

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Zur spezifischen Interaktion von Sphingolipiden mit Membranproteinen

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Per Haberkant
aus Heidelberg

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Zur spezifischen Interaktion von Sphingolipiden mit Membranproteinen

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Per Haberkant
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

**Zur spezifischen Interaktion
von Sphingolipiden mit Membranproteinen**

Gutachter: Prof. Dr. F. T. Wieland

Gutachter: Prof. Dr. W. Nickel

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Biologische Membranen	3
2.2	Biosynthese der Sphingolipide	4
2.3	Mikrodomänen	7
2.4	Transportmechanismen in eukaryontischen Zellen	9
2.4.1	COPI-Vesikel	11
2.4.2	COPII-Vesikel	12
2.4.3	Clathrin-Vesikel	13
2.5	Die p24-Familie	14
2.6	Lipidsortierung	15
3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
4	ERGEBNISSE	18
4.1	Isolierung von <i>Detergent Resistant Membranes</i> (DRM) aus Golgi Membranen: p24-Proteine sind nicht DRM-assoziierte Proteine	18
4.2	Synthese photoaktivierbarer Lipidvorstufen	20
4.2.1	Synthese von 10-ASA	22
4.2.2	Synthese von [³ H]-photoChol	23
4.2.3	Synthese von D- <i>erythro</i> -photoSph und [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph	25
4.2.3.1	Synthese von D- <i>erythro</i> -photoSph	25

4.2.3.2	Synthese von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph	27
4.3	Markierungen von Zellen mit D-<i>erythro</i>-photoSph	28
4.4	Charakterisierung von [³H]-D-<i>erythro</i>-photoSph als Lipidvorläufer für photoaktivierbare Sphingolipide	30
4.4.1	Aufnahme von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph	31
4.4.2	Metabolisierung von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph im Vergleich zu [³ H]-D- <i>erythro</i> -Sphingosin	31
4.4.3	Massenspektrometrische Analyse von photoaktivierbarem Sphingomyelin	33
4.4.4	Sphingomyelinase Verdau von photoaktivierbarem Sphingomyelin	34
4.4.5	Analyse des Einbaus von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph in unterschiedliche Sphingolipide	35
4.5	Nachweis von photoaktivierbaren Sphingolipiden in DRM	39
4.6	Vergleich des Einbaus einzelnen Lipidvorläufer	42
4.7	<i>in vivo</i> Interaktionen von Lipiden mit Proteinen	44
4.7.1	Photochemische Markierung von CERT mit [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph	44
4.7.2	Cytosolisches PI-TPβ interagiert <i>in vivo</i> mit einem Sphingolipid	46
4.7.3	Die hohe Affinität von Caveolin-1 zu Cholesterin und Sphingolipiden	48
4.7.4	Detektion von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1	49
4.8	Beteiligung von p24 an der Lipidsortierung in COPI-Vesikeln?	51
4.8.1	Herstellung der Eichproteine p23 und p24 zur Quantifizierung	51
4.8.2	Spezifische Interaktion von p24 mit einem Sphingolipid	52
4.8.3	p24, ein SM-bindendes Protein	55
4.9	Massenspektrometrischer Nachweis des Transmembranspan von rekombinantem p24	57
5	DISKUSSION	60
5.1	Synthese von photoaktivierbarem Sphingosin	61
5.1.1	Beweis der Stereokonfiguration von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph und [³ H]-L- <i>threo</i> -photoSph	62
5.1.2	Ausschließliche Markierung von Sphingolipid-bindenden Proteinen	63

5.1.3	Charakterisierung von photoSph	64
5.1.4	Sphingomyelinase Verdau von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSM	65
5.1.5	Massenspektrometrischer Nachweis von photoaktivierbarem Sphingomyelin	65
5.1.6	Metabolisierung von [³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph	66
5.1.7	Photolabile Sphingolipide sind ein Bestandteil von DRMs	66
5.2	Anwendung der Methode	67
5.2.1	Metabolisierung der photolabilen Lipidvorläufer	67
5.2.2	Anwendung der Methode zum Nachweis von Protein-Sphingolipid Interaktionen am Beispiel des Ceramid-Transporters	68
5.2.3	Caveolin-1 weist eine hohe Affinität zu Cholesterin und Sphingolipiden auf	69
5.2.4	Eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1	71
5.2.5	PI-TPβ weist eine Affinität zu Sphingolipiden unter <i>in vivo</i> Bedingungen auf	71
5.3	COPI-Vesikel vermittelte Lipidsortierung	72
5.3.1	Markierungsexperimente mit D- <i>erythro</i> -photoSph und 10-ASA - Mögliche Kandidaten bei der Sortierung von Lipiden: p23 & p24	72
5.3.2	p24 weist eine Affinität zu SM auf	74
5.3.2.1	Membranorganisation und die Rolle der p24-Proteine	76
6	MATERIAL UND METHODEN	78
6.1	Material	78
6.1.1	Chemikalien, Geräte und Zubehör	78
6.1.2	Lipidstandards	80
6.1.3	Primärantikörper	81
6.1.4	Sekundärantikörper	82
6.1.5	Plasmide	82
6.2	Methoden	83
6.2.1	Synthese photolabiler Lipidvorläufer	83
6.2.1.1	9-(3-Octyl-3H-diazirin-3-yl)-nonansäure (10-ASA, 22)	83
6.2.1.1.1	10-Oxo-octadecansäure (21)	83
6.2.1.1.2	9-(3-Octyl-3H-diazirin-3-yl)-nonansäure (10-ASA, 22)	84
6.2.1.2	(E)-(2S,3R)-2-Amino-13-(3-butyl-3H-diazirin-3-yl)-tridec-4-en-1,3-diol (D- <i>erythro</i> -photoSph, 11)	85

6.2.1.2.1	Decandiol-mono-propionat (2)	85
6.2.1.2.2	Propionyl-decan-1-ol-10-al (3)	86
6.2.1.2.3	1-Propionyl-tetradecan-1,10-diol (4)	87
6.2.1.2.4	10-Keto-tetradecanyl-1-propionat (5)	87
6.2.1.2.5	14-Hydroxy-tetradecan-5-on (6)	89
6.2.1.2.6	9-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-nonan-1-ol (7)	89
6.2.1.2.7	9-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-nonal (8)	90
6.2.1.2.8	(S)-4-[(E)-11-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)undec-2-enoyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure-tert-butylester (9)	91
6.2.1.2.9	(S)-4-[(R)-(E)-11-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-1-hydroxy-undec-2-enyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure tert-butyl-ester (10)	92
6.2.1.2.10	(E)-(2S,3R)-2-Amino-13-(3-butyl-3H-diazirin-3-yl)-tridec-4-en-1,3-diol (14-Azi-Sphingosin) (11)	92
6.2.1.2.11	(S)-4-[2-(Dimethoxy-phosphoryl)-ethanoyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure tert-butylester (13)	94
6.2.1.2.12	Synthese von geschütztem [³ H]-D- <i>erythro</i> - und [³ H]-L- <i>threo</i> -photoSph	95
6.2.1.2.13	Synthese von [³ H]-D- <i>erythro</i> - und [³ H]-L- <i>threo</i> photoSph	95
6.2.1.3	Synthese von [3 α - ³ H]-6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol ([³ H]-photo-Chol, 18a)	97
6.2.1.3.1	Synthese von 6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol (photoChol, 16)	97
6.2.1.3.2	Synthese von 6-Azi-5 α -cholestan-3-on (3-Keto-photoChol, 17)	98
6.2.1.3.3	Synthese von [3 α - ³ H]-6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol ([³ H]-photo-Chol, 18)	98
6.2.1.3.4	Herstellung von M β CD-komplexiertem [³ H]-photoChol	100
6.3	Zellkultur	101
6.4	Präparation von Golgi aus CHO- Zellen	101
6.5	Transfektion mit Lipofectin	102
6.6	Photochemische <i>in vivo</i> Markierung von Zellen mit 10-ASA/[³H]-Cholin, [³H]-photoChol und [³H]-photoSph	103
6.7	Photochemische <i>in vivo</i> Markierung von Zellen mit 10-ASA und D-<i>erythro</i>-photoSph, sowie die Verwendung von Inhibitoren	104
6.8	Methanolische Lipidextraktion	105

6.9	Milde ammoniakalische Hydrolyse	105
6.10	Saure Lipidextraktion nach Bligh & Dyer	105
6.10.1	Massenspektrometrische Analyse- und quantitative Bestimmung von Membranlipiden	106
6.11	Immunpräzipitation	107
6.11.1	Proteingelelektrophorese	109
6.11.1.1	Invitrogen 10-20% Tris/Tricine Gele	110
6.11.1.2	SDS-PAGE nach Lämmli	111
6.12	Western Blot-Analyse	112
6.13	Isolierung von <i>Detergent Resistant Membranes</i> (DRM)	114
6.14	Behandlung von Lipidextrakt mit Sphingomyelinase	114
6.14.1	Transformation von DH5 α	115
6.14.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	115
6.15	Expression von rekombinantem p23 und p24	116
6.15.1	Transformation von Origami	117
6.15.2	Expression von p23 und p24	117
6.16	Proteinbestimmung nach Lowry	119
6.17	Massenspektrometrischer Nachweis der Transmembrandomäne von rekombinantem p24	120
7	ABKÜRZUNGEN	121
8	LITERATUR	123

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zur Untersuchung von Protein-Sphingolipid-Interaktionen. *In vitro* generierte COPI-Vesikel weisen eine im Vergleich zur Donormembran höhere Konzentration der SM-Spezies SM 18:0 auf (Brugger et al. 2000). Die Anreicherung der SM-Spezie könnte auf eine spezifische Protein-Lipid-Interaktion zurückzuführen sein. Bei den Proteinen der p24-Familie handelt es sich um Transmembranproteine, welche ein Teil der Budding-Maschinerie zur Bildung von COPI-Vesikeln sind und in diesen angereichert vorliegen (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996). Sie stellen somit potentielle Kandidaten der Lipidsortierung dar. Die zu etablierende Methode sollte Hinweise liefern, ob den Proteinen der p24-Familie eine Funktion bei der durch COPI-Vesikel vermittelten Lipidsortierung zukommt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein radioaktives und durch UV-Licht aktivierbares Sphingosin-Derivat - [³H]-D-*erythro*-photoSph - synthetisiert werden. Markierungsexperimente von Zellen mit dieser Verbindung zeigten, dass dieses wie sein natürliches Analogon Sphingosin von der Zelle aufgenommen und zu photoaktivierbaren Sphingolipiden verstoffwechselt wird. Die radioaktive Markierung des Ceramid Transporters - einem Sphingolipid bindenden Protein - zeigte, dass sich [³H]-D-*erythro*-photoSph zum Nachweis von Protein-Sphingolipid-Interaktionen eignet.

Photoaktivierbares Cholesterin und die photoaktivierbare Stearinsäure 10-ASA in Kombination mit [³H]-Cholin wurden bereits erfolgreich zur Analyse von Protein-Cholesterin bzw. Protein-Phosphatidylcholin-Interaktionen eingesetzt (Thiele et al. 2000). Das hier vorgestellte Sphingosin-Derivat ermöglicht nun auch die Analyse von Protein-Sphingolipid-Interaktionen.

Die Methode wurde auf die p24-Proteine p23 und p24 angewandt. Auf diese Weise konnte eine spezifische Interaktion von p24 mit einem Sphingolipid gezeigt werden. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich um eine Interaktion mit Sphingomyelin handelt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass dem p24-Protein p24 eine Rolle bei der Lipidsortierung bzw. der Membranorganisation zukommen könnte.

1.2 Abstract

The purpose of this work was to establish a method for investigation of protein-sphingolipid interactions. *In vitro* generated COPI-vesicles reveal a higher concentration of the sphingomyelin-species SM 18:0 compared to the Golgi membrane from which they were generated (Brugger et al. 2000). The accumulation of this SM-species might be due to a protein-lipid interaction. The proteins of the p24-family are type-I transmembrane proteins. They are a component of the budding machinery needed for COPI-vesicle formation and are enriched in these structures (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996). For this reason, they represent potential candidates for lipid sorting. The method which has to be established should give clues, as to whether proteins of the p24-family play a role in lipid sorting mediated by COPI-vesicles.

Within the scope of this work, a radioactive and a UV-light-activatable sphingosine derivative - [³H]-D-*erythro*-photoSph - was synthesized. Labeling experiments of cells with this compound revealed that it is taken up by cells and that it is processed to photoactivatable sphingolipids just like its natural counterpart sphingosine. Radioactive labeling of the ceramide transporter, a sphingolipid binding protein, shows that [³H]-D-*erythro*-photoSph is a suitable tool for investigation of protein-sphingolipid interactions.

Photoactivatable cholesterol and the photoactivatable stearic acid 10-ASA, in combination with [³H]-choline, were already successfully used to analyse protein-cholesterol and protein-phosphatidyl choline interactions (Thiele et al. 2000). The sphingosine derivative presented here allows analysis of protein-sphingolipid interactions as well.

The method described here was applied to the p24-family members p23 and p24. In this way a specific interaction of p24 with a sphingolipid could be shown. Initial experiments indicate that the interaction detected is between p24 and sphingomyelin. The knowledge gained from this work reveals a potential role for p24 in lipid sorting, as well as membrane organisation.

2 Einleitung

2.1 Biologische Membranen

Eine eukaryontische Zelle ist in verschiedene Organellen unterteilt. Diese Kompartimentierung ermöglicht der Zelle die Aufrechterhaltung ihrer für den jeweiligen Stoffwechsel notwendigen Bedingungen sowie das gleichzeitige Ablaufen verschiedener Stoffwechselwege. Einzelne Kompartimente werden durch eine Membran voneinander abgetrennt. Biologische Membranen bestehen aus einer Doppelschicht von Lipidmolekülen. Eine häufig vorkommende Lipid-Gruppe bilden die Phospholipide. Hierzu zählen die Phosphoglycerolipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und das zu den Sphingolipiden gehörende Sphingomyelin (SM). Ein weiterer Bestandteil in tierischen Membranen ist das Cholesterin. PC nimmt mit ca. 50% den Hauptanteil aller zellulären Lipide ein (van Meer et al. 2004).

In die Membran sind Proteine eingebettet, welche sich nach bisherigen Vorstellungen frei bewegen können. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde die biologische Membran auch als „flüssiges Mosaik“ bezeichnet (Singer et al. 1972). Neuere Daten zeigen jedoch, dass es sich bei biologischen Membranen offenbar nicht um eine zufällige Anordnung von Lipiden und Proteinen handelt, sondern vielmehr um eine strukturierte, sehr wohl organisierte und definierte Membran (Brown et al. 1992; Brugger et al. 2004). Die verschiedenen Organellen unterscheiden sich durch eine für sie spezifische Lipidzusammensetzung (van Meer 1989). So besteht beispielsweise ein Konzentrationsgradient für SM und Cholesterin, welcher sich vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi zur Plasmamembran hin erstreckt. Dabei nimmt die Konzentration der beiden Lipide zur Plasmamembran hin zu. ER-Membranen sind aufgrund ihres geringen Gehalts an SM und Cholesterin, sowie einem hohen Gehalt an ungesättigten Lipiden im Gegensatz zur Plasmamembran flexibler.

Man unterscheidet zwischen den einzelnen Lipidklassen (PC, PE, PS, SM etc.) und den Lipid-Spezies, bei denen verschiedene, definierte Fettsäuren mit dem Rückgrat des jeweiligen Lipids verknüpft sind. Aus der Kombination von verschiedenen Fettsäuren und unterschiedlichen Kopfgruppen ergibt sich eine enorme strukturelle Vielfalt an Lipiden. Zelluläre Membranen setzen sich aus Hunderten verschiedener Lipide zusammen. Zusätzlich ist die Lipiddoppelschicht polarisiert: So weisen z.B. Innen- und Außenseite der Plasmamembran

eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung auf, wobei die cholinhaltigen Lipide PC und SM an der Außenseite, während PS und PE an der Innenseite der Membran angereichert vorliegen (Devaux 1988; van Meer 1993). Selbst innerhalb einer Membranschicht sind die Lipide nicht zufällig angeordnet. Stattdessen wird eine Sub-Strukturierung in sogenannte Mikrodomänen diskutiert (s. 2.3).

2.2 Biosynthese der Sphingolipide

Sphingolipide sind aus drei strukturellen Elementen zusammengesetzt: (1) Dem Sphingosin-Rückgrat, (2) einer N-acylierten Fettsäure sowie (3) einer Kopfgruppe. Es wurden verschiedene Strukturen des Rückgrates beschrieben (Futerman et al. 2004): Sphingosin (Sph), Sphinganin und 4-Hydroxy-Sphinganin (Phytosphingosin). Diese können wiederum mit Fettsäuren unterschiedlicher Länge, Sättigung und Hydroxylierung sowie mit ca. 500 verschiedenen Kohlenhydratstrukturen als Kopfgruppe kombiniert werden. Präferenzen für gewisse Kombinationen bestehen: So ist beispielsweise N-Palmitoyl-SM (SM 16:0) die Hauptspezies des in der eukaryontischen Zelle vorkommenden Sphingomyelins. Dennoch existiert eine enorme Vielfalt an Sphingolipiden.

