ; HAGENS, K. ; FISCHER, K. ; COLLINS, H. L. ; KAUFMANN, S. H.: Intersection of group I CD1 molecules and mycobacteria in different intracellular compartments of dendritic cells. In: *J Immunol* 164 (2000), May, Nr. 9, S. 4843–4852
- [189] SCHAIBLE, U. E. ; STURGILL-KOSZYCKI, S. ; SCHLESINGER, P. H. ; RUSSELL, D. G.: Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. In: *J Immunol* 160 (1998), Feb, Nr. 3, S. 1290–1296

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- [190] SCHAIBLE, U. E. ; WINAU, F. ; SIELING, P. A. ; FISCHER, K. ; COLLINS, H. L. ; HAGENS, K. ; MODLIN, R. L. ; BRINKMANN, V. ; KAUFMANN, S. H. E.: Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. In: *Nat Med* 9 (2003), Aug, Nr. 8, 1039–1046. <http://dx.doi.org/10.1038/nm906>. – DOI 10.1038/nm906
- [191] SCHALOSKE, R. H. ; DENNIS, E. A.: The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Nov, Nr. 11, 1246–1259. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.07.011>. – DOI 10.1016/j.bbaliip.2006.07.011
- [192] SCHMID, D. ; MÜNZ, C. : Immune surveillance of intracellular pathogens via autophagy. In: *Cell Death Differ* 12 Suppl 2 (2005), Nov, 1519–1527. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401727>. – DOI 10.1038/sj.cdd.4401727
- [193] SCHMID, D. ; MÜNZ, C. : Immune surveillance via self digestion. In: *Autophagy* 3 (2007), Nr. 2, S. 133–135
- [194] SEILHAMER, J. J. ; PRUZANSKI, W. ; VADAS, P. ; PLANT, S. ; MILLER, J. A. ; KLOSS, J. ; JOHNSON, L. K.: Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. In: *J Biol Chem* 264 (1989), Apr, Nr. 10, S. 5335–5338
- [195] SHAMSHIEV, A. ; DONDA, A. ; CARENA, I. ; MORI, L. ; KAPPOS, L. ; LIBERO, G. D.: Self glycolipids as T-cell autoantigens. In: *Eur J Immunol* 29 (1999), May, Nr. 5, S. 1667–1675
- [196] SHAMSHIEV, A. ; GOBER, H.-J. ; DONDA, A. ; MAZORRA, Z. ; MORI, L. ; LIBERO, G. D.: Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. In: *J Exp Med* 195 (2002), Apr, Nr. 8, S. 1013–1021
- [197] SHAYMAN, J. A. ; ABE, A. ; HIRAOKA, M. : A turn in the road: How studies on the pharmacology of glucosylceramide synthase inhibitors led to the identification of a lysosomal phospholipase A2 with ceramide transacylase activity. In: *Glycoconj J* 20 (2004), Nr. 1, 25–32. <http://dx.doi.org/55>. – DOI 55
- [198] SHEN, L. ; ROCK, K. L.: Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. In: *Curr Opin Immunol* 18 (2006), Feb, Nr. 1, 85–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.003>. – DOI 10.1016/j.coi.2005.11.003
- [199] SHINOZAKI, K. ; WAITE, M. : A novel phosphatidylglycerol-selective phospholipase A2 from macrophages. In: *Biochemistry* 38 (1999), Feb, Nr. 6, 1669–1675. <http://dx.doi.org/10.1021/bi982123q>. – DOI 10.1021/bi982123q
- [200] SHORTMAN, K. ; NAIK, S. H.: Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. In: *Nat Rev Immunol* 7 (2007), Jan, Nr. 1, 19–30. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1996>. – DOI 10.1038/nri1996
- [201] SIELING, P. A. ; CHATTERJEE, D. ; PORCELLI, S. A. ; PRIGOZY, T. I. ; MAZZACCARO, R. J. ; SORIANO, T. ; BLOOM, B. R. ; BRENNER, M. B. ; KRONENBERG, M. ; BRENNAN, P. J.: CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. In: *Science* 269 (1995), Jul, Nr. 5221, S. 227–230
- [202] SINGER, A. G. ; GHOMASHCHI, F. ; CALVEZ, C. L. ; BOLLINGER, J. ; BEZZINE, S. ; ROUAULT, M. ; SADILEK, M. ; NGUYEN, E. ; LAZDUNSKI, M. ; LAMBEAU, G. ; GELB, M. H.: Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Dec, Nr. 50, 48535–48549. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M205855200>. – DOI 10.1074/jbc.M205855200
- [203] SIX, D. A. ; DENNIS, E. A.: The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. In: *Biochim Biophys Acta* 1488 (2000), Oct, Nr. 1-2, S. 1–19