Die Biosynthese der Sphingolipide beginnt am ER mit der Kondensierung von Serin und Palmitoyl-CoA zu 3-Keto-Sphinganin (Abbildung 1, **I**), welches durch Reduktion (**II**) in Sphinganin überführt wird. Durch Acylierung (**III**) von Sphinganin entsteht Dihydroceramid. Es existiert eine ganze Familie von Dihydroceramid-Synthasen, von denen jede Präferenzen bezüglich unterschiedlicher Fettsäuren aufweist. Schließlich oxidiert eine Desaturase (**IV**) Dihydroceramid zu Ceramid (Cer). Cer kann zu SM (**V**) oder zu Glucosylceramid (GlcCer, **VI**) umgewandelt werden. Letzteres dient als Vorstufe für die Synthese von Gangliosiden.

Sphingolipide werden in den Lysosomen zunächst bis zum Cer abgebaut. Deacylierung von Cer (**VII**) führt anschließend zum Sphingosin, welches durch Phosphorylierung in Sphingosin-1-Phosphat (Sph1P) überführt wird (**VIII**). Am ER wird Sph1P durch Spaltung der C2-C3-Bindung zu Phosphoethanolamin und Hexadecenal abgebaut (**VIII**). Alternativ können Sphingosin und Sph1P erneut zur Biosynthese von Sphingolipiden herangezogen werden (s. unten).

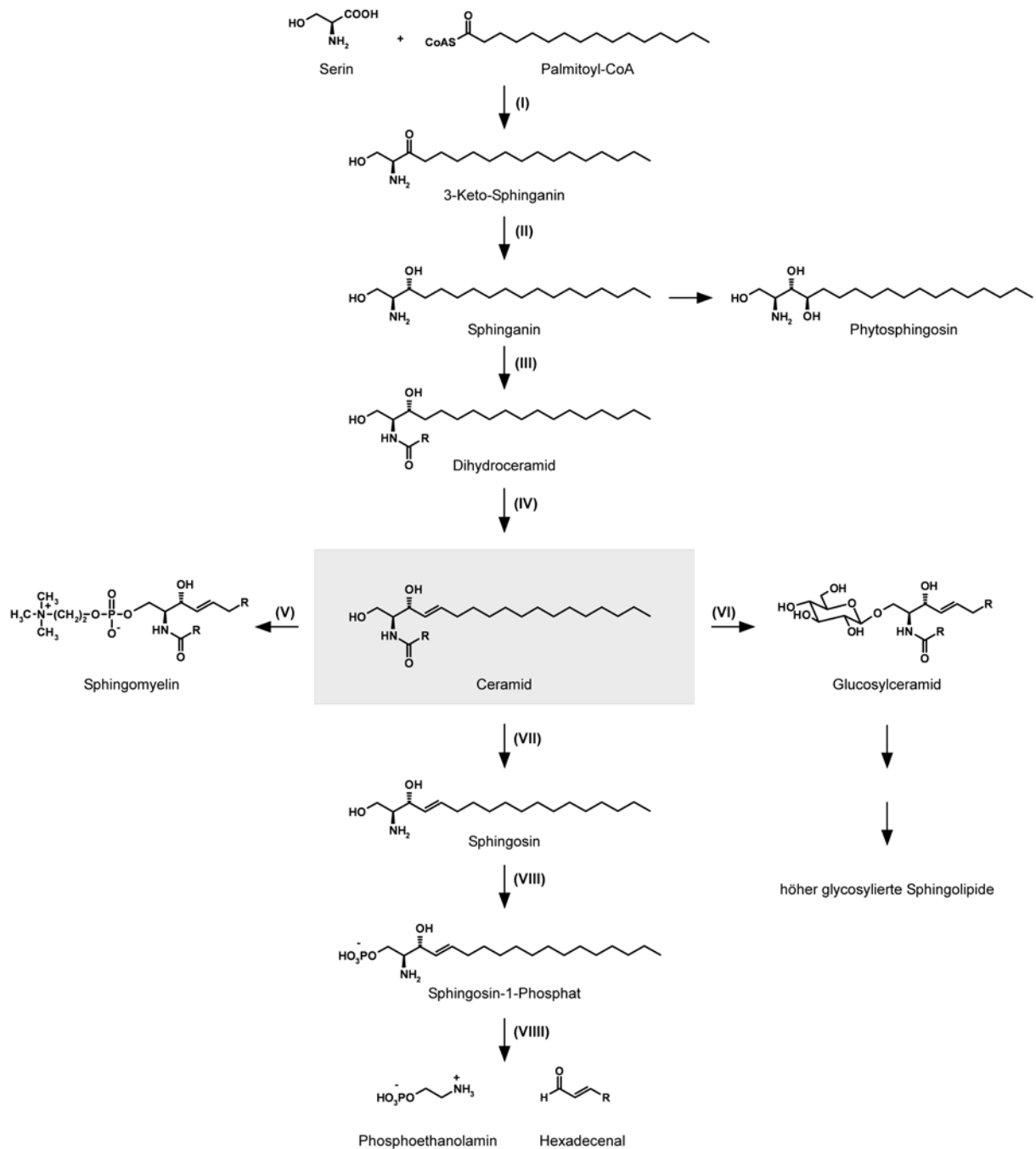


Abbildung 1. Übersicht der Biosynthese von Sphingolipiden und deren Abbau. Die Nummerierung in Klammern verweist auf die im Text erläuterten Reaktionen.

Abbildung 2 fasst einzelne Reaktionen der Sphingolipid-Biosynthese zusammen. Sie gibt Aufschluss darüber, in welchem Kompartiment die einzelnen Sphingolipide gebildet werden. Die Biosynthese von SM, GlcCer und höher glycosylierten Sphingolipiden findet am Golgi statt. Dafür muss Cer vom ER zum Golgi transportiert werden. Diese Aufgabe übernimmt ein cytosolisches Protein, der Ceramid Transporter CERT (Hanada et al. 2003). CERT weist nur

eine geringe Affinität zu anderen Sphingolipiden auf. Die Länge der N-acylierten Fettsäuren sowie die Stereokonfiguration von Cer beeinflussen den durch CERT vermittelten Transfer (Kumagai et al. 2005). Nach Extraktion von Cer aus der Membran des ER wird CERT durch Phosphoinositol-4-monophosphat (PI4P) über seine *Pleckstrin-Homology* Domäne zum Golgi rekrutiert. Nach Freisetzung von Cer kann dieses sowohl zu SM als auch zu GlcCer und höher glycosylierten Sphingolipiden umgesetzt werden. Ob CERT sich beim Transport von Cer von der Membran löst oder der Transport an sogenannten ER-Golgi-Kontaktstellen stattfindet ist unklar.

GlcCer wird auf der cytosolischen Seite des frühen Golgi gebildet. Die Synthese der komplexen glycosylierten Sphingolipide findet hingegen auf der exoplasmatischen Seite der Golgi-Membran statt. Sogenannte Flippasen ermöglichen dabei das Durchqueren der Membrandoppelschicht (Futerman et al. 2005).

Die SM-Synthase (SMS) überträgt die Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Cer, wobei Diacylglycerin und SM gebildet werden. Bisher wurden zwei SM-Synthasen (SMS1 und SMS2) identifiziert (Huitema et al. 2004). Während SMS2 in der Plasmamembran lokalisiert ist, kolokalisiert SMS1 mit der Sialyltransferase, einem Markerprotein für den *trans*-Golgi (Huitema et al. 2004). Allerdings weisen andere Daten auf eine Lokalisierung der SMS im *cis*-Golgi hin (Futerman et al. 1990; Jeckel et al. 1990; Kebbewar 2005). Die Synthese von SM findet auf der luminalen Seite der Golgi-Membran statt. Vom Ort seiner Synthese wird SM effizient zur Plasmamembran transportiert. Hieraus ergibt sich ein Konzentrationsgradient für SM, welcher sich vom ER (2-4mol%) über den Golgi zur Plasmamembran (15-23mol%) hin erstreckt. In Klammern angegebenen sind die zu gesamten Phospholipid ermittelten prozentualen Anteile an SM, welche über Zellfraktionierungen aus Rattenleber ermittelt wurden (van Meer et al. 2000).

Recycling der Sphingolipide findet in den Lysosomen statt. Dort erfolgt deren Abbau zu Sphingosin. Dieses kann die lysosomale Membran durchqueren und von dort über das Cytosol zum ER gelangen, wo es erneut zur Biosynthese von Sphingolipiden verwendet wird. Alternativ kann Sph auf der cytosolischen Seite phosphoryliert werden. Am ER kann Sph1P entweder von einer Phosphatase dephosphoryliert werden und erneut in die Biosynthese von Sphingolipiden eingehen, oder es kommt zur Spaltung von Sph1P durch eine Lyase. Letztere spaltet die C2C3-Kohlenstoffbindung von Sph1P, wodurch Phosphoethanolamin und ein Aldehyd entstehen (van Meer et al. 2000).

Es wird postuliert, dass Protein-Sph1P-Komplexe eine Rolle beim Transport von Sph1P zu unterschiedlichen Membranarealen innerhalb des ERs spielen (Chigorno et al. 2005).

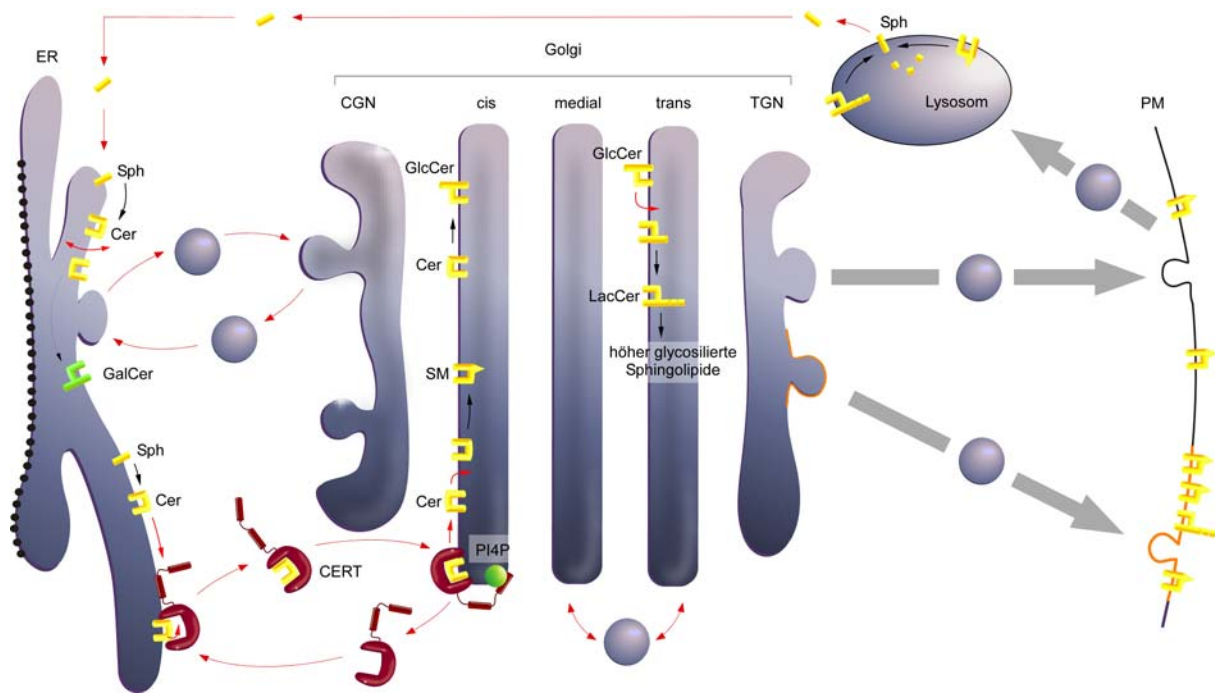


Abbildung 2. Die Topologie der Sphingolipide. Die Abbildung illustriert die einzelnen Schritte der Sphingolipid-Biosynthese im ER und Golgi. Am ER findet die Synthese von Ceramid (Cer) aus Sphinganin bzw. Sphingosin (Sph) statt. Abkürzungen: Galactosyl Ceramid (GalCer), Glucosyl Ceramid (GlcCer), Sphingomyelin (SM), Ceramid Transporter (CERT), Phosphoinositol-4-monophosphat (PI4P, grün), *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN), *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), Plasmamembran (PM).

2.3 Mikrodomänen

Simons und van Meer postulierten erstmals im Jahre 1988 ein Modell, in dem der zur apikalen Plasmamembran gerichtete Transport aus Glycosphingolipid reichen Membranplattformen - den Mikrodomänen bzw. *Rafts* - erfolgt (van Meer et al. 1988). Diese Hypothese veränderte grundlegend die Ansicht des von Singer und Nicholson entworfenen Flüssigmosaik-Konzepts zur Beschreibung von Membranen. Das Flüssigmosaik-Modell beschreibt die Lipiddoppelschicht als eine Matrix, in der sich in ihr befindliche Proteine frei bewegen können.

Nach der sogenannten "Raft-Hypothese" kommt es innerhalb einer Membran zu einer lateralen Organisation von Sphingolipiden und Cholesterin. Dabei entstehen Membranplattformen, sogenannte *Rafts*. In Epithelzellen ist die Plasmamembran in eine apikale Membran, reich an Sphingolipiden und Cholesterin, sowie in eine basolaterale Membran, reich an PC, unterteilt. Die Entdeckung, dass GlcCer vorrangig zur apikalen

Plasmamembran transportiert wird, führte zur Theorie, dass sich auf der luminalen Seite des Golgi sogenannte Mikrodomänen ausbilden, in denen GlcCer angereichert vorliegt. Diese werden als Plattformen für den apikal gerichteten Transport diskutiert. Auch wenn Fibroblasten im Gegensatz zu Epithelzellen keine polarisierte Plasmamembran besitzen, können die in Epithelzellen gefundenen Sortierungsprinzipien auf sie übertragen werden (Simons et al. 1997).

Mikrodomänen bzw. *Rafts* sind hoch dynamische Membranplattformen, deren Aufbau man sich wie folgt vorstellt: Glycosylierte Sphingolipide bilden über Wasserstoffbrücken ein Netzwerk, welches durch Einlagerung von Cholesterin in Zwischenräume der Membran stabilisiert wird. Vorwiegend gesättigte Fettsäuren sorgen dabei für eine stabile Anordnung. Mikrodomänen sind von einer fluiden ungeordneten Membran umgeben. Diese Membranen haben einen hohen Anteil an Phospholipiden mit ungesättigten und somit abgewinkelten Fettsäuren. Glycosylierte Sphingolipide besitzen meist lange N-acylierte Fettsäuren, von denen man vermutet, dass sie mit der anderen Seite der Membrandoppelschicht interagieren und somit Rafts stabilisieren. Ebenso ist eine Stabilisierung durch Transmembranproteine vorstellbar.

Obwohl die Biosynthese von Cholesterin im ER stattfindet, ist eine Bildung der *Rafts* erst im Golgi zu beobachten. Dies ist in Einklang mit dem Befund, dass den im Golgi gebildeten glycosylierten Sphingolipiden eine wichtige Rolle bei der Bildung von Mikrodomänen zukommt. Während in tierischen Zellen die Assoziierung von DRM im Golgi stattfindet bilden sich in Hefe DRM bereits im ER aus (Bagnat et al. 2000).

Sphingolipid-Cholesterin-Plattformen sind in Gegenwart von Triton X-100, einem Detergens, unlöslich. Aufgrund dieser Eigenschaft werden diese Komplexe als *Detergent Resistant Membranes* (DRMs) bezeichnet. Aufgrund ihrer hohen Lipiddichte können DRMs über einen Dichtegradienten von in Detergens löslichen Membranen abgetrennt werden.

Mikrodomänen sind hoch dynamische Membranplattformen. Kommt es zu deren Assemblierung, so können Proteine in diese Domänen eintreten bzw. von ihnen ausgeschlossen werden. Betritt ein Protein eine neue Mikroumgebung, so kann der Phosphorylierungszustand durch lokale Kinasen und Phosphatasen modifiziert und somit eine Signalkaskade ausgelöst werden. Die beteiligten Proteine werden dabei von nicht-raft assoziierten Enzymen, wie z.B. Membran gebundenen Phosphatasen geschützt, welche ansonsten den Signalprozess beeinträchtigen könnten (Simons et al. 2000).

Neuere Daten weisen darauf hin, dass die direkte Lipidumgebung bzw. die Interaktion mit einem spezifischen Lipid die Konformation und damit die Aktivität von Membranproteinen,

wie z.B. des Glutamatrezeptors, regulieren kann (Fahrenholz et al. 1995; Gimpl et al. 1995; Eroglu et al. 2002).

2.4 Transportmechanismen in eukaryontischen Zellen

Die eukaryontische Zelle besitzt ein kompliziertes Endomembransystem. Dieses besteht aus einer Vielzahl unabhängiger Organellen, die eine für sie spezifische Protein- und Lipid-Zusammensetzung aufweisen. Diese Unterteilung ermöglicht eine schrittweise Abfolge von Biosynthese, Modifizierung sowie Sortierung von Proteinen. Sekretorische Proteine oder auch Lipide, die z.B. im ER gebildet werden, werden nach ihrer Biosynthese an ihren entsprechenden Wirkungsort gebracht (Palade 1975). Dabei werden neu synthetisierte Proteine im ER zunächst mit Hilfe von Chaperonen gefaltet. Ferner erfolgen erste Modifizierungen (Glycosylierung, Modifizierung einzelner Aminosäuren etc.). Anschließend wird das Protein zum Golgi transportiert. Dort finden weitere Modifizierungen statt. So werden beispielsweise von Glycoproteinen Mannose-Reste abgespalten und andere Zucker-Reste angefügt. Das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) dient als Sortierungsplattform, von der Proteine entweder zur Zelloberfläche oder zu anderen Kompartimenten des Endomembransystems weitergeleitet werden. Der Transport von Proteinen zwischen den verschiedenen Organellen erfolgt zum Großteil durch Vesikel. Diese schnüren sich von einer Donormembran ab und fusionieren an ihrem Zielort mit der Akzeptormembran.

Transportprozesse im sekretorischen Weg können in anterograder- und retrograder Richtung erfolgen. Beim anterograden Transport werden neu synthetisierte Proteine vom ER über das ER-Golgi-Intermediäre-Kompartiment (ERGIC) zum Golgi und schließlich zur Plasmamembran transportiert, während der retrograde Transport zum ER hin gerichtet ist (Rothman et al. 1996).

Der vesikuläre Transport ermöglicht der eukaryontischen Zelle eine aktive Sortierung von Molekülen und deren zielgerichteten Transport. Zur Zeit kennt man drei verschiedene Typen von Transport-Vesikeln, welche auf molekularer Ebene charakterisiert sind (Harter et al. 2000; Kirchhausen 2000b). Die Einteilung bezieht sich auf die Donormembran sowie auf die entsprechenden cytosolischen Hüllproteine, welche an der Bildung der Vesikel beteiligt sind. Eine Übersicht darüber, welcher Typ von Vesikel am jeweiligen Transport zwischen den einzelnen Kompartimenten beteiligt ist, gibt Abbildung 3.

Clathrin und seine Adapterproteine vermitteln den Transport zwischen TGN, Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran. COPI-Vesikel sind sowohl am retrograden Transport vom Golgi zum ER (Cosson et al. 1994; Letourneur et al. 1994; Sönnichsen et al. 1996), als auch am bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi beteiligt (Orci et al. 1997). COPII-Vesikel hingegen vermitteln ausschließlich den Export von Proteinen und Lipiden vom ER zum ERGIC (Barlowe et al. 1994; Rexach et al. 1994). Daneben existieren weitere Clathrin-unabhängige Mechanismen der Endocytose. Cheng Z. et al. konnten zeigen, dass bei diesen Formen der Endocytose Sphingolipiden eine entscheidende Rolle zukommt (Cheng et al. 2006).

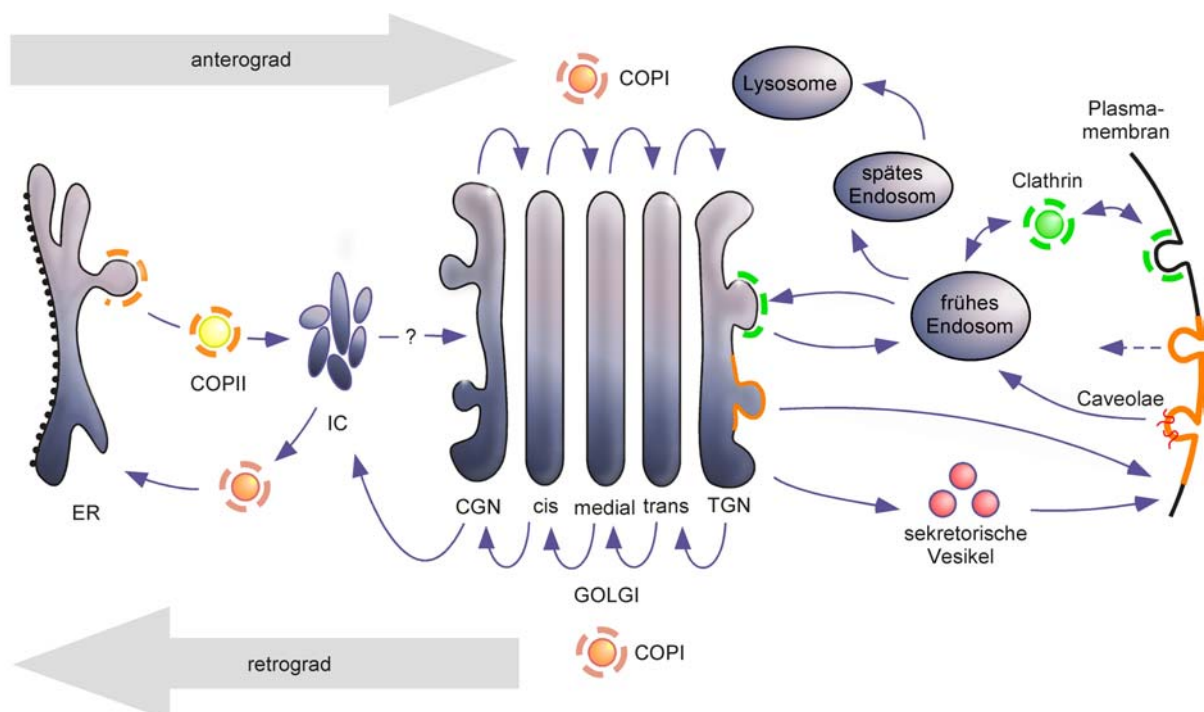


Abbildung 3. Übersicht über den sekretorischen Weg. Am rauhen ER findet die Biosynthese der Proteine statt. Die dort gebildeten sekretorischen Proteine werden mit Hilfe von proteinumhüllten Vesikeln über das ER-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC) und den Golgi-Apparat zu ihrem Bestimmungsort - den Endosomen, den Lysosomen bzw. der Plasmamembran - transportiert. An dem Transport sind neben Clathrin-umhüllten Vesikeln, COPI- und COPII-Vesikel beteiligt. COPII-Vesikel vermitteln den anterograden Transport vom ER zum ERGIC, COPI-Vesikel den retrograden Transport vom Golgi zum ER sowie den bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparats. Dieser besteht aus mehreren Zisternen. Die zum ER hin gerichtete Zisterne wird als *cis*-Golgi-Netzwerk (CGN), die zur Plasmamembran als *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) bezeichnet. Des Weiteren existieren Clathrin-unabhängige Transportmechanismen wie z.B. Caveolae.

2.4.1 COPI-Vesikel

ARF1 befindet sich im ständigen Wechsel zwischen einer cytosolischen (ARF-GDP) sowie einer membranassoziierten Population (ARF-GTP). Der erste Schritt zur Biosynthese von COPI-Vesikeln besteht in der Rekrutierung von ARF1-GDP an die Membran (Abbildung 4). Diese wird durch ein Transmembranprotein wie z.B. p23 vermittelt (Gommel et al. 2001). Der Austausch von GDP gegen GTP wird durch den Nukleotid-Austauschfaktor (NEF) ARNO katalysiert (Donaldson et al. 1992a; Donaldson et al. 1992b; Helms et al. 1992). Die Aktivierung von ARF durch ARNO erfordert die Gegenwart einer Membran (Paris et al. 1997). ARNO besitzt eine *Pleckstrin-Homology* Domäne, mit der das Protein an Phosphatidylinositole binden kann. Vermutlich dirigiert p23 ARF-GDP zu entsprechenden Subdomänen im Golgi-Apparat, welche zur COPI-Bildung fähig sind und somit auch den für den GDP/GTP-Austausch erforderlichen NEF enthalten.

ARF1 besitzt eine N-terminale 17 Aminosäuren lange α -Helix, mit der eine Myristinsäure kovalent verknüpft ist. Der Nukleotid-Austausch hat eine Konformationsänderung zur Folge, wobei die zunächst verborgene Helix mit ihrer Myristinsäure exponiert und somit das Protein in der Membran verankert wird (Goldberg 1998). Nach dem Austausch von GDP gegen GTP dissoziiert ARF-GTP von p23 ab, wobei zwei Bindungsstellen für Coatomer entstehen: p23 (Sohn et al. 1996; Dominguez et al. 1998; Harter et al. 1998; Gommel et al. 2001) und ARF-GTP (Zhao et al. 1997; Zhao et al. 1999).

Der durch ARF NEF vermittelte Nukleotid-Austausch und die mit ihr einhergehende Bindung von ARF-GTP an die Membran, leitet den nächsten Schritt zur Biogenese von COPI-Vesikeln ein: Die Rekrutierung von cytosolischem *Coatomer*.

Coatomer, ein Proteinkomplex aus sieben Untereinheiten (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - und ζ -COP) wird im Gegensatz zu den Hüllproteinen der COPII-Vesikel *en bloc* angelagert (Hara-Kuge et al. 1994). Unter Hochsalzbedingungen wird Coatomer in zwei Untereinheiten gespalten: Die B-COPI-Untereinheit (α , β' , ϵ) und die F-COPI-Untereinheit (β , γ , δ , ζ) (Lee et al. 2004). Die Vier Komponenten der F-COPI-Untereinheit weisen Sequenz- und Strukturhomologien zum Clathrin bindenden Adaptor-Protein Komplex auf (Lee et al. 2004).

Schließlich kommt es zur Polymerisierung der Hüllproteine (Reinhard et al. 1999) und zur Rekrutierung des ARF-GTPase-aktivierenden Proteins (ARF GAP). Dieses stimuliert die GTP-Hydrolyse von ARF-GTP und führt schließlich zur Dissoziation von ARF-GDP. Für ARF GAP1 konnte eine Abhängigkeit der Aktivität von der Krümmung der Membran

beobachtet werden (Bigay et al. 2003). Dabei ist die Hydrolyse von ARF-gebundenem GTP für die Aufnahme von Frachtmolekülen von entscheidender Bedeutung (Nickel et al. 1998; Malsam et al. 1999; Pepperkok et al. 2000).

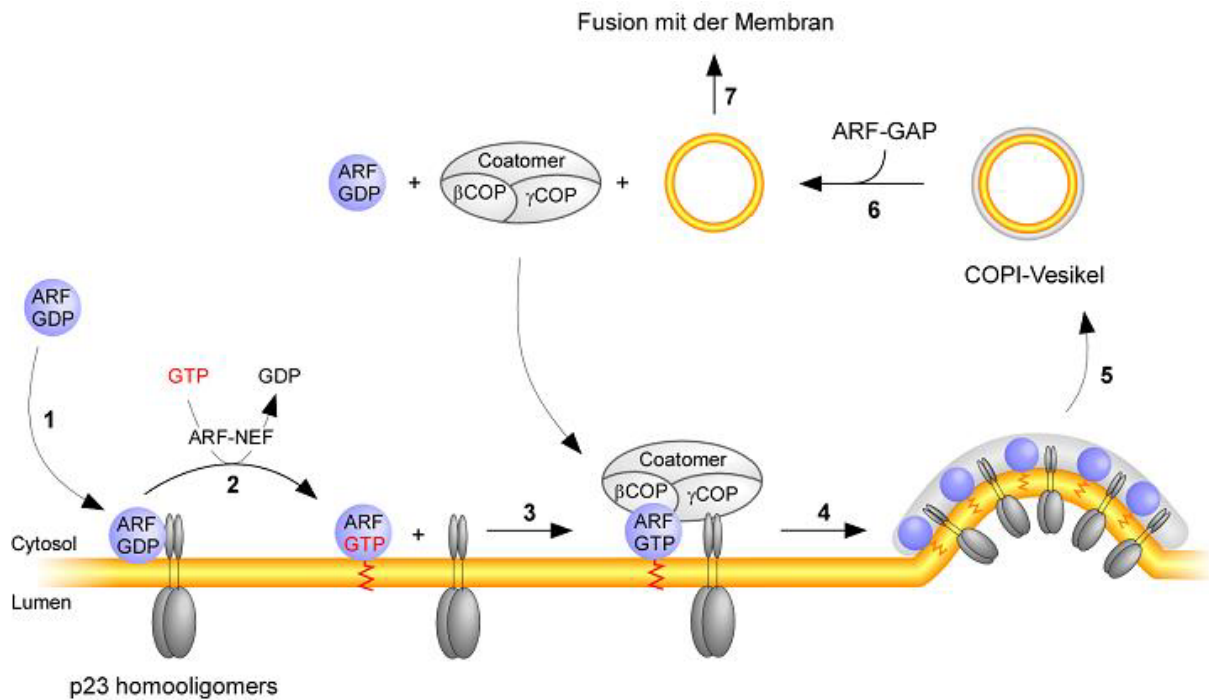


Abbildung 4. Bildung von COPI-Vesikeln. Cytolisches ARF-GDP wird durch p23 an die Membran rekrutiert (1). Ein Nukleotid-Austausch-Faktor (NEF) katalysiert den Austausch von an ARF gebundenem GDP gegen GTP (2), wobei ARF-GTP mit der Membran verankert wird. An die Membran gebundenes ARF-GTP und p23 dissoziieren und Coatomer lagert sich *en bloc* an (3). Es kommt zur Polymerisierung des Hüllproteins (4) und schließlich zur Abschnürung des Vesikels von der Donormembran (5). ARF-GAP hydrolysiert von ARF gebundenes GTP (6), wobei auch Coatomer sich von dem Vesikel löst. Schließlich kommt es zur Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran (7).

2.4.2 COPII-Vesikel

Die COPII-Rekrutierung findet am ER statt. Analog zu ARF (s. 2.4.1) dient die GTPase Sar1 als molekularer Schalter und steuert die Anlagerung der COPII-Hüllproteine. Dieses leitet somit den ersten Schritt zur COPII-Vesikelbildung ein (Antonny et al. 2001b). Die GTPasen Sar1 und ARF1 sind insofern außergewöhnlich, als dass der Austausch von GDP zu GTP nur

in Gegenwart einer Membran erfolgen kann (Paris et al. 1997). Sar1 weist eine 23 Aminosäuren lange α -Helix auf (Lee et al. 2004) und trägt im Gegensatz zu ARF1 keine Lipidmodifizierung. Der Nukleotid-Austausch von Sar1 wird durch Sec12, einem Typ-II Membranprotein katalysiert (Barlowe et al. 1993). Durch den Austausch kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der Sar1-GTP eine amphiphatische α -Helix exponiert. Diese erleichtert die Bindung an die ER-Membran und leitet die Anlagerung der cytosolischen Hüllproteine ein. Ein wesentlicher Unterschied zur Bildung von COPI-Vesikeln liegt darin, dass die Anlagerung der Hüllproteine in zwei Schritten erfolgt. Zunächst rekrutiert Sar1 das Heterodimer Sec23-24. Der entstehende Sar1-Sec23/24-Komplex rekrutiert dann in einem zweiten Schritt das Heterotetramer Sec13-31 (Matsuoka et al. 1998; Antony et al. 2001a).

In COPI-Vesikeln beschleunigt ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) die Hydrolyse von ARF gebundenem GTP. Im Gegensatz dazu ist in COPII-Vesikeln das *Coat*-Protein Sec23 das GAP für Sar1 und reguliert dessen intrinsische, langsame GTPase-Aktivität (Yoshihisa et al. 1993). Die Anlagerung von Sec13-31 an den Sar1-Sec23/24-Komplex beschleunigt die durch Sec23-vermittelte GAP-Aktivität um ein Vielfaches (Antony et al. 2001a; Antony et al. 2001b; Bi et al. 2002). Folglich wird die Dissoziation von Sar1 durch GTP-Hydrolyse über die schrittweise Anlagerung des COPII-*Coats* kontrolliert. Eine simultane Rekrutierung des COPII-Mantels würde aufgrund der hohen GAP-Aktivität eine stabile *Coat*-Bildung ausschließen.

Sec24 wird eine Funktion zur Erkennungen von Frachtmolekülen über deren cytoplasmatische Signalsequenzen zugeschrieben. Die konkave Innenseite des Sec23/Sec24-Komplexes mit basischen Aminosäuren könnte die Membranassoziation verstärken und die deren Krümmung erleichtern (Bi et al. 2002). Hinzu kommt, dass Interaktionen des Sec23-24-Komplexes mit Fracht-Proteinen diesen weiter stabilisieren (Lee et al. 2004).