- [204] SLEAT, D. E. ; LACKLAND, H. ; WANG, Y. ; SOHAR, I. ; XIAO, G. ; LI, H. ; LOBEL, P. : The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. In: *Proteomics* 5 (2005), Apr, Nr. 6, 1520–1532. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401054>. – DOI 10.1002/pmic.200401054
- [205] SLEAT, D. E. ; WANG, Y. ; SOHAR, I. ; LACKLAND, H. ; LI, Y. ; LI, H. ; ZHENG, H. ; LOBEL, P. : Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. In: *Mol Cell Proteomics* 5 (2006), Oct, Nr. 10, 1942–1956. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M600030-MCP200>. – DOI 10.1074/mcp.M600030-MCP200
- [206] SLEAT, D. E. ; ZHENG, H. ; LOBEL, P. : The human urine mannose 6-phosphate glycoproteome. In: *Biochim Biophys Acta* 1774 (2007), Mar, Nr. 3, 368–372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.12.004>. – DOI 10.1016/j.bbapap.2006.12.004
- [207] SLEAT, D. E. ; ZHENG, H. ; QIAN, M. ; LOBEL, P. : Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. In: *Mol Cell Proteomics* 5 (2006), Apr, Nr. 4, 686–701. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M500343-MCP200>. – DOI 10.1074/mcp.M500343-MCP200
- [208] SMITHA, S. ; MACHAIAH, J. P. ; NAIR, P. M.: Activation of protease activity in rat peritoneal macrophages in protein deficiency: characterization of cathepsin D. In: *Indian J Exp Biol* 34 (1996), Jul, Nr. 7, S. 641–646
- [209] SORICE, M. ; CIRCELLA, A. ; CRISTEA, I. M. ; GAROFALO, T. ; RENZO, L. D. ; ALESSANDRI, C. ; VALESINI, G. ; ESPOSTI, M. D.: Cardioliipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis. In: *Cell Death Differ* 11 (2004), Oct, Nr. 10, 1133–1145. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401457>. – DOI 10.1038/sj.cdd.4401457
- [210] SORICE, M. ; CIRCELLA, A. ; MISASI, R. ; PITTONI, V. ; GAROFALO, T. ; CIRELLI, A. ; PAVAN, A. ; PONTIERI, G. M. ; VALESINI, G. : Cardioliipin on the surface of apoptotic cells as a possible trigger for antiphospholipids antibodies. In: *Clin Exp Immunol* 122 (2000), Nov, Nr. 2, S. 277–284
- [211] SPANOS, A. ; HÜBSCHER, U. : Recovery of functional proteins in sodium dodecyl sulfate gels. In: *Methods Enzymol* 91 (1983), S. 263–277
- [212] SPRENGER, J. ; FINK, J. L. ; TEASDALE, R. D.: Evaluation and comparison of mammalian subcellular localization prediction methods. In: *BMC Bioinformatics* 7 Suppl 5 (2006), S3. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-7-S5-S3>. – DOI 10.1186/1471-2105-7-S5-S3
- [213] STAHELIN, R. V. ; CHO, W. : Roles of calcium ions in the membrane binding of C2 domains. In: *Biochem J* 359 (2001), Nov, Nr. Pt 3, S. 679–685
- [214] *Kapitel Transport of Lysosomal Enzymes*. In: STORCH S., B. T.: *Lysosomes*. Landes Bioscience: Springer Science+Business Media, New York, 2005, S. 17–26
- [215] STORRIE, B. ; DESJARDINS, M. : The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? In: *Bioessays* 18 (1996), Nov, Nr. 11, 895–903. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.950181108>. – DOI 10.1002/bies.950181108
- [216] STUART, L. M. ; EZEKOWITZ, R. A. B.: Phagocytosis: elegant complexity. In: *Immunity* 22 (2005), May, Nr. 5, 539–550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.002>. – DOI 10.1016/j.immuni.2005.05.002
- [217] STUCKEY, J. A. ; DIXON, J. E.: Crystal structure of a phospholipase D family member. In: *Nat Struct Biol* 6 (1999), Mar, Nr. 3, 278–284. <http://dx.doi.org/10.1038/6716>. – DOI 10.1038/6716

- [218] SUNG, T. C. ; ROPER, R. L. ; ZHANG, Y. ; RUDGE, S. A. ; TEMEL, R. ; HAMMOND, S. M. ; MORRIS, A. J. ; MOSS, B. ; ENGBRECHT, J. ; FROHMAN, M. A.: Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. In: *EMBO J* 16 (1997), Aug, Nr. 15, 4519–4530. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.15.4519>. – DOI 10.1093/emboj/16.15.4519
- [219] SUZUKI, T. ; SADASIVAN, R. ; SAITO-TAKI, T. ; STECHSCHULTE, D. J. ; BALENTINE, L. ; HELMKAMP, G. M.: Studies of Fc gamma receptors of human B lymphocytes: phospholipase A2 activity of Fc gamma receptors. In: *Biochemistry* 19 (1980), Dec, Nr. 26, S. 6037–6044
- [220] TATULIAN, S. A.: Toward understanding interfacial activation of secretory phospholipase A2 (PLA2): membrane surface properties and membrane-induced structural changes in the enzyme contribute synergistically to PLA2 activation. In: *Biophys J* 80 (2001), Feb, Nr. 2, S. 789–800
- [221] TATULIAN, S. A. ; BILTONEN, R. L. ; TAMM, L. K.: Structural changes in a secretory phospholipase A2 induced by membrane binding: a clue to interfacial activation? In: *J Mol Biol* 268 (1997), May, Nr. 5, 809–815. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1997.1014>. – DOI 10.1006/jmbi.1997.1014
- [222] TJELLE, T. E. ; LOVDAL, T. ; BERG, T. : Phagosome dynamics and function. In: *Bioessays* 22 (2000), Mar, Nr. 3, 255–263. <http://dx.doi.org/3.0.CO;2-R>. – DOI 3.0.CO;2-R
- [223] TRIBL, F. ; GERLACH, M. ; MARCUS, K. ; ASAN, E. ; TATSCHNER, T. ; ARZBERGER, T. ; MEYER, H. E. ; BRINGMANN, G. ; RIEDERER, P. : Subcellular proteomics of neuromelanin granules isolated from the human brain. In: *Mol Cell Proteomics* 4 (2005), Jul, Nr. 7, 945–957. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M400117-MCP200>. – DOI 10.1074/mcp.M400117-MCP200
- [224] TUPIN, E. ; KINJO, Y. ; KRONENBERG, M. : The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. In: *Nat Rev Microbiol* 5 (2007), Jun, Nr. 6, 405–417. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1657>. – DOI 10.1038/nrmicro1657
- [225] UMEBAYASHI, K. : The roles of ubiquitin and lipids in protein sorting along the endocytic pathway. In: *Cell Struct Funct* 28 (2003), Oct, Nr. 5, S. 443–453
- [226] VACCARO, A. M. ; SALVIOLI, R. ; BARCA, A. ; TATTI, M. ; CIAFFONI, F. ; MARAS, B. ; SICILIANO, R. ; ZAPPACOSTA, F. ; AMORESANO, A. ; PUCCI, P. : Structural analysis of saposin C and B. Complete localization of disulfide bridges. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Apr, Nr. 17, S. 9953–9960
- [227] VACCARO, A. M. ; TATTI, M. ; CIAFFONI, F. ; SALVIOLI, R. ; BARCA, A. ; SCERCH, C. : Effect of saposins A and C on the enzymatic hydrolysis of liposomal glucosylceramide. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Jul, Nr. 27, S. 16862–16867
- [228] VARGAS-VILLARREAL, J. ; MARTIN-POLO, J. J. ; REYNAUD, E. ; ALAGON, A. C.: A new affinity adsorbent for the purification of phospholipases A1 and A2 from animal venoms. In: *Toxicon* 29 (1991), Nr. 1, S. 119–124
- [229] VARGAS-VILLARREAL, J. ; OLVERA-RODRÍGUEZ, A. ; MATA-CÁRDENAS, B. D. ; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. G. ; SAID-FERNÁNDEZ, S. ; ALAGÓN-CANO, A. : Isolation of an *Entamoeba histolytica* intracellular alkaline phospholipase A2. In: *Parasitol Res* 84 (1998), Nr. 4, S. 310–314
- [230] VERGER, R. ; HAAS G. H. de: Enzyme reactions in a membrane model. 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. In: *Chem Phys Lipids* 10 (1973), Feb, Nr. 2, S. 127–136
- [231] VIEIRA, O. V. ; BOTELHO, R. J. ; GRINSTEIN, S. : Phagosome maturation: aging gracefully. In: *Biochem J* 366 (2002), Sep, Nr. Pt 3, 689–704. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20020691>. – DOI 10.1042/BJ20020691
- [232] WAITE, M. : The PLD superfamily: insights into catalysis. In: *Biochim Biophys Acta* 1439 (1999), Jul, Nr. 2, S. 187–197