2.4.3 Clathrin-Vesikel

Clathrin-Vesikel sind sowohl an der Rezeptor-vermittelten Endozytose an der Plasmamembran als auch an der Sortierung von Proteinen am TGN beteiligt (Brodsky et al. 2001). Die Transportvesikel umschließt eine Proteinhülle aus Clathrin (Kirchhausen 2000a). Clathrin selbst besteht aus drei leichten und drei schweren Ketten, welche zu einem Triskelion assemblieren. Vom Zielort abhängige Adapterproteine (associated adaptor proteins, AP)

vermitteln die Bindung von Clathrin an die Membran (Kirchhausen 2000a; Robinson et al. 2001). Ihnen kommt eine Aufgabe bei der Sortierung und Konzentrierung der Fracht zu. Die Adapterproteine AP-1, AP-3 und AP-4 sind am Transport vom TGN zu den Endosomen bzw. Lysosomen beteiligt, AP2 am Transport von der Plasmamembran zu den Endosomen. Ihm kommt eine Aufgabe bei der Abschnürung von endocytotischen Vesikeln zu. Wie bei der Rekrutierung von Coatomer an die Membran wird die Anlagerung von AP-1 an diese durch ARF vermittelt. Die Adapterproteine selbst bewirken ihrerseits die Rekrutierung von Clathrin an die Membran.

2.5 Die p24-Familie

In Säugern bilden die Proteine p23, p24, p25, p26, p27 und tp24 zusammen die p24-Familie. Sie sind integrale Transmembranproteine vom Typ-I und werden aufgrund von Sequenzhomologien in 4 Unterklassen eingeteilt: Neben der p26-Unterklasse, bestehend aus p26, p27 und tp24, existieren drei weitere Unterklassen, welche aus jeweils einem der folgenden Proteine bestehen: p23, p24 bzw. p25 (Emery et al. 1997). Ihnen gemeinsam ist ihr Aufbau: Sie besitzen eine große luminaire Domäne, einen *Transmembran Span* (TMS) und ein kurzes cytoplasmatisches Ende. Die p24-Proteine können Heterooligomere bilden (Belden et al. 1996; Dominguez et al. 1998; Fullekrug et al. 1999; Gommel et al. 1999; Emery et al. 2000; Gommel et al. 2001; Jenne et al. 2002; Emery et al. 2003), wobei tp24 und p26 eine Ausnahme darstellen, da sie nahezu ausschließlich als Monomer (p26) bzw. als Dimer (tp24) vorliegen (Fullekrug et al. 1999; Jenne et al. 2002). Die Proteine der p24-Familie sind in den Organellen des frühen sekretorischen Weges lokalisiert (Stammes et al. 1995; Blum et al. 1996; Sohn et al. 1996; Rojo et al. 1997; Dominguez et al. 1998; Blum et al. 1999; Fullekrug et al. 1999; Emery et al. 2000; Jenne et al. 2002; Emery et al. 2003) und können über ihr cytoplasmatisches Ende mit den Hüllproteinen der COPI und COPII-Vesikel interagieren (Fiedler et al. 1996; Sohn et al. 1996; Dominguez et al. 1998; Harter et al. 1998; Bethune et al. 2006). Die C-Termini der p24-Proteine weisen ein gemeinsames Motiv auf (FFXXBB(X)_n mit $n \geq 2$). B steht dabei für die basische Aminosäure Lysin (K) bzw. Arginin (R). Mit dem FFXXBB(X)_n-Motiv interagieren sie, sofern sie als Dimere vorliegen, mit zwei unabhängigen Bindungsstellen in der γ -Untereinheit von COPI (Bethune et al. 2006). p25 besitzt als einziges p24-Protein eine klassische KKXX-Rückführungssequenz. Wird diese mutiert, so kann

dessen Transport zur Plasmamembran beobachtet werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass neben p25 auch andere p24-Proteine über den Golgi hinaus zur Plasmamembran transportiert wurden (Dominguez et al. 1998; Emery et al. 2003). Das gleichzeitige Auftreten von p24-Proteinen an der Plasmamembran nach Mutation der KKXX-Rückführungssequenz von p25 ist wahrscheinlich auf Interaktionen zwischen den luminalen Domänen, welche sogenannte *coiled coil*-Motive enthalten, und den TMS zurückzuführen (Emery et al. 2000; Emery et al. 2003). Dass die Lokalisation der p24-Proteine eng mit der Ausbildung von Heterooligomeren verknüpft ist, zeigen auch Lokalisationsstudien, bei denen nach alleiniger Expression eines p24-Proteins Mislokalisationen anderer p24-Proteine zu beobachten waren (Dominguez et al. 1998; Fullekrug et al. 1999; Emery et al. 2000). Nur eine gleichzeitige Expression der p24-Mitglieder führt zu einer den endogenen Verhältnissen entsprechenden Verteilung (Emery et al. 2000).

Die p24-Proteine p23 und p24 liegen in COPI-Vesikeln angereichert vor (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996; Gommel et al. 1999) und sind Teil der minimalen Maschinerie, welche zur Bildung der Vesikel benötigt wird (Bremser et al. 1999). Allerdings konnten Malsam et al. über das sogenannte *Tether*-Protein CASP COPI-Vesikel isolieren, welche keine p24-Familienmitglieder aufwiesen (Malsam et al. 2005).

Ferner wurde gezeigt, dass die Proteine der p24-Familie in unterschiedlichen Konzentrationen innerhalb der einzelnen Organellen des frühen sekretorischen Weges vorliegen (Jenne et al. 2002). Während p24 und p25 zu etwa gleichen Teilen vorhanden sind, bilden p27 und p23 einen sich entgegengesetzten Konzentrationsgradienten vom ER zum Golgi aus. Die jeweils höchste Konzentration ist dabei im ER (p23) bzw. im Golgi (p27). Die steady-state-Konzentrationen von p26 und tp24 weichen von denen der anderen p24-Mitglieder deutlich ab: p26 ist das p24-Protein mit der höchsten Konzentration und ist ca. 10-15 mal stärker vertreten als p24. tp24 ist das p24-Protein mit der geringsten Konzentration (Jenne et al. 2002).

2.6 Lipidsortierung

Jede Organelle besitzt ihre eigene für sie charakteristische Lipidzusammensetzung (van Meer 1989; van Meer et al. 1994). Die einzelnen Organellen sind mit Ausnahme der Mitochondrien und Peroxisomen über einen vesikulären Transport miteinander verknüpft. Mit dem

vesikulären Transport ist ein ständiger Fluss von Lipiden verbunden. Es ist unklar, wie eine Organelle die für sie spezifische Lipidzusammensetzung - trotz des durch den vesikulären Transport ständig stattfindendem Lipidflusses - aufrecht erhält (van Meer et al. 2004). Lipide, welche sich auf der cytoplasmatischen Seite der Doppelmembran befinden, können mit Hilfe von Lipid-Transferproteinen durch das Cytosol transportiert werden. Beispiele hierfür sind der bereits oben erwähnte Ceramid Transporter (Hanada et al. 2003) oder auch die Phospholipid Transfer Proteine (Wirtz 1997). Für Lipide, welche sich auf der luminalen Seite der Doppelmembran befinden, ist dies nicht möglich. Hier kann ein Transport nur durch Lateraldiffusion bzw. den vesikulären Transport erfolgen (van Meer 1993). Dabei nimmt man an, dass dem vesikulären Transport eine Hauptrolle bei der Lipidsortierung zukommt. Dafür sprechen auch Daten einer quantitativen Lipidanalyse von *in vitro* generierten COPI-Vesikeln und deren Donormembranen (Brugger et al. 2000). Die Untersuchungen ließen zwei interessante Beobachtungen zu. Zum einen wiesen COPI-Vesikel eine geringere Konzentration an Cholesterin und SM auf als die Donor-Golgi-Membran, aus der sie gebildet wurden. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass trotz der geringeren SM-Konzentration eine SM-Spezies, SM 18:0, in den COPI-Vesikeln angereichert vorlag (Brugger et al. 2000). Eine Abreicherung von Cholesterin und SM in den COPI-Vesikeln könnte auf eine heterogene Donormembran zurückzuführen sein. Die Isolierung von DRMs aus Golgi-Membranen weisen auf die Existenz von Mikrodomänen und somit auf eine heterogene Golgi-Membran hin (Gkantiragas et al. 2001). Eine Erklärung für die geringe Cholesterin und SM-Konzentration innerhalb der COPI-Vesikel könnte darin liegen, dass sich diese aus solchen Membranarealen abschnüren, welche wenig Cholesterin und SM enthalten. Diese Vermutung wird durch den Ausschluss von p23 aus DRMs unterstützt. Eine Anreicherung von SM 18:0 könnte durch einen aktiven Transport während der Vesikelbildung erfolgen. Denkbar wäre dies z.B. durch eine Interaktion eines Proteins mit dieser Lipidspezies. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Proteine der p24-Familie, da diese ebenfalls in COPI-Vesikeln angereichert vorliegen. Ein Beispiel dafür, dass spezifische Protein-Lipid-Interaktionen bei der Biosynthese von Vesikeln eine Rolle spielen können, wurde anhand von Synaptophysin, einem spezifisch mit Cholesterin interagierendem Protein gezeigt. Dabei wurde photochemisch aktivierbares Cholesterin eingesetzt, um interagierende Proteine *in vivo* zu markieren (Thiele et al. 2000). Der hierbei verwendete Ansatz der Markierung von Lipiden mit photolabilen Gruppen ist somit eine vielversprechende *in vivo* Methode zur Analyse spezifischer Protein-Lipid-Interaktionen.

3 Zielsetzung der Arbeit

Lipidanalysen von Golgi-Membranen und aus diesen *in vitro* generierten COPI-Vesikeln ergaben, dass Sphingomyelin (SM) und Cholesterin (Chol) in COPI-Vesikeln abgereichert sind. Trotz der geringen SM-Konzentration in den Vesikeln zeigten die Untersuchungen eine Anreicherung einer definierten SM-Spezies, SM 18:0 (Brugger et al. 2000). Ein möglicher Mechanismus der zur Akkumulierung von SM 18:0 in den Vesikeln führt, könnte über eine spezifische Protein-Lipid-Interaktion erfolgen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Untersuchung von Protein-Sphingolipid-Interaktionen zu etablieren. Hierzu sollte ein neues, photoaktivierbares Derivat des Sphingosins synthetisiert und dessen Anwendung zur Analyse von Sphingolipid bindenden Proteinen charakterisiert werden.

Den Proteinen der p24-Familie wird eine wichtige Rolle bei der Bildung von COPI-Vesikeln zugeschrieben. Sie sind wie SM 18:0 in den Vesikeln angereichert (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996; Gommel et al. 1999). Bei ihnen könnte es sich daher um potentielle Kandidaten handeln, die eventuell bei der in COPI-Vesikeln beobachtete Lipidsortierung beteiligt sind. Die zu entwickelnde Methode sollte auf die Proteine der p24-Mitglieder angewandt werden. Dadurch sollten Erkenntnisse gewonnen werden, ob den p24-Proteinen eine Funktion bei der Lipidsortierung zukommen kann.

4 Ergebnisse

Lipide sind in den verschiedenen Organellen der Zelle heterogen verteilt (van Meer 1989). Für Sphingomyelin (SM) und Cholesterin (Chol) ist ein Gradient beschrieben, welcher sich vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran erstreckt (Orci et al. 1984; Moreau et al. 1994). Dabei nimmt die Konzentration von SM und Chol zur Plasmamembran hin zu.

Die Analyse der Lipidzusammensetzung von *in vitro* gebildeten COPI-Vesikeln und den entsprechenden Donormembranen zeigte, dass eine SM-Spezies (N-Stearoyl-SM, SM 18:0) in COPI-Vesikeln drastisch angereichert vorliegt, während alle anderen SM-Spezies und Cholesterin abgereichert sind (Brugger et al. 2000). Diese Abreicherung erfolgt entweder während oder vor der Bildung der Vesikel.

4.1 Isolierung von *Detergent Resistant Membranes* (DRM) aus Golgi Membranen: p24-Proteine sind nicht DRM-assoziierte Proteine

COPI-Vesikel weisen eine geringere Konzentration von SM und Cholesterin auf als die Golgi-Membran, aus der diese generiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür liegt darin, dass COPI-Vesikel aus nicht-mikrodomänartigen Membranstrukturen hervorgehen. Mikrodomänen bzw. sogenannte *Rafts* sind Membranplattformen, welche reich an Cholesterin und SM sind. Die Proteine der p24-Familie sind Teil der Maschinerie, welche zur Generierung von COPI-Vesikeln benötigt wird (Bremser et al. 1999). Für p23, dessen cytoplasmatischer C-Terminus als Rezeptor zur Rekrutierung von ARF den ersten Schritt der COPI-Vesikel Biogenese einleitet (Gommel et al. 2001), wurde bereits gezeigt, dass dieses Protein nicht DRM-assoziiert vorliegt (Gkantiragas et al. 2001). Um eine vollständige Analyse aller p24-Familienmitgliedern in Bezug auf ihre DRM-Präsenz durchzuführen, wurden Golgi-Membranen aus CHO-Zellen angereichert und anschließend aus diesen DRM isoliert (6.4 und 6.13). Die Proteine Flotillin (DRM-Marker) und Transferrin-Rezeptor (Markerprotein für in Detergens lösliche Membranen) dienen zur Charakterisierung einzelner

Fraktionen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Es zeigt, dass alle p24-Familienmitglieder nicht-DRM assoziiert vorliegen.

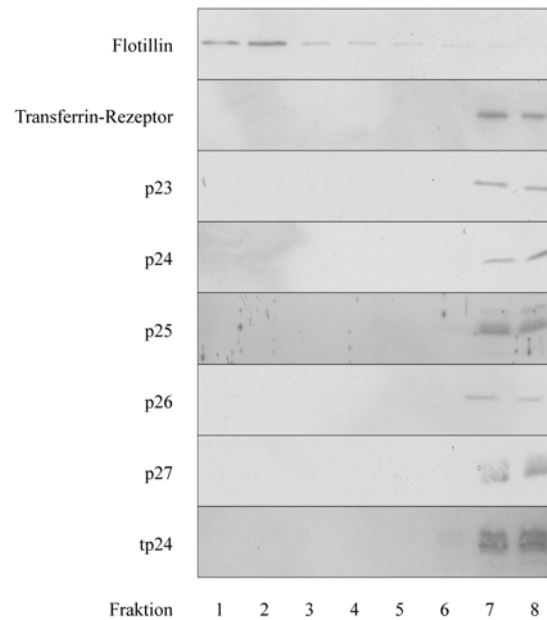


Abbildung 5. DRM-Präparation aus Golgi-Membranen. Die Isolierung von DRM aus CHO Golgi-Membranen erfolgte wie unter 6.4 beschrieben. Die Proteine der einzelnen Fraktionen (3%) wurden über SDS-PAGE (16%-Lämmli) aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Zur Detektion dienten Antikörper gegen die einzelnen Proteine (6.1.3). Flotillin charakterisiert die DRM (Fraktion 2) und Transferrin-Rezeptor die in Detergens lösliche Membran (Fraktion 7 und 8).

4.2 Synthese photoaktivierbarer Lipidvorstufen

Potentielle Kandidaten, welchen eine Funktion bei der in COPI-Vesikeln beobachteten Anreicherung von SM 18:0 zukommen könnte, sind die Proteine der p24-Familie (Nickel et al. 2002). Es handelt sich um Transmembran-Proteine, die in COPI-Vesikeln angereichert vorliegen und denen eine Rolle als Coat- und Frachtrezeptoren zugeschrieben wird. Über *in vivo*-Markierung von Proteinen mit photoaktivierbaren Lipiden sollte untersucht werden, ob die Mitglieder der p24-Familie eine Rolle bei der durch COPI-Vesikel vermittelten Lipidsortierung spielen.

Um Interaktionen von Transmembranproteinen mit den sie umgebenden Lipiden zu studieren, sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt, spezifische Protein-Lipid-Interaktionen *in vivo* zu analysieren. Die Vorgehensweise ist in Abbildung 6 illustriert.

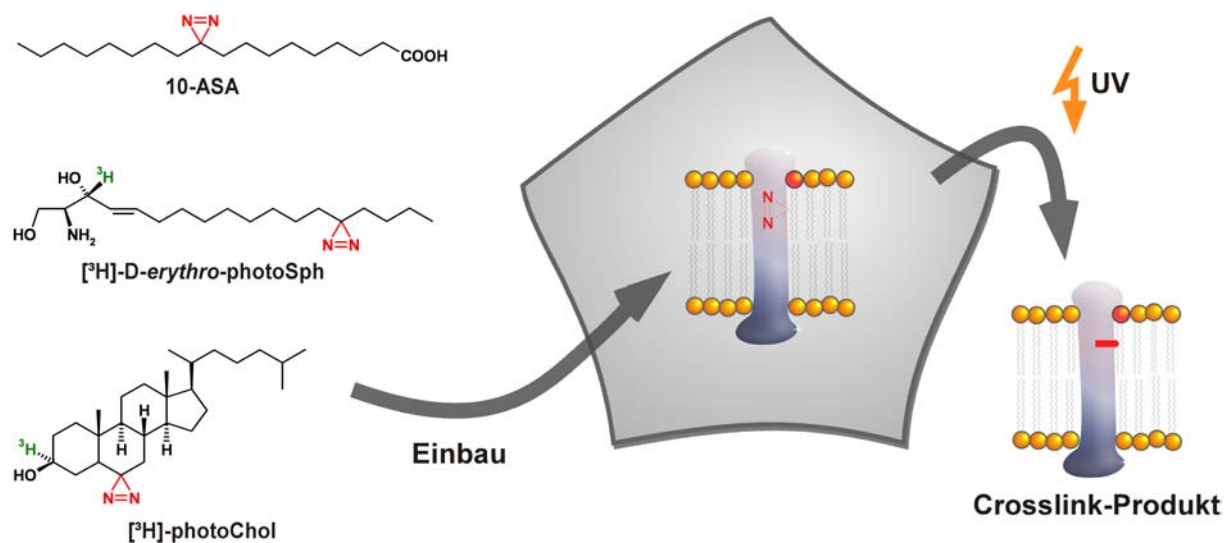


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Analyse spezifischer Wechselwirkungen von Membranproteinen mit Lipiden. Der von der Zelle aufgenommene Lipidbaustein wird verstoffwechselt und in endogene Lipide eingebaut. Die verwendeten Lipidvorläufer enthalten eine photochemisch aktivierbare Gruppe. Durch Bestrahlung mit UV-Licht spalten Lipide mit photochemisch aktivierbarer Gruppe Stickstoff ab und gehen mit ihrer unmittelbaren Umgebung eine kovalente Bindung ein (Crosslink-Produkte).

Grundlage dieser Methode sind photoaktivierbare Lipidvorläufer (s. Abbildung 7). Zwei dieser Verbindungen, das photoaktivierbare Cholesterin ($[^3\text{H}]$ -photoChol) und die photoaktivierbare Stearinsäure (10-ASA), wurden bereits erfolgreich zur Analyse von

Protein-Cholesterin- bzw. Protein-Phosphatidylcholin (PC)-Interaktionen eingesetzt (Thiele et al. 2000; Olayioye et al. 2005). Um jedoch auch Protein-Sphingolipid-Interaktionen untersuchen zu können, sollte ein neues, photoaktivierbares Derivat des Sphingosins synthetisiert werden. Abbildung 7 gibt einen Überblick der in dieser Arbeit synthetisierten photoaktivierbaren Lipidvorstufen.

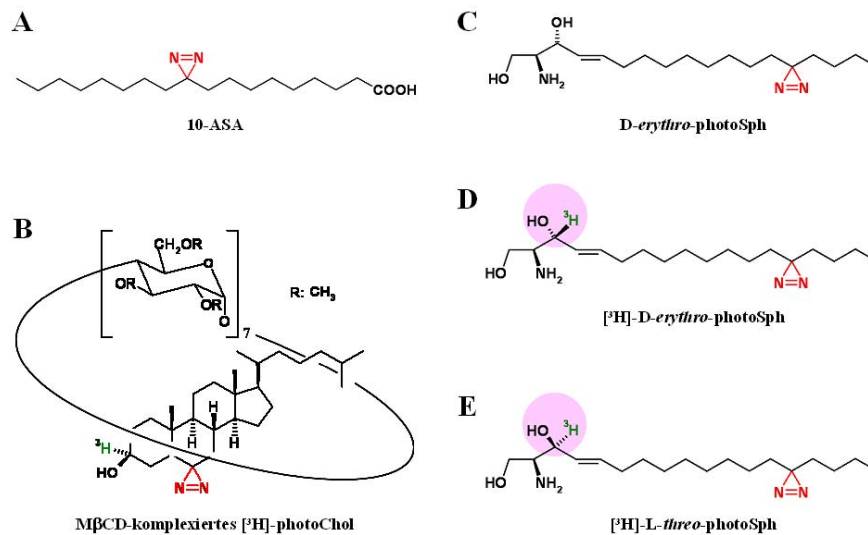


Abbildung 7: Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten photoaktivierbaren Lipidvorläufermoleküle. Die photoaktivierbare Diazerin-Gruppe ist rot, Tritium grün hervorgehoben. (A) Die photoaktivierbare Stearinsäure 10-ASA; (B) mit Methyl-beta-cyclodextrin (MβCD)-komplexiertes photoaktivierbares Cholesterin ([³H]-photoChol). Auf der rechten Seite sind das D-erythro-photoSph (C) sowie die beiden Diastereomere des radioaktiven photoaktivierbaren Sphingosins [³H]-D-erythro- (D) und [³H]-L-threo-photoSph (E) dargestellt. Hervorgehoben ist die unterschiedliche Stereokonfiguration an C3.

4.2.1 Synthese von 10-ASA

Abbildung 8 zeigt die Vorgehensweise zur Synthese von 10-ASA.

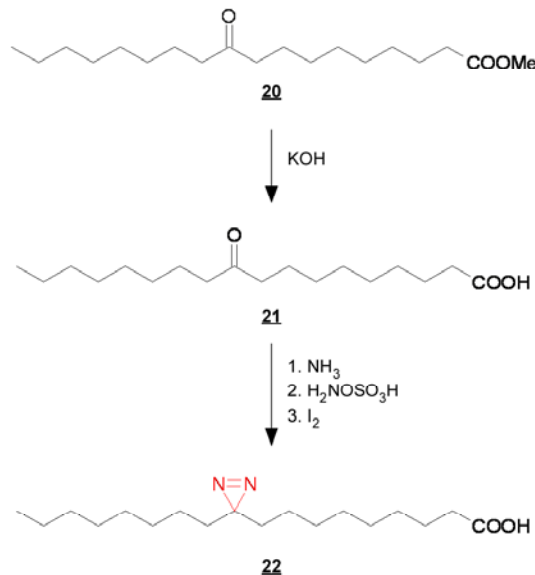


Abbildung 8. Synthese von 10-ASA. Die Synthese von 10-ASA (**22**) beginnt mit der Hydrolyse des Esters (**20**), gefolgt von einer dreistufigen Reaktion zur Einführung der photoaktivierbaren Diazerin-Gruppe.

Ausgangspunkt der Synthese war der Methyl ester (**20**) der Stearinsäure mit einer Keto-Gruppe in Position 10. Der alkalischen Hydrolyse des Esters folgte die Synthese des Diazirins (**22**). Dazu wurde die Fettsäure (**21**) in Methanol vorgelegt und die Suspension mit Ammoniak gesättigt. Durch Zugabe von Aminohydroxysulfonsäure entstand das entsprechende Hydrazinderivat, ein Diaziridin, welches nach Entfernen von ausgefallenem Ammoniumsulfat und Einengen der Lösung unter basischen Bedingungen mit einer methanolischen Iod-Lösung zum Diazirin (**22**), 10-Diazirin-stearinsäure (10-ASA), umgesetzt wurde. Die bei der Bildung des Diazirins entstandenen Zwischenverbindungen wurden nicht isoliert (Abbildung 9).

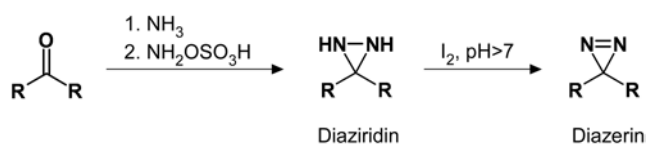


Abbildung 9. Auftretende Zwischenstufe bei der Synthese des Diazerins. Dargestellt sind die bei der Diazirin-Synthese entstehenden Zwischenverbindung.

Der Ansatz wurde lediglich eingeeignet, um Ammoniak vor der Zugabe von Iod zu entfernen. Die Ausbeute betrug 26,7% (Literatur: 30%) (Thiele et al. 2000).

4.2.2 Synthese von [³H]-photoChol

Die Synthese von mit Tritium markiertem, photoaktivierbarem Cholesterin ([³H]-photoChol) erfolgte wie bereits beschrieben (Abbildung 10) (Thiele et al. 2000).

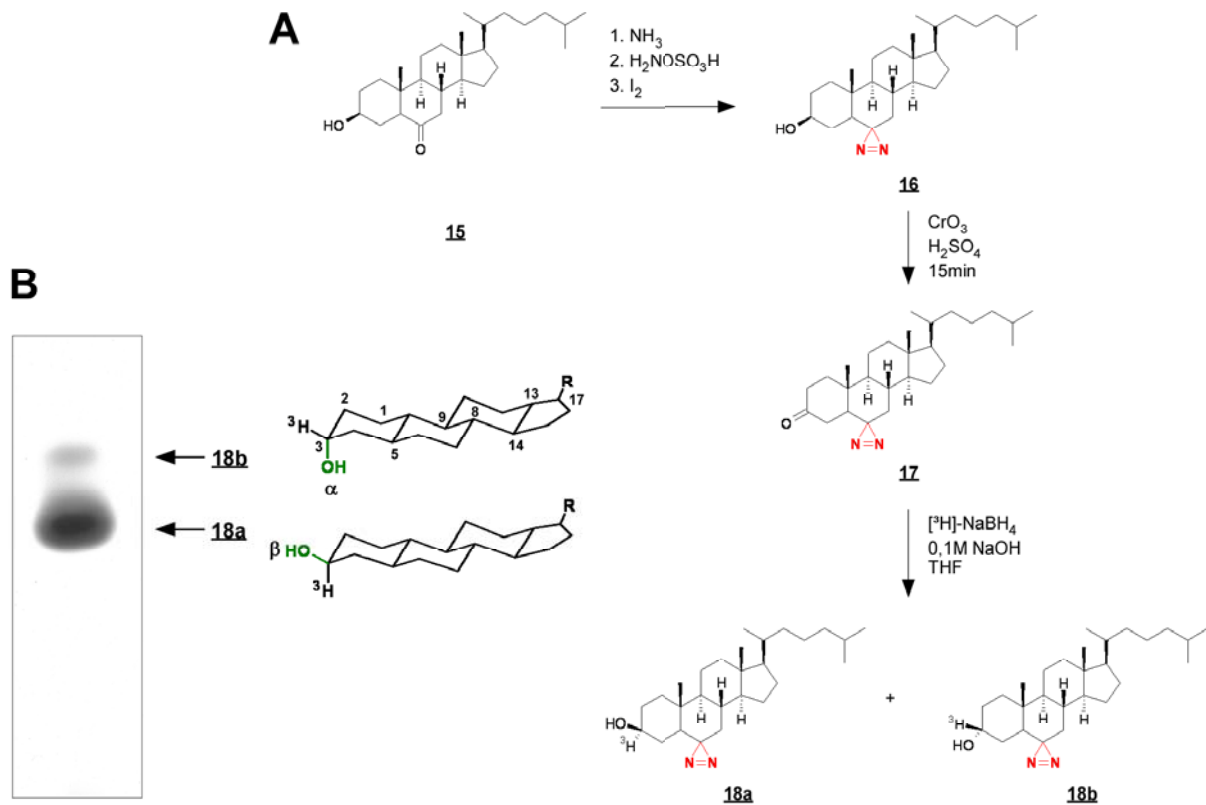


Abbildung 10. Übersicht der Synthese von ^3H -photoChol. (A) Ausgangspunkt der Synthese war 5-Keto-Cholesterin (**15**). In einer dreistufigen Reaktion wurde die photoaktivierbare Gruppe in Position C5 eingeführt. Zur Einführung der Radioaktivität musste zunächst die Alkohol-Gruppe an C2 mit CrO_3 oxidiert und anschließend mit ^3H - NaBH_4 reduziert werden. Die dabei entstehenden Diastereomere **18a/18b** konnten durch präparative Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v) voneinander getrennt werden. (B) Analyse des Rohprodukts nach Reduktion mit ^3H - NaBH_4 durch Dünnschichtchromatographie. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie nach Benetzen der Dünnschichtchromatographie-Platte mit NAMP-100 (Amersham).

Ausgangspunkt der Synthese war 5-Keto-Cholesterin (**15**). Die Diazerin-Gruppe wurde analog der Synthese von 10-ASA eingeführt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch Oxidation der Alkohol-Gruppe des photoaktivierbarem Cholesterins photoChol (**16**) mit Cr(VI) und anschließender Reduktion von 3-Keto-photoChol (**17**) mit ^3H - NaBH_4 . Dabei kann das Tritium von zwei Seiten in die Verbindung eintreten. Wie die Analyse der radioaktiv markierten Verbindungen mittels Dünnschichtchromatographie zeigte (s. Abbildung 10B), ist der Eintritt von der Unterseite bevorzugt. Nach Aufreinigung von **18a** und **18b** ließ sich das Verhältnis der beiden Diastereomere **18b** zu **18a** zu 1:20 bestimmen.

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen mit ^3H -photoChol wurde dieses, wie von Thiele et al. beschrieben, als Komplex mit Methyl-beta-

cyclodextrin (M β CD) eingesetzt (Abbildung 7) (Thiele et al. 2000). Die Herstellung dieses Komplexes erfolgte wie unter 6.2.1.3.4 beschrieben.

4.2.3 Synthese von D-erythro-photoSph und [³H]-D-erythro-photoSph

4.2.3.1 Synthese von D-erythro-photoSph

Abbildung 11 zeigt die Vorgehensweise zur Synthese von photoaktivierbarem Sphingosin (D-erythro-photoSph).

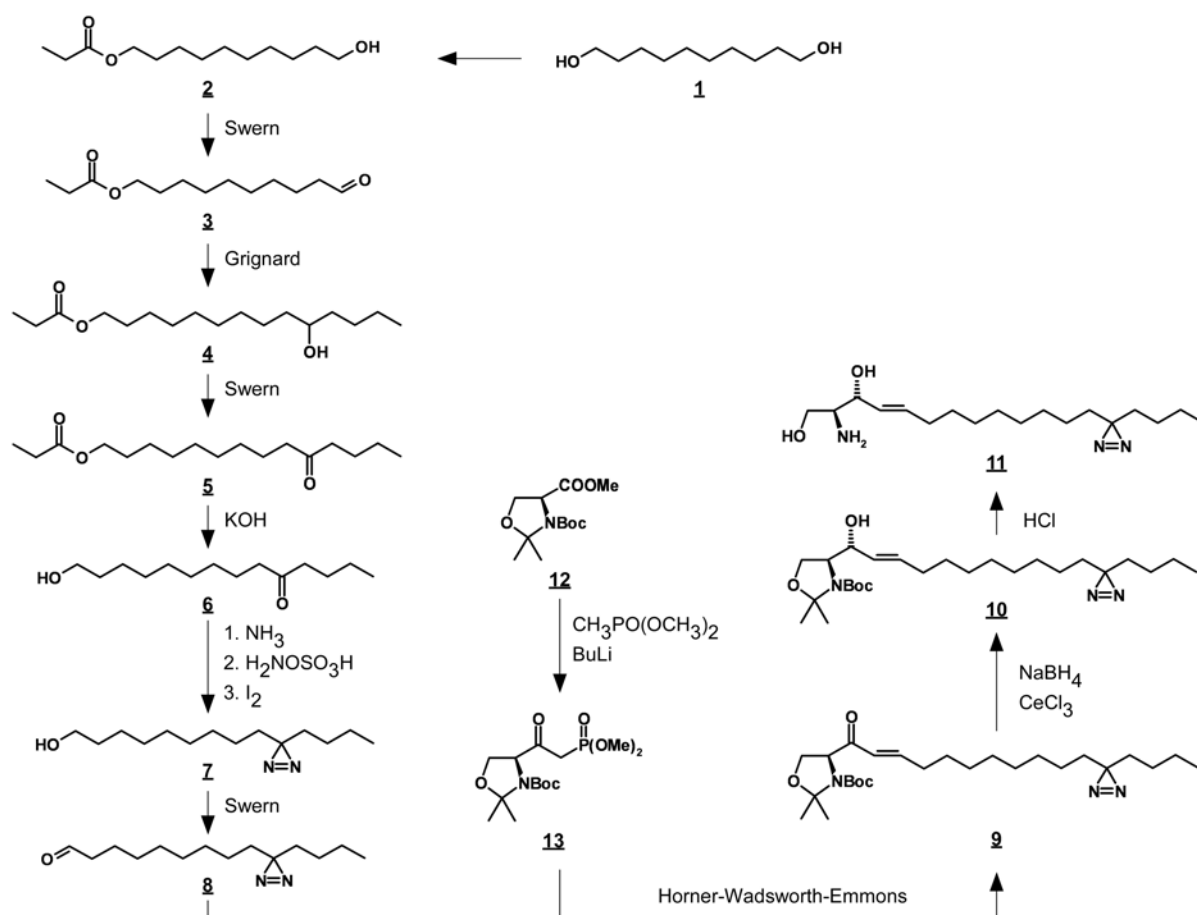


Abbildung 11. Übersicht der Synthese von photoaktivierbarem Sphingosin, photoSph. Erläuterungen s. Text.