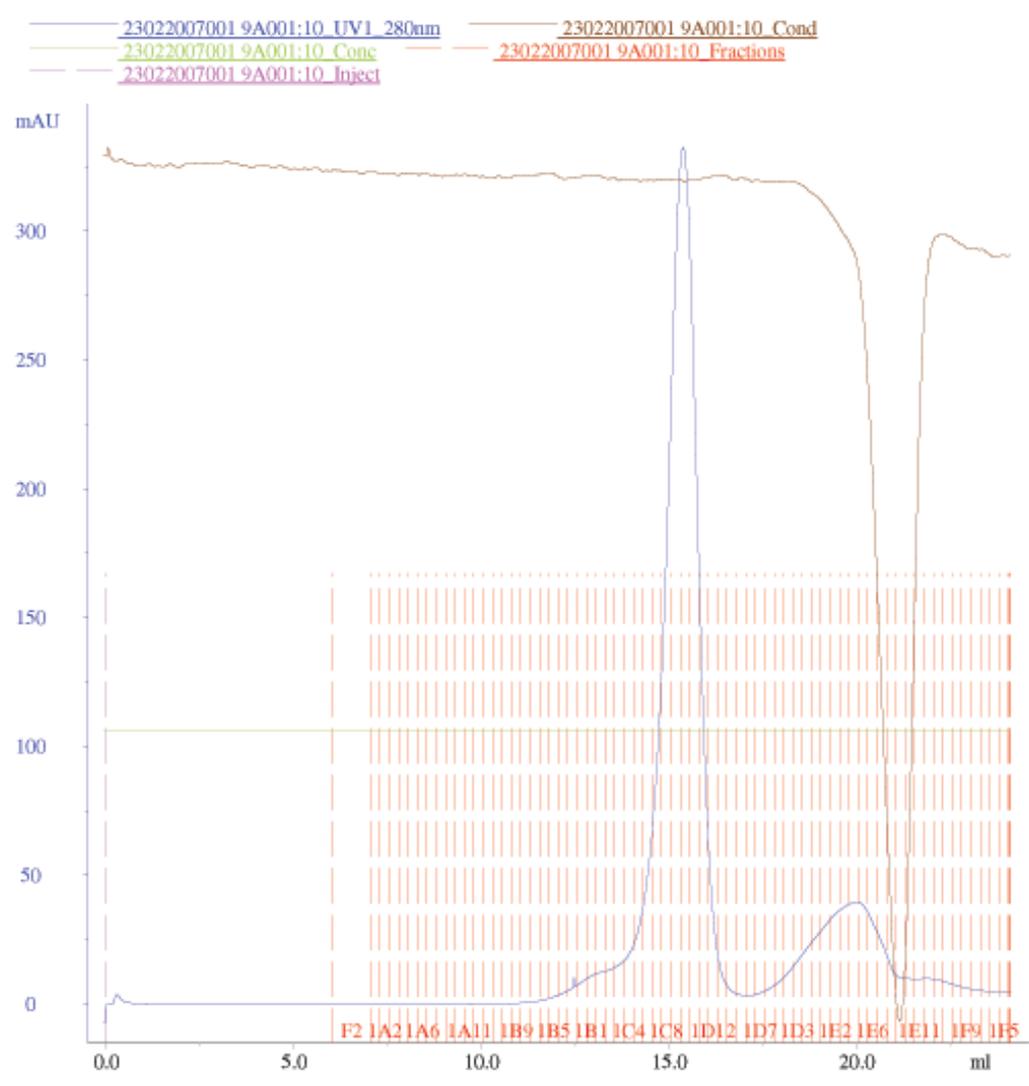
- [233] WAITE, M. ; KING, L. ; THORNBURG, T. ; OSTHOFF, G. ; THUREN, T. Y.: Metabolism of phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycero)-phosphate in macrophage subcellular fractions. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Dec, Nr. 35, S. 21720–21726
- [234] WEBB, N. R.: Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. In: *Curr Opin Lipidol* 16 (2005), Jun, Nr. 3, S. 341–344
- [235] WEHBI, H. ; FENG, J. ; KOLBECK, J. ; ANANTHANARAYANAN, B. ; CHO, W. ; ROBERTS, M. F.: Investigating the interfacial binding of bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C. In: *Biochemistry* 42 (2003), Aug, Nr. 31, 9374–9382. <http://dx.doi.org/10.1021/bi034195+> – DOI 10.1021/bi034195+
- [236] WELLMER, F. ; KIRCHER, S. ; RÜGNER, A. ; FROHNMEYER, H. ; SCHÄFER, E. ; HARTER, K. : Phosphorylation of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by light. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Oct, Nr. 41, S. 29476–29482
- [237] WIJEWICKRAMA, G. T. ; KIM, J.-H. ; KIM, Y. J. ; ABRAHAM, A. ; OH, Y. ; ANANTHANARAYANAN, B. ; KWATIA, M. ; ACKERMAN, S. J. ; CHO, W. : Systematic evaluation of transcellular activities of secretory phospholipases A2. High activity of group V phospholipases A2 to induce eicosanoid biosynthesis in neighboring inflammatory cells. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Apr, Nr. 16, 10935–10944. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512657200>. – DOI 10.1074/jbc.M512657200
- [238] WILKENING, G. ; LINKE, T. ; SANDHOFF, K. : Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nov, Nr. 46, S. 30271–30278
- [239] WILKENING, G. ; LINKE, T. ; UHLHORN-DIERKS, G. ; SANDHOFF, K. : Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nov, Nr. 46, 35814–35819. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M006568200>. – DOI 10.1074/jbc.M006568200
- [240] WINAU, F. ; KAUFMANN, S. H. E. ; SCHAIBLE, U. E.: Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. In: *Cell Microbiol* 6 (2004), Jul, Nr. 7, 599–607. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00408.x>. – DOI 10.1111/j.1462-5822.2004.00408.x
- [241] WINAU, F. ; WEBER, S. ; SAD, S. ; DIEGO, J. de ; HOOPS, S. L. ; BREIDEN, B. ; SANDHOFF, K. ; BRINKMANN, V. ; KAUFMANN, S. H. E. ; SCHAIBLE, U. E.: Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. In: *Immunity* 24 (2006), Jan, Nr. 1, 105–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.001>. – DOI 10.1016/j.immuni.2005.12.001
- [242] WINGET, J. M. ; PAN, Y. H. ; BAHNSON, B. J.: The interfacial binding surface of phospholipase A2s. In: *Biochim Biophys Acta* 1761 (2006), Nov, Nr. 11, 1260–1269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.08.002>. – DOI 10.1016/j.bbalip.2006.08.002
- [243] W.M., B. ; D.W., D. : *The World of the Cell*. Second Edition. Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City CA, 1991
- [244] WOOTON-KEE, C. R. ; BOYANOVSKY, B. B. ; NASSER, M. S. ; VILLIERS, W. J. S. ; WEBB, N. R.: Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Apr, Nr. 4, 762–767. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000122363.02961.c1>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000122363.02961.c1
- [245] WU, Y. ; TIBREWAL, N. ; BIRGE, R. B.: Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. In: *Trends Cell Biol* 16 (2006), Apr, Nr. 4, 189–197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2006.02.003>. – DOI 10.1016/j.tcb.2006.02.003