Von Decandiol (**1**) ausgehend wurde eine der beiden Alkoholgruppen in Form eines Propionsäureesters geschützt. Da bei der Reaktion neben nicht umgesetztem Diol sowohl der Mono- als auch der Diester entstehen, folgte die säulenchromatographische Aufreinigung des Produktgemisches. Die freie Alkoholgruppe wurde mit einer Swern-Oxidation zum Aldehyd (**3**) umgesetzt und somit für die folgende, kettenverlängernde Grignard-Reaktion aktiviert. Die Grignard-Reaktion mit Butylbromid führte zum 1,10-Tetradecandiol-1-monopropionat (**4**). Der bei dieser Reaktion entstandene sekundäre Alkohol wurde erneut mittels Swern-Oxidation zum Keton (**5**) umgesetzt. Es folgte die alkalische Hydrolyse des Esters zum 10-Ketotetradecan-1-ol (**6**). Analog zur Synthese von 10-ASA bzw. photoChol konnte die Keto-Gruppe in einer Dreistufenreaktion in das Diazirin (**7**) überführt werden. Die Alkohol-Gruppe wurde abermals mittels Swern-Oxidation zum Aldehyd (**8**) oxidiert.

Der Aldehyd (**8**) diente als Vorstufe für die folgende Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion. Das β -Ketophosphonat (**13**) wurde aus dem Garner-Ester (**12**), Methyl-Dimethylphosphonsäureester und Butyl-Lithium hergestellt. Dabei enthält der Garner-Ester (**12**) - ein Serin-Derivat - bereits die stereochemische Information. Der frisch hergestellte Aldehyd (**8**) und das β -Ketophosphonat (**13**) wurden in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zum geschützten 3-Keto-14-azi-Sphingosin (**9**) mit *trans*-Doppelbindung umgesetzt. Es folgte eine diastereoselektive Reduktion des Enons (**9**) mit NaBH₄ in Gegenwart von CeCl₃. Dabei entstanden neben dem gewünschten *D-erythro*- auch das entsprechende *L-threo*-Produkt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte durch Zugabe von 6N Salzsäure. Die Diastereomere konnten von anderen Nebenprodukten säulenchromatographisch getrennt werden. Ebenso gelang die Isolierung der gewünschten *D-erythro*-Form. *D-Erythro*-14-Azi-Sphingosin (*D-erythro*-photoSph, **11**) wurde in Ethanol aufgenommen und seine Konzentration durch UV-Spektroskopie ermittelt. Das UV-Spektrum von *D-erythro*-photoSph ist in Abbildung 12 dargestellt.

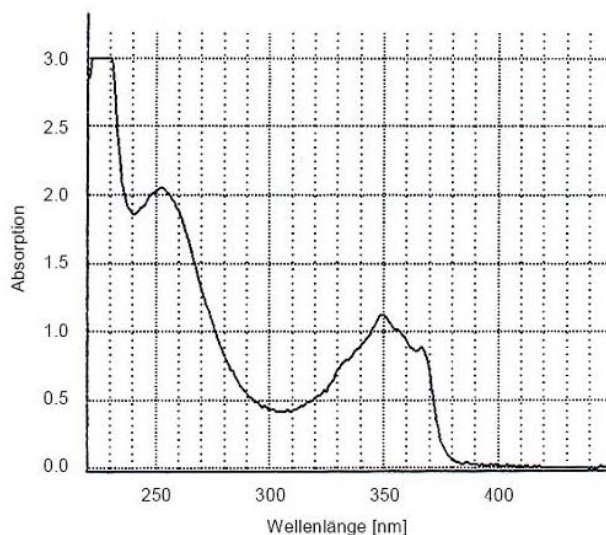


Abbildung 12. UV-Spektrum von D-erythro-photoSph. Das Spektrum einer Lösung von D-erythro-photoSph in Ethanol zeigt die für die Diazerin-Gruppe charakteristischen Absorptionen bei 350 und 367nm.

4.2.3.2 Synthese von [³H]-D-erythro-photoSph

Die Synthese von radioaktiv markiertem photoSph erfolgte wie unter 6.2.1.2 beschrieben. Die beiden bei der Reduktion entstandenen Diastereomere konnten über eine präparative Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt werden. Zur Detektion radioaktiv markierter Verbindungen diente ein Röntgenfilm. Das Kieselgel wurde an entsprechenden Stellen der DC-Platte abgekratzt und [³H]-L-threo- sowie [³H]-D-erythro-photoSph mit absolutem Ethanol extrahiert. Durch Verringerung der Konzentration auf 0.5mCi/ml und Lagerung bei -20°C konnte eine Autoradiolyse des Produktes minimiert werden.

Die Einführung von Tritium in Position C3 ist für die Anwendung dieser Verbindung von entscheidender Bedeutung, da beim vollständigen Abbau von D-erythro-photoSph die photoaktivierbare Gruppe und das Tritium voneinander getrennt werden. Dies ermöglicht die ausschließliche Detektion von Protein-Sphingolipid-Interaktionen. In Abbildung 13 ist der Abbau von D-erythro-photoSph skizziert (mit der Annahme, dass dieser analog dem von D-erythro-Sphingosin erfolgt). Das Sphingosin-Derivat wird zunächst durch Phosphorylierung zu Sphingosin-1-phosphat umgesetzt. Durch Spaltung der C2-C3 Bindung kommt es zur Bildung von Phosphoethanolamin und einem photoaktivierbarem, radioaktiv markierten

Aldehyd. Durch Oxidation der Aldehyd-Gruppe zur Carbonsäure wird die radioaktive Markierung und die photoaktivierbare Gruppe voneinander getrennt. Durch Kreuzvernetzung nach UV-Bestrahlung sind deshalb radioaktiv markierte Proteine ausschließlich auf Protein-Sphingolipid-Interaktionen zurückzuführen.

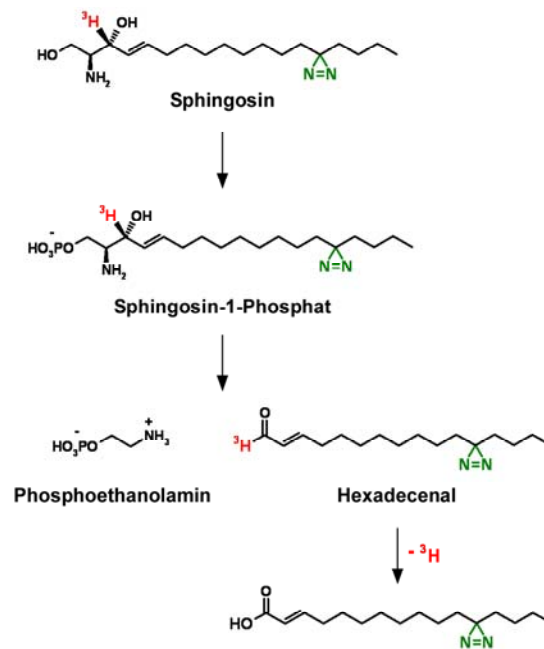


Abbildung 13. Schematische Darstellung des Abbaus von $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph. Sphingosin wird durch Phosphorylierung in Sphingosin-1-Phosphat umgewandelt. Es folgt die Spaltung der C2-C3 Bindung gespalten. Dabei entstehen Phosphoethanolamin und im Fall von $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph 1- $[^3\text{H}]$ -12-azi-Hexadecenal. Durch Oxidation des Aldehyds kommt es zur Bildung einer photoaktivierbaren Fettsäure. Diese kann wiederum in die Biosynthese anderer Lipidklassen eingehen. Durch Oxidation des Aldehyds wird jedoch das Tritium von der photoaktivierbaren Gruppe getrennt. Dies ermöglicht die ausschließliche Detektion von Protein-Sphingolipid-Intekationen.

4.3 Markierungen von Zellen mit D-erythro-photoSph

Potentielle Kandidaten, denen eine Rolle bei der in COPI-Vesikeln beobachteten Lipidsortierung zukommen kann, sind die Proteine der p24-Familie. Um zu überprüfen, inwieweit die p24-Proteine eine derartige Funktion erfüllen können, wurden Zellen in ersten Versuchen mit D-erythro-photoSph markiert und durch UV-Bestrahlung eine Kreuzvernetzung erzielt. Die Zellen wurden lysiert, ihre Kerne entfernt und die Proteine nach

Auftrennung durch SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis der p24-Familienmitglieder p23 und p24 erfolgte durch Western Blot. Dabei zeigte sich, dass nach Fütterung von *D-erythro*-photoSph und UV-Bestrahlung für p24 eine zweite Bande, ein sogenanntes Crosslink-Produkt, auftrat. Ebenso konnte nach Fütterung von 10-ASA ein Crosslink-Produkt mit p24 nach UV-Bestrahlung beobachtet werden. Im Gegensatz zu p24 war bei p23 nur nach 10-ASA-Markierung ein Crosslink-Produkt festzustellen (Abbildung 14A). Weder durch Inkubation der Zellen mit *D-erythro*-Sphingosin, noch durch UV-Bestrahlung oder einer Kombination dieser beiden Behandlungen wurde das Crosslink-Produkt hervorgerufen (Abbildung 13B). Der Anteil des Crosslink-Produktes nahm mit steigender Konzentration an *D-erythro*-photoSph zu (s. Abbildung 14B). Um zu untersuchen, ob es sich bei dem beobachteten Crosslink-Produkt um ein Sphingolipid handelt, wurden Inhibitoren der Sphingolipidbiosynthese herangezogen. Die Ausbeute des mit p24 beobachteten Crosslink-Produktes konnte durch Behandlung der Zellen mit Fumonisin B₁, einem Inhibitor der Ceramid-Synthese, verringert werden (s. Abbildung 14C) (Merrill et al. 1993). Ebenso zeigten Inhibitionsexperimente mit PDMP, welches die *de novo* Synthese von glycosylierten Sphingolipiden hemmt, einen Einfluss auf die Crosslink-Ausbeute: Während bei höheren Konzentrationen (50µM) kein Crosslink-Produkt mehr zu beobachten war (Abbildung 14D), konnte bei geringeren Konzentrationen an PDMP (10µM) weiterhin eine zweite Bande nach UV-Bestrahlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Rosenwald et al. zeigten, dass eine geringe Konzentration an PDMP (2,5-10µM) die Synthese von Glucosylceramid inhibiert (Rosenwald et al. 1992). Bei höheren Konzentrationen ($\geq 25\mu\text{M}$) kam es zudem zu einer verminderte SM-Synthese.

Auch wenn die hier beschriebenen Experimente auf eine Interaktion von p24 mit einem Sphingolipid hindeuten, so ist folgendes zu beachten: (1) ein Crosslink-Produkt von p23 mit einem Sphingolipid könnte ein zu p23 gleiches Migrationsverhalten im verwendeten Gel-System aufweisen, und somit nicht detektiert werden. (2) Es könnte zum Abbau von *D-erythro*-photoSph kommen und die daraus resultierende photoaktivierbare Fettsäure zur Biosynthese anderer Lipidklassen herangezogen werden.

Um dennoch eine eindeutige Aussage machen zu können, ob ein Protein mit einem Sphingolipid interagiert, erfolgte die Synthese von [³H]-*D-erythro*-photoSph.

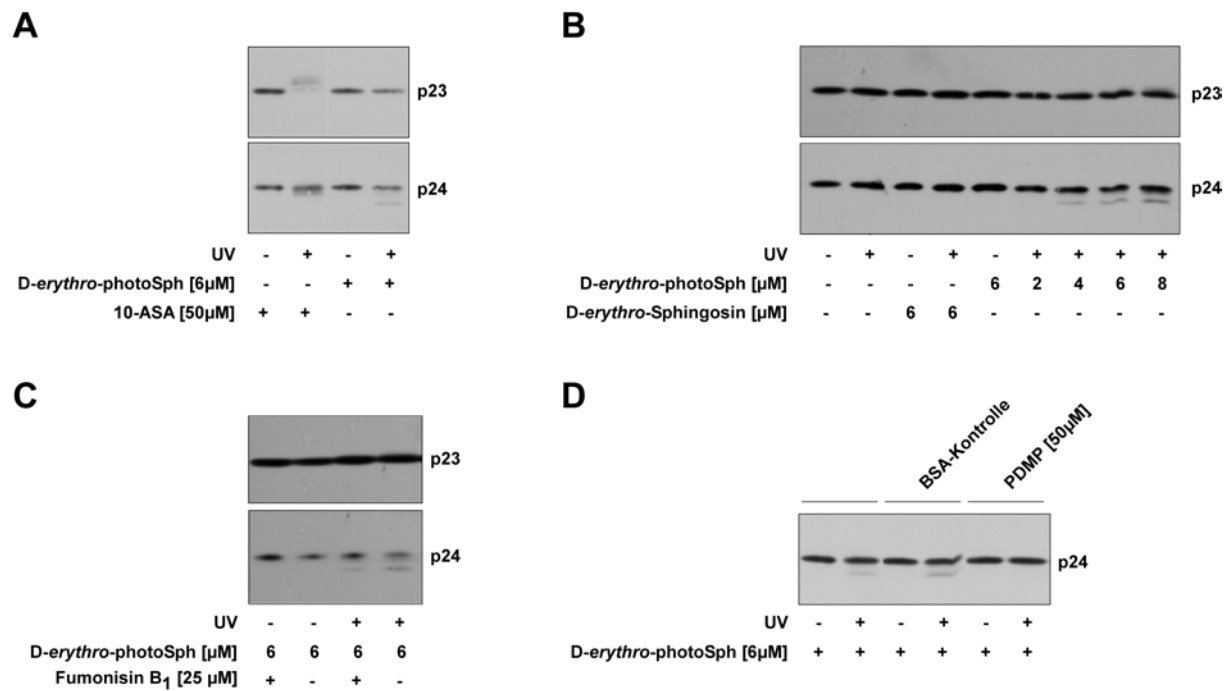


Abbildung 14. Markierungsexperimente von CHO-Zellen mit 10-ASA und D-erythro-photoSph.

(A) Markierung von Zellen für 5h mit D-erythro-photoSph bzw. 10-ASA in lipiddefizientem α MEM. Kreuzvernetzung durch UV-Bestrahlung (5min). Die Zellen wurden lysiert und die Proteine nach Auftrennung über SDS-PAGE (16cm² große 16%-Lämmli-Gele) mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis der Proteine gelang mittels spezifischer Antikörper gegen p23 (M2) und p24 (Elfriede). (B) Zellen wurden für 3h mit dem jeweils angegebenen Sphingosin-Derivat markiert und anschließend für 5min mit UV-Licht bestrahlt. (C) Nach einer Inkubationszeit von 5h mit Fumonisin B₁ folgte für 3h die Markierung mit D-erythro-photoSph in Gegenwart des Inhibitors. (D) Zellen wurden für 1h mit einem PDMP-BSA-Komplex in lipiddefizientem α MEM inkubiert. Es folgte die Zugabe von D-erythro-photoSph zum Medium und eine weitere Inkubation von 3h.

4.4 Charakterisierung von [³H]-D-erythro-photoSph als Lipidvorläufer für photoaktivierbare Sphingolipide

Die Einführung der photoaktivierbaren Diazerin-Gruppe und somit chemische Modifizierung des Sphingolipidvorläufers D-erythro-Sphingosin könnte zur Folge haben, dass sich D-erythro-photoSph nicht wie sein natürliches Analogon verhält. Deshalb musste untersucht werden, ob D-erythro-photoSph von der Zelle aufgenommen wird und ob D-erythro-photoSph sowie die daraus gebildeten Folgeprodukte von den Enzymen der Sphingolipidbiosynthese und der hierfür benötigten Transportmaschinerie erkannt werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die photoaktivierbare Gruppe einen Einfluss auf die Verteilung photolabiler Sphingolipide in Mikrodomänen hat. Dass es sich bei dieser neuartigen Verbindung um ein geeignetes Werkzeug zur Studie von Protein-Sphingolipid-Interaktionen handelt, sollte anhand von Proteinen, welche eine hohe Affinität zu Sphingolipiden aufweisen, demonstriert werden.

4.4.1 Aufnahme von [³H]-D-erythro-photoSph

Um zu überprüfen, ob [³H]-D-erythro-photoSph von Zellen aufgenommen wird, wurden CHO-Zellen für 3h mit 6µM (1,2mCi) [³H]-D-erythro-photoSph markiert. Die Abbildung 15 zeigt das Ergebnis einer Aktivitätsmessung des Mediums jeweils vor bzw. nach der Markierung. Ebenso ist die im Lysat ermittelte Aktivität angegeben. 70% der eingesetzten Radioaktivität konnten nach 3h im Medium nachgewiesen werden. Im Zelllysat wurden ca. 30% der Radioaktivität detektiert.

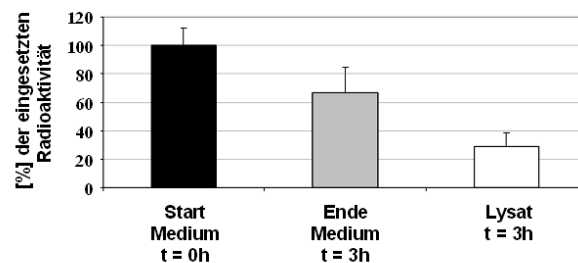


Abbildung 15. Aufnahme des [³H]-D-erythro-photoSph von CHO-Zellen. Eine konfluent bewachsene 10cm Schale CHO-Zellen wurde für 3h in delipidiertem α -MEM mit 6µM (1,2mCi) [³H]-D-erythro-photoSph markiert. Angegeben ist die prozentuale Radioaktivität des Mediums vor und nach Markierung sowie die im Zelllysat ermittelte Radioaktivität.

4.4.2 Metabolisierung von [³H]-D-erythro-photoSph im Vergleich zu [³H]-D-erythro-Sphingosin

Um zu überprüfen, ob [³H]-D-erythro-photoSph wie [³H]-D-erythro-Sphingosin zur Markierung von Sphingolipiden eingesetzt werden kann, wurden CHO-Zellen mit jeweils

einer der beiden Verbindungen markiert und nach definierten Zeiten aufgearbeitet. Die Konzentration der Sphingolipidvorläufer betrug dabei $0,1\mu\text{M}$. Es folgte das Waschen der Zellen und die Isolierung der Lipide mit einer methanolischen Lipidextraktion (6.8). Nach Bestimmung der Aktivitäten der Lipidextrakte wurden gleiche Mengen an Radioaktivität ($0,025\mu\text{Ci}$) zur Analyse mittels Dünnschichtchromatographie eingesetzt (Abbildung 16). Die Detektion radioaktiv markierter Lipide erfolgte durch digitale Autoradiographie mit dem betaImager 2000 der Firma Biospace, Paris. Es konnte gezeigt werden, dass $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph ähnlich wie sein natürliches Analogon D-erythro-Sphingosin metabolisiert wird. Bei der in Abbildung 16 mit einem Stern markierten Bande könnte es sich um Ceramidphosphorylethanolamin handeln (Daten nicht gezeigt).

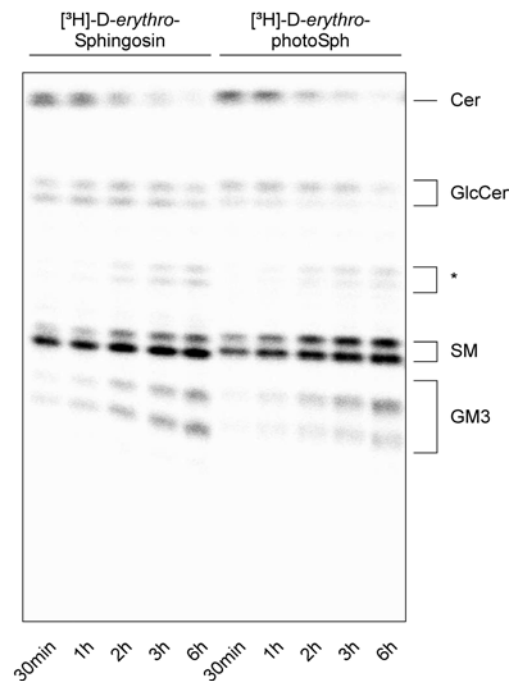


Abbildung 16. Lipidanalyse von CHO-Zellen nach Markierung mit $[^3\text{H}]$ -D-erythro-Sphingosin bzw. $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph. Markierung von 3cm-Schalen CHO-Zellen mit den angegebenen Lipidvorläufern. Die Konzentration betrug $0,1\mu\text{M}$ ($4\mu\text{Ci}/\text{Schale}$). Nach der angegebenen Zeit wurden die Zellen auf Eis überführt, die Lipide extrahiert und die Radioaktivität der Lipidextrakte bestimmt. Die Auftrennung von je $0,025\mu\text{Ci}$ des Lipidextraktes erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v). Der Nachweis radioaktiv markierter Lipide erfolgte durch digitale Autoradiographie.

4.4.3 Massenspektrometrische Analyse von photoaktivierbarem Sphingomyelin

Die ähnlichen Muster radioaktiv markierter Lipide nach Fütterung von [³H]-D-*erythro*-photoSph und [³H]-D-*erythro*-Sphingosin in Abbildung 16 deuten darauf hin, dass D-*erythro*-photoSph ähnlich seinem natürlichen Analogon Sphingosin verstoffwechselt wird. Um zu beweisen, dass D-*erythro*-photoSph zu photoaktivierbaren Sphingolipiden wie z.B. photoaktivierbarem SM (photoSM) metabolisiert wird, wurden CHO-Zellen für 3h mit 6µM D-*erythro*-photoSph markiert. Anschließend erfolgte eine Lipidextraktion von ca. 10x10⁶ Zellen und nach Spaltung der Glycerolipide mittels ammoniakalischer Hydrolyse die Auftrennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie. Nicht photoaktivierbare Lipidstandards dienten zur Abschätzung des Migrationsverhaltens photoaktivierbarer Sphingolipide. Anschließend wurden die Lipide aus dem Kieselgel durch eine Lipidextraktion nach Bligh und Dyer extrahiert (6.10) und durch nano-Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (nano-ESI-MS/MS) bestimmt. Dabei fand eine Scantechnik Verwendung (+PAR 184), die Vorläuferionenspektren von Cholinphosphat-haltigen Lipiden (PC und SM) liefert. Aufgrund der ammoniakalischen Behandlung sowie der Auftrennung des Lipidextraktes mittels Dünnschichtchromatographie sind die Signale ausschließlich auf SM-Spezies zurückzuführen. Abbildung 17A zeigt das Spektrum von 3h lang in delipidiertem αMEM-Medium gehaltenen Zellen. Es wies keine Unterschiede zu Spektren von Zellen auf, die in normalem Wachstums-Medium gehalten wurden (Daten nicht gezeigt). Durch Zugabe von 6µM D-*erythro*-photoSph zum Medium konnten zwei neue Signale nachgewiesen werden, welche nach UV-Bestrahlung verloren gingen (Abbildung 17C). Bei den in Abbildung 17B hinzukommenden Signalen handelt es sich um photoSM 16:0 und photoSM 24:1.

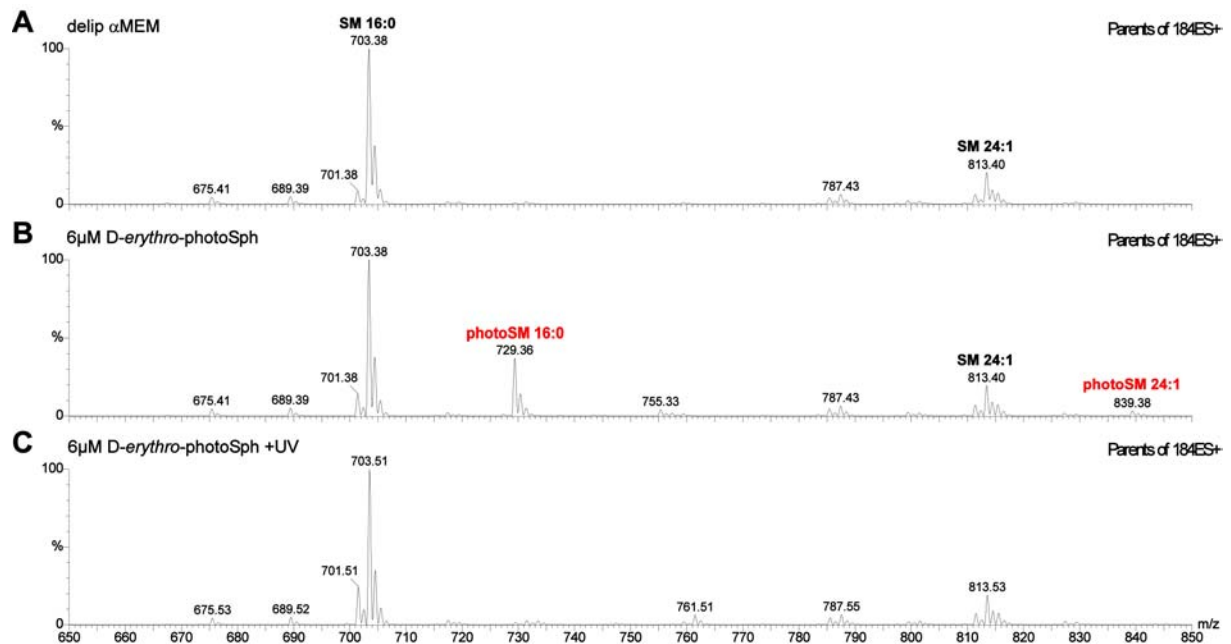


Abbildung 17. Vorläuferionenspektren (+PAR184) zum Nachweis von photoaktivierbaren SM-Spezies. (A) 10×10^6 CHO-Zellen wurden für 3h mit delipidiertem α -MEM-Medium bzw. (B) in delipidiertem α -MEM-Medium mit $6 \mu\text{M}$ D-erythro-photoSph inkubiert. Nach Extraktion der Lipide und Spaltung von Glycerolipiden durch ammoniakalische Hydrolyse wurden die Lipide durch Dünnschichtchromatographie voneinander getrennt. Nicht photoaktivierbare Lipidstandards ermöglichten die Abschätzung des Migrationsverhaltens photoaktivierbarer Sphingolipide. Nach Extraktion der Lipide aus dem Kieselgel erfolgte die massenspektrometrische Untersuchung. (C) Spektrum von B nach UV-Bestrahlung.

4.4.4 Sphingomyelinase Verdau von photoaktivierbarem Sphingomyelin

Um zu untersuchen, ob die in Abbildung 16 mit SM gekennzeichneten Banden ausschließlich auf photoaktivierbare SM-Derivate zurückzuführen sind, wurden Lipidextrakte mit Sphingomyelinase (SMase) behandelt. Dieses Enzym spaltet die Kopfgruppe von SM unter Bildung von Ceramid und Cholinphosphat ab. Nach Behandlung von Lipidextrakten mit SMase wurden diese über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und radioaktive Lipide durch digitale Autoradiographie analysiert (Abbildung 18A). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der einzelnen Banden mit der β Vision-Software der Firma Biospace. Die Signalintensität der mit SM gekennzeichneten Banden nahm dabei in 30min um ca. 50% ab (Abbildung 18B). Die Abnahme der Signalintensität von SM korreliert mit einem Anstieg der

Intensität von $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoCer. Höhere Konzentrationen an SMase führten zum vollständigen Verdau der mit SM gekennzeichneten Banden (Daten nicht gezeigt). Damit konnte nachgewiesen werden, dass die mit SM gekennzeichneten Banden ausschließlich auf SM-Spezies zurückzuführen sind.

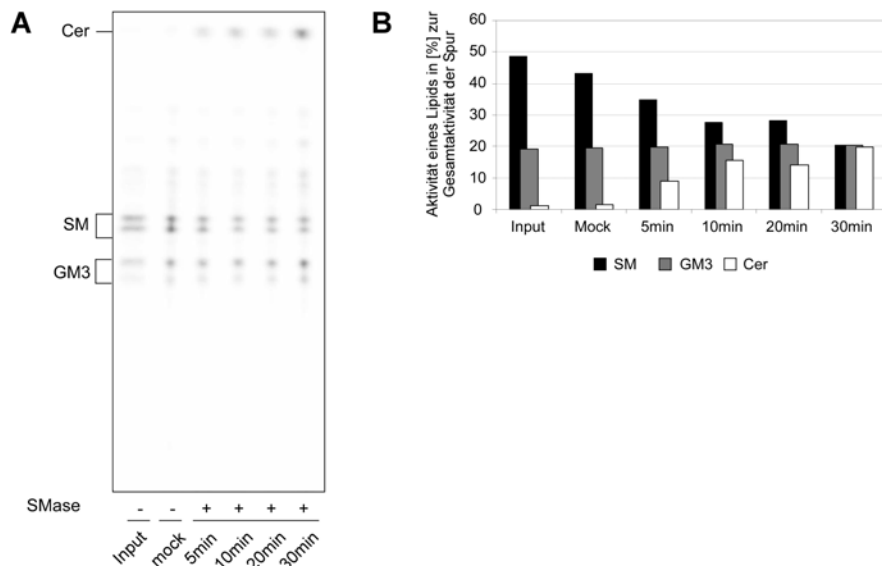


Abbildung 18. Sphingomyelinase-Verdau von Lipidextrakten nach $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph Markierung. 5×10^6 CHO-Zellen wurden für 6h mit $1 \mu\text{M}$ ($200 \mu\text{Ci}$) $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph markiert und deren Lipide extrahiert. Es folgte der Verdau von $0,5 \mu\text{Ci}$ des Lipidextraktes. Dazu wurde das Lösungsmittel bei RT entfernt, der Rückstand in $25 \mu\text{l}$ $0,1 \text{M}$ Tris pH 8 aufgenommen und 10^{-3} units SMase (Sigma) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C wurden $0,05 \mu\text{Ci}$ des Ansatzes über Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v) aufgetrennt. (A) Digitale Autoradiographie der Dünnschichtchromatographie-Platte. (B) Quantifizierung der einzelnen Banden.

4.4.5 Analyse des Einbaus von $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph in unterschiedliche Sphingolipide

Will man eine Protein-Sphingolipid-Interaktion mit Hilfe von $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph untersuchen, so ist von entscheidender Bedeutung, dass zur Zeit der Kreuzvernetzung ein Maximum des jeweiligen photoaktivierbaren Sphingolipids vorliegt. Durch unterschiedliche Inkubationszeiten mit $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph konnte die Metabolisierung von $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph verfolgt und somit dessen Einbau in die unterschiedlichen Sphingolipide

analysiert werden. Dazu wurden die Zellen nach angegebener Zeit auf Eis überführt und deren Lipide extrahiert. Es folgte die Auftrennung der Lipidextrakte mittels Dünnschichtchromatographie. Radioaktiv markierte Lipide wurden durch digitale Autoradiographie detektiert (Abbildung 19A). Die Quantifizierung erfolgte mit der β Vision-Software. Zunächst wurde das Verhältnis der für eine Bande detektierten Ereignisse zu denen einer gesamten Spur ermittelt. Multiplikation dieses Verhältnisses mit der durch die Flüssigscintillationszählungen bestimmten Radioaktivität des Lipidextraktes ergab die Aktivität eines photoaktivierbaren Sphingolipids zu einem bestimmten Zeitpunkt (Abbildung 19C). Den Anstieg der Gesamtradioaktivität der einzelnen Lipidextrakte zeigt Abbildung 19B.

Kürzere Inkubationszeiten ergaben einen vermehrten Einbau in Cer, während längere Markierungen zu photoSM bzw. photoaktivierbaren glycosilierten Sphingolipiden wie Glucosylceramide (GlcCer) sowie dem Gangliosid GM3 führten.