- [246] WUJEK, P. ; KIDA, E. ; WALUS, M. ; WISNIEWSKI, K. E. ; GOLABEK, A. A.: N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Mar, Nr. 13, 12827–12839. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M313173200>. – DOI 10.1074/jbc.M313173200
- [247] XIE, Z. ; HO, W. T. ; EXTON, J. H.: Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Aug, Nr. 32, 24962–24969. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M909745199>. – DOI 10.1074/jbc.M909745199
- [248] YOKOUCHI ; TSUNODA ; IMURA ; YAMAUCHI ; YOKOYAMA ; SAKAI ; ABE: Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposomal membrane characteristics. In: *Colloids Surf B Biointerfaces* 20 (2001), Feb, Nr. 2, S. 95–103
- [249] YU, B. Z. ; BERG, O. G. ; JAIN, M. K.: Hydrolysis of monodisperse phosphatidylcholines by phospholipase A2 occurs on vessel walls and air bubbles. In: *Biochemistry* 38 (1999), Aug, Nr. 32, 10449–10456. <http://dx.doi.org/10.1021/bi990194z>. – DOI 10.1021/bi990194z
- [250] ZAJONC, D. M. ; ELSLIGER, M. A. ; TEYTON, L. ; WILSON, I. A.: Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. In: *Nat Immunol* 4 (2003), Aug, Nr. 8, 808–815. <http://dx.doi.org/10.1038/ni948>. – DOI 10.1038/ni948
- [251] ZHOU, D. ; MATTNER, J. ; CANTU, C. ; SCHRANTZ, N. ; YIN, N. ; GAO, Y. ; SAGIV, Y. ; HUDSPETH, K. ; WU, Y.-P. ; YAMASHITA, T. ; TENEBERG, S. ; WANG, D. ; PROIA, R. L. ; LEVERY, S. B. ; SAVAGE, P. B. ; TEYTON, L. ; BENDELAC, A. : Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. In: *Science* 306 (2004), Dec, Nr. 5702, 1786–1789. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1103440>. – DOI 10.1126/science.1103440

# Anhang

Im Folgenden sind das Chromatogramm der Gelfiltration und die Listen aller signifikanten Treffer der Massenanalysen von den Proben aus Affinitätsreinigung und Gelfiltration einzusehen.

# Chromatogram



#### Mascot Search Results der Proben aus der Affinitätsreinigung

Im folgenden werden die Protein gelistet, welche bei der MASCOT-Suche in NCBI in den Proben gefunden wurden. Die Treffer sind nach Signifikanz sortiert, wobei die Protein mit dem höchsten Wert (Score) oben stehen. Als untere Grenze wurde ein Score von 50 angelegt, was ein Wahrscheinlichkeits-Wert (Signifikanz) von  $p=0,05$  bedeutet. Die Treffer von PLD4 und LOC71772 sind fett unterlegt und die entsprechenden Werte für diese Proteine aufgeführt.

#### **Mascot Search Results for Sample A1**

**Database** : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

#### **Significant hits:**

- gi|72333 concanavalin A - jack bean
- gi|17318569 keratin 1 [Homo sapiens]
- gi|547754 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e) (CK 2e)
- gi|57012354 type II keratin Kb1 [Rattus norvegicus]
- gi|55956899 keratin 9 [Homo sapiens]
- gi|6678643 keratin complex 2, basic, gene 1 [Mus musculus]
- gi|28317 unnamed protein product [Homo sapiens]
- gi|76617876 PREDICTED: similar to keratin 1 isoform 2 [Bos taurus]
- gi|114644550 PREDICTED: keratin 1B isoform 2 [Pan troglodytes]
- gi|557967 prosaposin [Mus sp.]
- gi|27805977 keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis) [Bos taurus]
- gi|348482 lectin - Dioclea lehmannii
- gi|13111394 larval keratin XLK [Xenopus laevis]
- gi|85701680 keratin 76 [Mus musculus]
- gi|6016492 Lectin alpha chain [Contains: Lectin beta chain; Lectin gamma-1 chain; Lectin gamma-2 chain]
- gi|309202 mouse preprocathepsin B
- gi|26337387 unnamed protein product [Mus musculus] – PLD4, Mass: 53356 Score: 92 Peptides matched: 8**
- gi|136429 Trypsin precursor
- gi|61870938 PREDICTED: similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A (Cytokeratin 6A) (K6a keratin) isoform 1 [Bos taurus]
- gi|11066226 cathepsin Z [Mus musculus]
- gi|14017762 larva-specific keratin RLK [Rana catesbeiana]
- gi|47212110 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
- gi|52789 unnamed protein product [Mus musculus]
- gi|28173564 keratin 6 ins3 [Homo sapiens]
- gi|39934415 hypothetical protein RPA1341 [Rhodospseudomonas palustris CGA009]
- gi|88951297 Peptidase S16, archaical lon protein-like [Methanosaeta thermophila PT]
- gi|28556880 TGFbeta-receptor 1 homologue [Ciona intestinalis]
- gi|386850 keratin K5
- gi|53717708 putative transmembrane regulator [Burkholderia pseudomallei K96243]

#### **Mascot Search Results for Sample A3**

**Database** : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

#### **Significant hits:**

- gi|309202 mouse preprocathepsin B
- gi|30725764 phospholipase D family, member 4 [Mus musculus], Mass: 56118 Score: 393 Peptides matched: 9**
- gi|203648 cathepsin (EC 3.4.22.1)
- gi|72333 concanavalin A - jack bean
- gi|11066226 cathepsin Z [Mus musculus]
- gi|224360 concanavalin A
- gi|148071 thioredoxin [Escherichia coli]
- gi|136429 Trypsin precursor
- gi|28317 unnamed protein product [Homo sapiens]
- gi|6016492 Lectin alpha chain [Contains: Lectin beta chain; Lectin gamma-1 chain; Lectin gamma-2 chain]
- gi|84393642 thioredoxin [Vibrio splendidus I2B01]
- gi|386854 type II keratin subunit protein
- gi|6753520 cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 [Mus musculus]
- gi|348482 lectin - Dioclea lehmannii
- gi|26340204 unnamed protein product [Mus musculus]
- gi|27805977 keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis) [Bos taurus]
- gi|46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)
- gi|34073 cytokeratin 4 (408 AA) [Homo sapiens]
- gi|1217587 neurotoxin [Clostridium botulinum C]
- gi|23943820 paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha [Mus musculus]
- gi|6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]

#### **Mascot Search Results for Sample B1**

**Database** : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

#### **Significant hits:**

- gi|28317 unnamed protein product [Homo sapiens]
- gi|1346343 Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cytokeratin) (Hair)
- gi|61740600 keratin 10 [Canis familiaris]
- gi|547754 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e) (CK 2e)
- gi|309202 mouse preprocathepsin B
- gi|1421224 Chain , Concanavalin A
- gi|443370 Chain A, Concanavalin A (Native)
- gi|57012354 type II keratin Kb1 [Rattus norvegicus]

gi|27805977 keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis) [Bos taurus]  
 gi|76617876 PREDICTED: similar to keratin 1 isoform 2 [Bos taurus]  
 gi|6678643 keratin complex 2, basic, gene 1 [Mus musculus]  
 gi|114667176 PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) [  
 gi|114644554 PREDICTED: keratin 6L [Pan troglodytes]  
 gi|114667194 PREDICTED: hypothetical protein [Pan troglodytes]  
 gi|136429 Trypsin precursor  
 gi|908805 keratin type II  
 gi|6016492 Lectin alpha chain [Contains: Lectin beta chain; Lectin gamma-1 chain; Lectin gamma-2 chain]  
 gi|348482 lectin - Dioclea lehmannii  
 gi|26337387 unnamed protein product [Mus musculus] = PLD4, Mass: 53356 Score: 144 Peptides matched: 7  
 gi|58531035 alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]  
 gi|266418 Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (CSF-1-R) (Fms proto-oncogene) (c-fms) (C  
 gi|53674 CD44 [Mus musculus]  
 gi|557967 prosaposin [Mus sp.]  
 gi|61870938 PREDICTED: similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A (Cytokeratin 6A) (CK 6A) (K6a keratin) isofo  
 gi|73965817 PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 16 (Cytokeratin 16) (K16) (CK 16) [Canis familiaris]  
 gi|4557890 keratin 5 [Homo sapiens]  
 gi|61813798 PREDICTED: similar to keratin 15 [Bos taurus]  
 gi|110600667 ferrous iron transport protein B-Small GTP-binding protein domain [Geobacter sp. FRC-32]  
 gi|17546300 phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit [Ralstonia solanacearum GM11000]  
 gi|50852 Epithelin 1 & 2 [Mus musculus]  
 gi|3334320 40S ribosomal protein SA (p40)  
 gi|78484358 DNA gyrase, B subunit [Thiomicrospira crumogena XCL-2]  
 gi|6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]  
 gi|6093455 interferon-induced GTP-binding protein Mx  
 gi|66965360 extracellular solute-binding protein, family 5 [Arthrobacter sp. FB24]  
 gi|24213303 Met(adenosyl) methyltransferase-like protein [Leptospira interrogans serovar Lai str. 56601]

#### Mascot Search Results for Sample B3

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

##### Significant hit:

gi|17318569 keratin 1 [Homo sapiens]  
 gi|266418 Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (CSF-1-R) (Fms proto-oncogene) (c-fms) (C  
 gi|547754 Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (K2e) (CK 2e)  
 gi|28317 unnamed protein product [Homo sapiens]  
 gi|57012354 type II keratin Kb1 [Rattus norvegicus]  
 gi|114667176 PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) [  
 gi|6678643 keratin complex 2, basic, gene 1 [Mus musculus]  
 gi|81175178 Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9) (K9)  
 gi|61740600 keratin 10 [Canis familiaris]  
 gi|30725764 phospholipase D family, member 4 [Mus musculus], Mass: 56118 Score: 242 Peptides matched: 11  
 gi|76617876 PREDICTED: similar to keratin 1 isoform 2 [Bos taurus]  
 gi|309202 mouse preprocathepsin B  
 gi|27805977 keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis) [Bos taurus]  
 gi|490 kinninogen II precursor [Bos taurus]  
 gi|908805 keratin type II  
 gi|309215 EndoA' cytokeratin (5' end put.); putative  
 gi|72333 concanavalin A - jack bean  
 gi|71051822 Unknown (protein for MGC:116262) [Rattus norvegicus]  
 gi|136429 Trypsin precursor  
 gi|4557890 keratin 5 [Homo sapiens]  
 gi|85701680 keratin 76 [Mus musculus]  
 gi|53674 CD44 [Mus musculus]  
 gi|52693 interleukin 6 receptor [Mus musculus]  
 gi|46275808 keratin complex 2, basic, gene 17 [Mus musculus]  
 gi|47212110 unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]  
 gi|28557150 hornetin [Homo sapiens]  
 gi|14017762 larva-specific keratin RLK [Rana catesbeiana]  
 gi|2190257 BIT [Mus musculus]  
 gi|50748774 PREDICTED: similar to expressed sequence A1132321 [Gallus gallus]  
 gi|42525183 putative methylmalonyl-CoA decarboxylase, gamma-subunit [Bdellovibrio bacteriovorus HD100]  
 gi|103485627 cytochrome c, class I [Sphingopyxis alaskensis RB2256]  
 gi|57106334 PREDICTED: similar to Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18) isoform 1 [Canis familiaris]  
 gi|109468755 PREDICTED: similar to sarcoma antigen NY-SAR-41 [Rattus norvegicus]  
 gi|348482 lectin - Dioclea lehmannii  
 gi|28173564 keratin 6 ir3 [Homo sapiens]  
 gi|121697 Glutathione S-transferase 26 kDa (GST 26) (SF26 antigen) (GST class-mu)  
 gi|15612201 POLYRIBONUCLEOTIDE NUCLEOTIDYLTRANSFERASE [Helicobacter pylori J99]  
 gi|88703974 polysaccharide chain length determinant protein [gamma proteobacterium KT 71]

#### Mascot Search Results for Sample B4

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

##### Significant hit:

gi|30725764 phospholipase D family, member 4 [Mus musculus], Mass: 56118 Score: 378 Peptides matched: 14  
 gi|266418 Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (CSF-1-R) (Fms proto-oncogene) (c-fms) (C

gi|443370 Chain A, Concanavalin A (Native)  
 gi|72333 concanavalin A - jack bean  
 gi|309202 mouse preprocathepsin B  
 gi|136429 Trypsin precursor  
 gi|53674 CD44 [Mus musculus]  
 gi|348482 lectin - Dioclea lehmannii  
 gi|27476057 discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 [Mus musculus]  
 gi|11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
 gi|1217587 neurotoxin [Clostridium botulinum C]  
 gi|50748774 PREDICTED: similar to expressed sequence A1132321 [Gallus gallus]  
 gi|6016492 Lectin alpha chain [Contains: Lectin beta chain; Lectin gamma-1 chain; Lectin gamma-2 chain]  
 gi|58531035 alpha-1-acid glycoprotein precursor [Bos taurus]  
 gi|17546300 phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit [Ralstonia solanacearum GM11000]  
 gi|6730358 Chain A, Role Of Amino Acid Residues At Turns In The Conformational Stability And Folding Of Human  
 gi|6755144 lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein [Mus musculus]  
 gi|267194 Tyrosine-protein kinase receptor UFO precursor (Adhesion-related kinase)

#### Mascot Search Results der Gefiltrationsproben

##### Mascot Search Results for Sample GF2

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

##### Significant hits:

gi|67460414 Di-N-acetylchitinase precursor  
 gi|30725764 phospholipase D family, member 4 [Mus musculus]= PLD4, Mass: 56118 Score: 700 Peptides matched: 20  
 gi|26339346 unnamed protein product [Mus musculus]  
 gi|26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
 gi|114431242 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a [Mus musculus]  
 gi|266418 Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor precursor (CSF-1-R) (Fms proto-oncogene) (c-fms) (C  
 gi|11935047 mutant heparan N-sulfatase [Mus musculus]  
 gi|309202 mouse preprocathepsin B  
 gi|53850608 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3A [Rattus norvegicus]  
 gi|67967989 unnamed protein product [Macaca fascicularis]  
 gi|13626390 Dipetidyl-peptidase 2 precursor (Dipetidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipetidyl aminopeptidase II)  
 gi|74140818 unnamed protein product [Mus musculus]  
 gi|136429 Trypsin precursor  
 gi|1373055 sialic-acid O-acetyltransferase  
 gi|109072825 PREDICTED: similar to acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3A [Macaca mulatta]  
 gi|4506919 N-sulfoglucosaminase sulfhydrolase (sulfamidase) [Homo sapiens]  
 gi|24307911 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3A [Homo sapiens]  
 gi|11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
 gi|50751384 PREDICTED: similar to Di-N-acetylchitinase precursor [Gallus gallus]  
 gi|1346343 Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cyokeratin) (Hair  
 gi|62946671 muscle endopin 1b [Bos taurus]  
 gi|34536585 unnamed protein product [Mus musculus]  
 gi|78042544 galactosidase, beta 1 [Bos taurus]  
 gi|71361659 colony stimulating factor 1 receptor [Rattus norvegicus]  
 gi|31340900 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3  
 gi|5817713 maturase-like protein [Onchosis formosana]  
 gi|88937540 N-acetylglucosaminyltransferase, MurG [Geobacter uraniumreducens R64]  
 gi|126381 Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor (LAMP-2) (Lysosomal membrane glycoprotein typ  
 gi|67941575 hypothetical protein Cpham1 DRAFT\_0496 [Chlorobium phaeobacteroides BS1]  
 gi|67928575 Twin-arginine translocation pathway signal [Solibacter usitatus Ellin6076]  
 gi|73960123 PREDICTED: similar to Di-N-acetylchitinase precursor [Canis familiaris]  
 gi|6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]  
 gi|46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)  
 gi|28872526 hypothetical protein PSPTO\_5418 [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]  
 gi|1217587 neurotoxin [Clostridium botulinum C]  
 gi|75228427 COG3451: Type IV secretory pathway, VirB4 components [Escherichia coli B7A]  
 gi|82595289 hypothetical protein PY00623 [Plasmodium yoelii yoelii str. 17XNL]  
 gi|110621926 methyl-coenzyme M reductase, alpha subunit [uncultured methanogenic archaeon]  
 gi|70953525 Plasmodium chabaudi chabaudi translation initiation factor-like protein [Plasmodium chabaudi]  
 gi|15896888 Heavy-metal transporting P-type ATPase [Clostridium acetobutylicum ATCC 824]  
 gi|66812346 hypothetical protein DDBDRAFT\_0205132 [Dictyostelium discoideum AX4]  
 gi|108871679 conserved hypothetical protein [Aedes aegypti]  
 gi|111057838 predicted protein [Phaeosphaeria nodorum SN15]  
 gi|115491209 conserved hypothetical protein [Aspergillus terreus NIH2624]  
 gi|114567942 (Fe) hydrogenase, large subunit HymC, putative [Syntrophomonas wolfei subsp. wolfei str. Goettingen]  
 gi|78485410 Amino acid permease-associated region [Thiomicrospira crunogona XCL-2]  
 gi|42521858 two-component response regulator [Bdellovibrio bacteriovorus HD100]  
 gi|15233846 ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase [Arabidopsis thaliana]  
 gi|17229597 acyl carrier protein phosphodiesterase [Nostoc sp. PCC 7120]  
 gi|23508700 rifin [Plasmodium falciparum 3D7]  
 gi|20976858 LD12605p [Drosophila melanogaster]

**Mascot Search Results for Sample GF3**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

**Significant hits:**

gi67460414 Di-N-acetylchitinase precursor  
gi26337387 **unnamed protein product [Mus musculus] = PLD4, Mass: 53356 Score: 627 Peptides matched: 13**  
gi3831564 gamma-glutamyl hydrolase precursor [Mus musculus]  
gi2982192 activated leukocyte cell adhesion molecule CD166 [Mus musculus]  
gi13626390 Dipeptidyl-peptidase 2 precursor (Dipeptidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipeptidyl aminopeptidase II)  
gi67967989 unnamed protein product [Macaca fascicularis]  
gi13938040 Sialic acid acetyltransferase [Mus musculus]  
gi11935047 mutant heparan N-sulfatase [Mus musculus]  
gi114431242 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a [Mus musculus]  
gi62946671 muscle endopin 1b [Bos taurus]  
gi7305089 galactosidase, alpha [Mus musculus]  
gi136429 Trypsin precursor  
gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi74140818 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi27806941 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1 [Mus musculus]  
gi31340900 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 3 [Mus musculus]  
gi50751384 PREDICTED: similar to Di-N-acetylchitinase precursor [Gallus gallus]  
gi33438162 mKLA0315 protein [Mus musculus]  
gi1703420 Arylsulfatase A precursor (ASA) (Cerebroside-sulfatase)  
gi53850608 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3A [Rattus norvegicus]  
gi4506919 N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase) [Homo sapiens]  
gi349714 iduronate sulfatase  
gi73960123 PREDICTED: similar to Di-N-acetylchitinase precursor [Canis familiaris]  
gi6688788 putative transmembrane glycoprotein [Mus musculus]  
gi109086527 PREDICTED: similar to gamma-glutamyl hydrolase precursor [Macaca mulatta]  
gi6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]  
gi34536585 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi386854 type II keratin subunit protein  
gi192185 acid beta-galactosidase  
gi3201902 truncated palmitoyl-protein thioesterase [Rattus norvegicus]  
gi227293 cathepsin B  
gi111057838 predicted protein [Phaeosphaeria nodorum SN15]  
gi32474411 hypothetical protein RB6696 [Rhodospirillum rubrum SH 1]  
gi45185214 ABL016Cp [Eremothecium gossypii]  
gi50418399 MGC84506 protein [Xenopus laevis]  
gi55700907 TPA: class III peroxidase 20 precursor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
gi57911419 ENSANGP00000029395 [Anopheles gambiae str. PEST]  
gi82499177 von Willebrand factor, type A: Bacterial Ig-like, group 2: Parallel beta-helix repeat [Caldicellulosigranulatus DSM 8903]  
gi89303319 cation channel family protein [Tetrahymena thermophila SB210]  
gi90020932 Beta-galactosidase/beta-glucuronidase-like [Saccharophagus degradans 2-40]  
gi86132585 putative aspartate aminotransferase [Cellulophaga sp. MED134]  
gi50748774 PREDICTED: similar to expressed sequence A1132321 [Gallus gallus]  
gi28872526 hypothetical protein PSPTO\_5418 [Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000]  
gi39583883 Hypothetical protein CBG08563 [Caenorhabditis briggsae]  
gi115628019 PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]  
gi2280476 KIAA0315 [Homo sapiens]  
gi2459517 RecA [Bifidobacterium infantis]

**Mascot Search Results for Sample GF4**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

**Significant hits:**

gi309202 mouse preprocathepsin B  
gi3831564 gamma-glutamyl hydrolase precursor [Mus musculus]  
gi67460414 Di-N-acetylchitinase precursor  
gi13938040 Sialic acid acetyltransferase [Mus musculus]  
gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi26337387 **unnamed protein product [Mus musculus] = PLD4, Mass: 53356 Score: 293 Peptides matched: 8**  
gi7305089 galactosidase, alpha [Mus musculus]  
gi136429 Trypsin precursor  
gi67967989 unnamed protein product [Macaca fascicularis]  
gi11935047 mutant heparan N-sulfatase [Mus musculus]  
gi11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
gi9506985 palmitoyl-protein thioesterase 2 [Mus musculus]  
gi114431242 acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a [Mus musculus]  
gi2982192 activated leukocyte cell adhesion molecule CD166 [Mus musculus]  
gi12004583 unknown [Mus musculus]  
gi50751384 PREDICTED: similar to Di-N-acetylchitinase precursor [Gallus gallus]  
gi73993760 PREDICTED: similar to cathepsin B preproprotein [Canis familiaris]  
gi4506919 N-sulfoglucosamine sulfohydrolase (sulfamidase) [Homo sapiens]  
gi109086527 PREDICTED: similar to gamma-glutamyl hydrolase precursor [Macaca mulatta]  
gi13626390 Dipeptidyl-peptidase 2 precursor (Dipeptidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipeptidyl aminopeptidase II)  
gi6688788 putative transmembrane glycoprotein [Mus musculus]  
gi6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]

gi46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)  
gi18157545 GP [iris yellow spot virus]  
gi12620106 biotin synthase [uncultured bacterium pCosHE1]

**Mascot Search Results for Sample GF5**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

Significant hits:

gi309202 mouse proprocathepsin B  
gi11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
gi13938040 Sialic acid acetyltransferase [Mus musculus]  
gi136429 Trypsin precursor  
gi11935047 mutant heparin N-sulfatase [Mus musculus]  
gi6981420 pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]  
gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)  
gi26337387 unnamed protein product [Mus musculus] = PLD4, Mass: 53356 Score: 54 Peptides matched: 2  
gi88812129 V-type ATP synthase subunit A [Nitrococcus mobilis Nb-231]

**Mascot Search Results for Sample GF6**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

Significant hits:

gi11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
gi13938040 Sialic acid acetyltransferase [Mus musculus]  
gi6753520 cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 [Mus musculus]  
gi72333 concanavalin A - jack bean  
gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi227293 cathepsin B  
gi13626390 Dipetidyl-peptidase 2 precursor (Dipeptidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipeptidyl aminopeptidase II)  
gi26337387 unnamed protein product [Mus musculus] = PLD4, Mass: 53356 Score: 76 Peptides matched: 1  
gi46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)  
gi73954581 PREDICTED: similar to cytosolic sialic acid 9-O-acetyltransferase homolog isoform 1 [Canis familiaris]  
gi31560090 hypothetical protein LOC71772 [Mus musculus], Mass: 66247 Score: 43 Peptides matched: 2

**Mascot Search Results for Sample GF7**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

Significant hits:

gi54292135 aspartylglucosaminidase [Mus musculus]  
gi11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
gi227293 cathepsin B  
gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi13938040 Sialic acid acetyltransferase [Mus musculus]  
gi136429 Trypsin precursor  
gi13626390 Dipetidyl-peptidase 2 precursor (Dipeptidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipeptidyl aminopeptidase II)  
gi46395620 Vignain precursor (Cysteine endopeptidase)  
gi112804 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc)  
gi13278361 Glb1 protein [Mus musculus]  
gi33598778 putative LysR-family transcriptional regulator [Bordetella parapertussis 12822]

**Mascot Search Results for Sample GF8**

Database : NCBI nr 011106 (4076784 sequences; 1405124249 residues)

Significant hits:

gi26343951 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi13626390 Dipetidyl-peptidase 2 precursor (Dipeptidyl-peptidase II) (DPP II) (Dipeptidyl aminopeptidase II)  
gi557967 prosaposin [Mus sp.]  
gi18490940 C1bs protein [Mus musculus]  
gi12860234 unnamed protein product [Mus musculus]  
gi11066226 cathepsin Z [Mus musculus]  
gi53717708 putative transmembrane regulator [Burkholderia pseudomallei K96243]  
gi87307997 ribonuclease R [Blastopirellula marina DSM 3645]  
gi85704512 hypothetical protein ROS217\_05519 [Roseovarius sp. 217]  
gi66043331 Protein of unknown function DUF513 [Pseudomonas syringae pv. syringae B728a]

# Publikationen

- KREUZEDER, J., KAUFMANN S.H.E., SCHAIBLE, U.E. Membrane Composition Determines macrophage lysosomal phospholipase A1 activity . In preparation.
- KREUZEDER, J., KRAUSE, E. , STEPHANOWITZ, H., KAUFMANN S.H.E., SCHAIBLE, U.E. Identification of lysosomal PLA<sub>1</sub> associated with macrophages. In preparation.
- MATTOW, J., SIEJAK, F, HAGENS, K., KREUZEDER, J., KAUFMANN, S.H.E., SCHAIBLE, U.E. (2007): Gel-based Proteomics of Mycobacteria. In: Parish, T., Brown, A. (eds.): Mycobacteria Protocols (2nd edition). Humana Press, Totowa, NJ, in press.

## Posterpräsentationen

- 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Immunology, September 2003
- The 3<sup>rd</sup> International Workshop on NKT Cells and CD1 Antigen Presentation, September 2004

# Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der erwähnten Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Berlin, den 25. September 2007



# Danksagung

Folgende Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und ich möchte mich bei ihnen ganz herzlich für die Unterstützung bedanken:

- Herrn **Prof. Dr. Ulrich Schaible** (London School of Hygiene & Tropical Medicine) für die engagierte Betreuung und Unterstützung.
- Herrn **Prof. Dr. Stefan Kaufmann** (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie) für die Möglichkeit, diese Arbeit in einem exzellenten wissenschaftlichen Umfeld anfertigen zu können.
- Herrn **Ralf Winter** für die Unterstützung bei HPTLC und Gelfiltration und Herrn **Frank Sijak** für das Anfertigen von 2D-Gelen – auch wenn diese keinen Eingang in die vorliegende Arbeit gefunden haben.
- Herrn **Dr. Eberhard Krause** und Frau **Heike Stephanowitz** (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) für die sehr zeitnahen und sorgfältigen massenspektrometrischen Analysen unserer Proben.
- Frau **Kristine Hagens** für die immer gute Zusammenarbeit im Labor und die vielen praktischen Tipps.
- Allen **Doktoranden** für die kollegiale, hilfsbereite und freundliche Atmosphäre in Büro und Labor.
- Herrn **Prof. Dr. Thomas Pomorski** (Humboldt Universität zu Berlin) für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen, die konstruktiven Gespräche und die wertvollen Ratschläge zur Arbeit mit Liposomen.
- Herrn **Prof. Dr. Peter-M. Kloetzel** (Humboldt-Universität zu Berlin) für die exzellente Organisation des SFBs 421 und dafür, dass er die finanzielle Unterstützung dieses Teilprojektes bis zum Schluss ermöglicht hat.
- Herrn **Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker** (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit.
- Meinen **Eltern** für ihre liebevolle Unterstützung, ihr Vertrauen und den Rückhalt, den sie mir stets geben. Sie haben das Fundament meines Lebensweges begründet, ohne welches diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner Schwester **Johanna** dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hat und meinem Partner **Thorsten Ruchotzki** dafür, dass er mir privat stets als „ruhender Pol“ zur Seite steht.