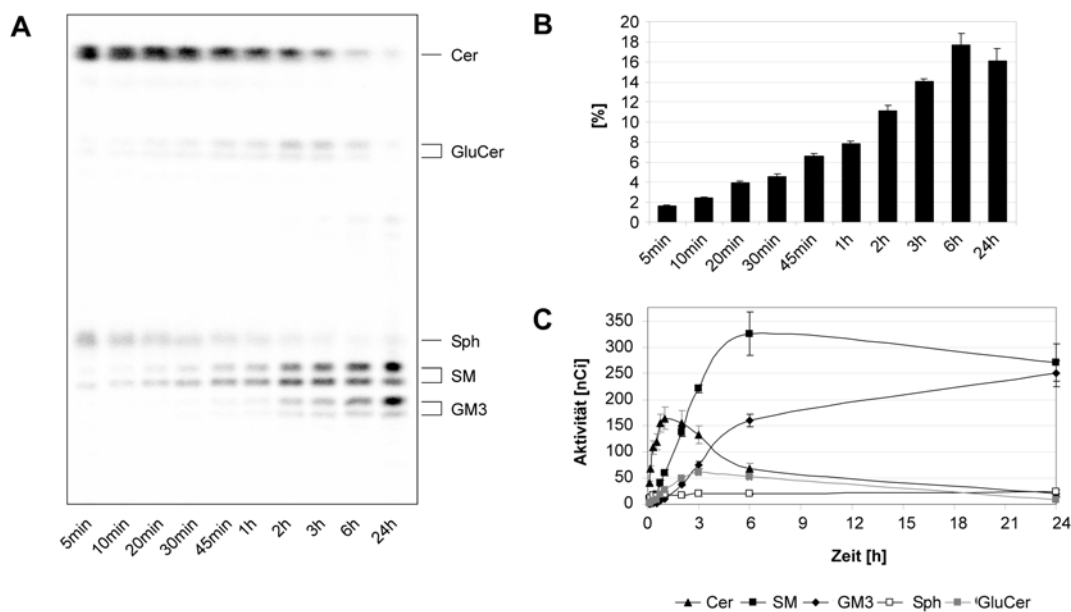


Abbildung 19. Einbau und Metabolisierung von $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph in CHO-Zellen. Markierung von CHO-Zellen (3cm-Schalen) mit $0,1\mu\text{M}$ ($4\mu\text{Ci}$) $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph in delipidiertem α -MEM-Medium. Extraktion der Lipide und deren Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v). Dabei wurden jeweils $0,025\mu\text{Ci}$ des Lipidextraktes aufgetragen. Nicht photoaktivierbare Lipidstandards erlaubten eine Zuordnung der Signale. (A) Digitale Autoradiographie der Dünnschichtchromatographie-Platte (acquisition time, 12h). (B) Prozentualer Anteil der Radioaktivität in den Lipidextrakten bezogen auf $4\mu\text{Ci}$ (n=3). (C) Quantitative Analyse einzelner Sphingolipide zu verschiedenen Zeitpunkten (n=3).

Auf die gleiche Weise wie für CHO-Zellen beschrieben, wurde der Einbau von [^3H]-D-*erythro*-photoSph auch in COS7-, sowie MEB4- und GM95-Zellen untersucht. Das Ergebnis für COS7-Zellen ist in Abbildung 20 zusammengefasst. Aus der Dünnschichtchromatographie kann man erkennen, dass [^3H]-D-*erythro*-photoSph ähnlich wie in CHO-Zellen metabolisiert wurde. Auffallend unterschiedlich ist die Intensitätsverteilung der beiden für lang- und kurzkettige SM-Spezies typischen Banden sowie die im Vergleich zu CHO-Zellen verminderte *de novo* Synthese von GM3. Stattdessen treten zwei neue Banden auf, welche wahrscheinlich den Gangliosiden GM2 und GM3 zuzuordnen sind.

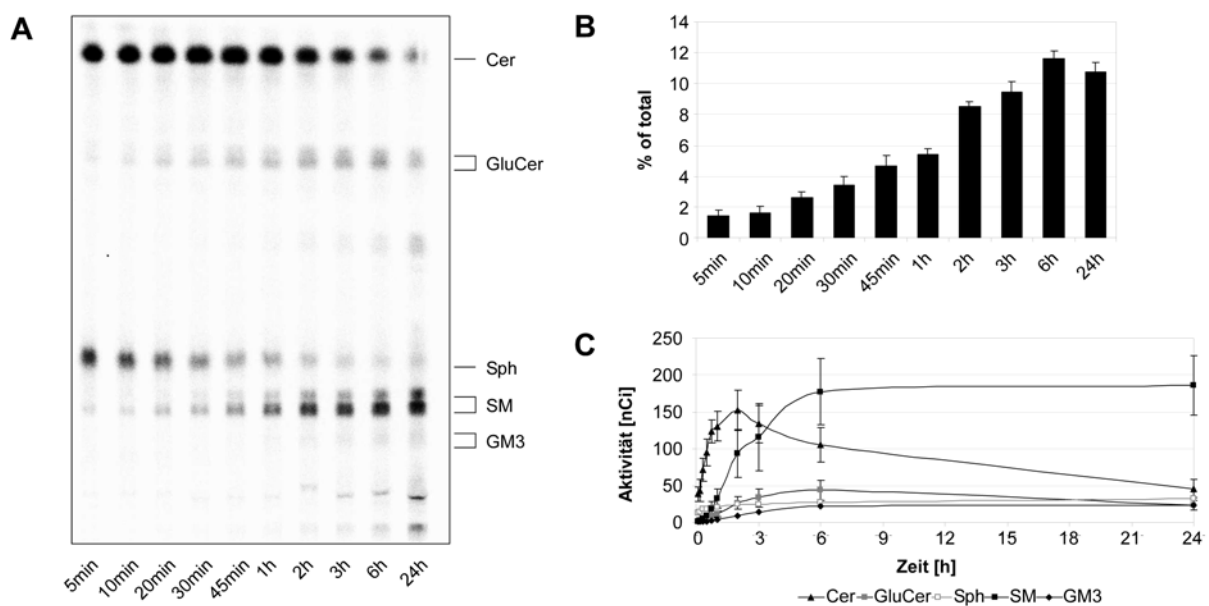


Abbildung 20. Einbau und Metabolisierung von [^3H]-D-*erythro*-photoSph in COS7-Zellen. 3cm-Schalen COS7-Zellen wurden für die angegebene Zeit in delipidiertem α -MEM-Medium mit $0,1\mu\text{M}$ ($4\mu\text{Ci}$) [^3H]-D-*erythro*-photoSph gehalten. Nach Extraktion der Lipide erfolgte die Auftrennung der Lipidextrakte ($0,025\mu\text{Ci}$) mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v). (A) Digitale Autoradiographie der Dünnschichtchromatographie-Platte (acquisition time, 12h). (B) Prozentuale Aktivität der Lipidextrakte bezogen auf die zur Markierung eingesetzte Aktivität ($n=3$). (C) Quantitative Analyse einzelner Sphingolipide zu verschiedenen Zeitpunkten ($n=3$).

Bei Untersuchungen der Stoffwechselprodukte von [^3H]-D-*erythro*-photoSph in MEB4-Zellen und den verwandten Glycosphingolipid-defizienten GM95-Zellen konnten nur bei ersterer zusätzliche Banden beobachtet werden (Ichikawa et al. 1994; Sprong et al. 2001). GM95-Zellen fehlt die Ceramid-Glucosyltransferase. Somit können sie kein GlcCer und die daraus

entstehenden glycosylierten Sphingolipide synthetisieren. Die in Abbildung 21 zusätzlich auftretenden Banden sind folglich auf glycosylierte Sphingolipide zurückzuführen.

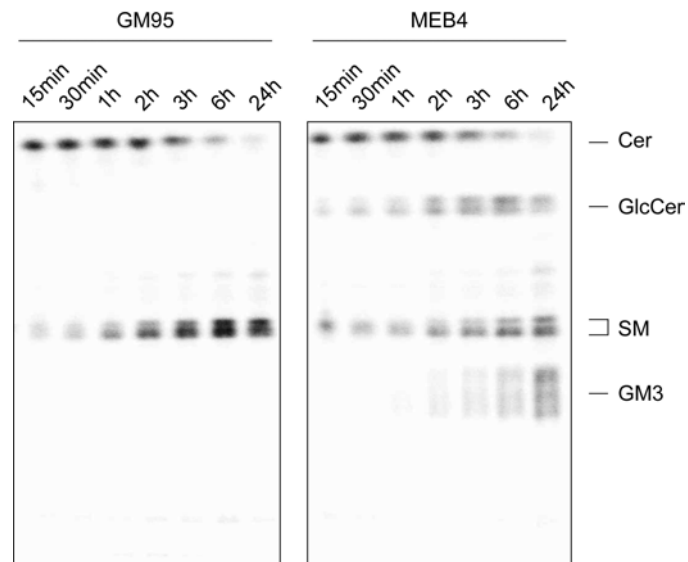


Abbildung 21. Vergleich radioaktiv markierter Sphingolipide nach Markierung von GM95- bzw. MEB4-Zellen mit [^3H]-D-erythro-photoSph. 3cm-Schalen GM95- bzw. MEB4-Zellen wurden für die angegebene Zeit in delipidiertem α -MEM-Medium mit $0,1\mu\text{M}$ ($4\mu\text{Ci}$) [^3H]-D-erythro-photoSph gehalten. Nach Extraktion der Lipide erfolgte deren Auftrennung ($0,025\mu\text{Ci}$ pro Spur) mittels Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v). Detektion mittels digitaler Autoradiographie (acquisition time, 3,5h). Repräsentativ für das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten.

4.5 Nachweis von photoaktivierbaren Sphingolipiden in DRM

Um zu untersuchen, ob die photoaktivierbare Gruppe einen Einfluss auf die Verteilung von photoaktivierbaren Sphingolipiden in Mikrodomänen hat, wurden CHO-Zellen nach Markierung mit [³H]-D-*erythro*-photoSph in einem Lyse-Puffer mit 1% Triton X-100 bei 4°C extrahiert und schließlich mit einem Glaspotter homogenisiert. Die Trennung von DRM von den in Detergens löslichen Membranen erfolgte durch Flotation in einem Optiprep-Gradienten. Die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen wurde durch Flüssigszintillations-Messung bestimmt (Abbildung 22A). Die in der DRM-Fraktion gefundene Aktivität variierte in Abhängigkeit der Markierungsdauer: Bei Inkubation für 6h, konnten $15,9 \pm 0,9\%$ der Gesamtaktivität in Fraktion 2 ermittelt werden (Abbildung 22A), während nach 24h der Prozentsatz nur noch $9,4 \pm 1,4\%$ betrug (Daten nicht gezeigt).

Nach Auftrennung der Proteine der einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE folgte die Charakterisierung der einzelnen Fraktionen mittels Western Blot (Abbildung 22B). Hierzu dienten Antikörper gegen Flotillin (DRM-Marker) und p23 (Marker für die in Detergens löslichen Membranen, s. 4.1).

Lipidextrakte der einzelnen Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und radioaktive photoaktivierbare Sphingolipide durch digitale Autoradiographie detektiert (Abbildung 22C). Eine Quantifizierung der in Abbildung 22C mit SM gekennzeichneten Banden ergab, dass 21% des gesamten [³H]-photoSMs DRM-assoziiert (Fraktion 2) vorlag, während die löslichen Fraktionen (7 und 8) 38% bzw. 33% des [³H]-photoSM aufwiesen. Die Verteilung von endogenem SM wurde in einem parallel durchgeführten Ansatz mittels quantitativer Massenspektrometrie (nano-ESI-MS/MS) bestimmt (Brugger et al. 2000). Dabei wurden 34% in Fraktion 2 und 25% bzw. 21% in den Fraktionen 7 und 8 detektiert (Daten nicht gezeigt).

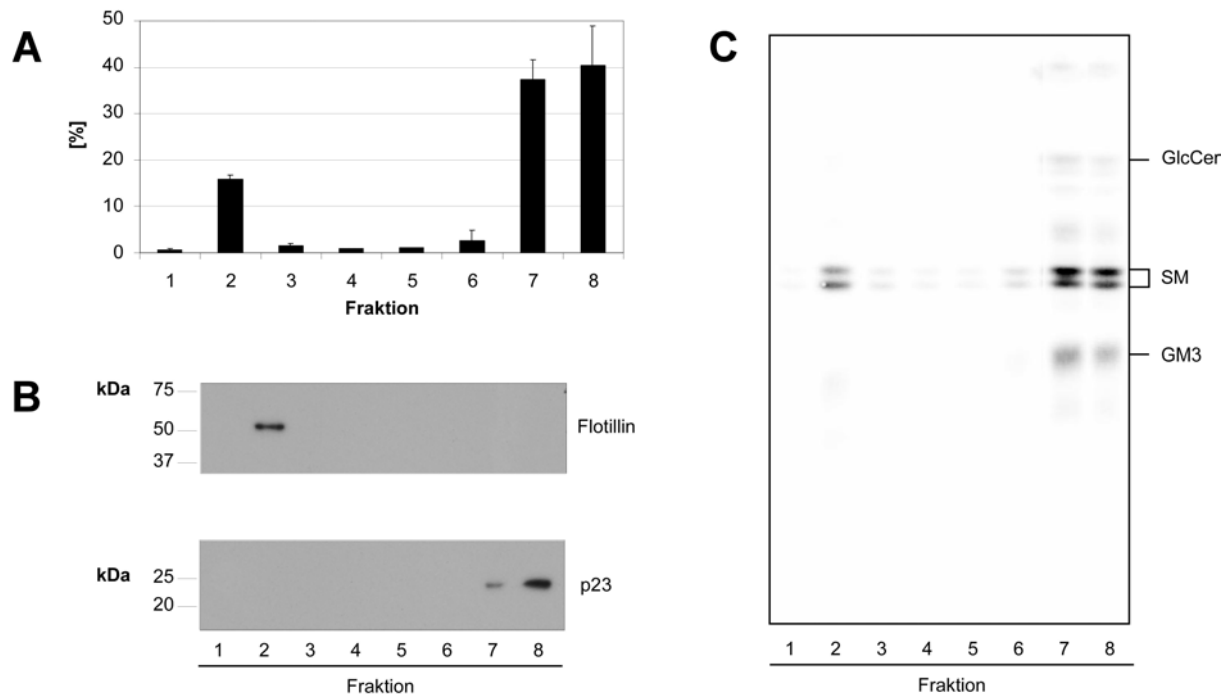


Abbildung 22. Photoaktivierbare Sphingolipide ähneln ihren natürlichen Analoga durch ihre Präsenz in DRMs. Nach Markierung von 2 10cm-Schalen CHO-Zellen für 6h mit jeweils 200 μ Ci (1 μ M) [3 H]-D-erythro-photoSph erfolgte die Isolierung von DRMs von den in Detergens löslichen Membranen mittels Flotation in einem Optiprep-Gradienten. **(A)** Prozentuale Verteilung der Radioaktivität über den Gradienten (n=2). **(B)** Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (16%-Lämmli) voneinander getrennt und mittels Western Blot analysiert. **(C)** Nach Extraktion der Lipide erfolgte deren Auftrennung über Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v). Die Visualisierung radioaktiv markierter Lipide erfolgte durch digitale Autoradiographie.

Eine Quantifizierung der beiden in Abbildung 22C mit SM gekennzeichneten Banden ergab, dass kurzkettiges photoSM (untere Bande) im Gegensatz zu langkettigem photoSM (obere Bande) bevorzugt in den DRMs vorzufinden ist. Durch quantitative Massenspektrometrie konnte auch für endogene SM-Spezies eine Präferenz für SM 16:0 gegenüber SM 24:1 in den DRMs festgestellt werden. Eine Übersicht über die Verhältnisse von lang- zu kurzkettigen photoaktivierbaren SM-Spezies in den einzelnen Fraktionen nach unterschiedlichen Markierungszeiten ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Verhältnis von lang- zu kurzkettigem photoSM bzw. SM.

Fraktion	Autoradiographie			nano-ESI MS/MS		
	2	7	8	2	7	8
3h	1,07	1,88	1,93	-	-	-
6h	0,67±0,00	1,31±0,17	1,44±0,13	0,26	0,65	0,64
24h	0,43±0,04	1,15±0,24	1,12±0,21	-	-	-

Eine exponentielle Darstellung der in Abbildung 22C abgebildeten Dünnschichtchromatographie zeigte, dass neben photoSM auch geringe Mengen an photoaktivierbarem GM3, GlcCer und Cer in Fraktion 2 vorlagen (nicht gezeigt). Die Quantifizierung ergab die in Tabelle 2 angegebene prozentuale Verteilung des jeweiligen photoaktivierbaren Sphingolipids.

Tabelle 2. Verteilung von photoaktivierbaren Sphingolipiden in DRMs (Fraktion 2) sowie in Detergens löslichen Fraktionen (Fraktion 7 und 8). CHO-Zellen wurden für 6h bzw. 24h mit [³H]-D-*erythro*-photoSph markiert.

Fraktion	6h			24h		
	2	7	8	2	7	8
Cer	5,5±2,3	37,5±3,2	48,0±10,1	7,3±6,4	42,8±10,5	35,1±6,9
GluCer	7,8±0,1	42,8±8,1	44,0±11,6	8,9±3,1	42,5±7,8	33,6±3,0
SM	20,2±1,3	34,8±2,6	39,0±6,2	12,1±1,6	42,5±2,9	36,3±0,3
GM3	9,0±0,8	43,9±8,7	42,9±12,4	5,2±0,1	48,3±1,4	40,0±0,4

Es konnte gezeigt werden, dass photoaktivierbares SM, wie sein natürliches Analogon, DRM-assoziert vorliegt.

4.6 Vergleich des Einbaus einzelnen Lipidvorläufer

Um differenzieren zu können, ob ein Protein mit PC, Cholesterin oder einem Sphingolipid interagiert, wurden Zellen mit [^3H]-Cholin/10-ASA, [^3H]-photoChol und [^3H]-D-*erythro*- bzw. [^3H]-L-*threo*-photoSph markiert. Abbildung 23 zeigt beispielhaft Lipidanalysen von Zellen, welche zuvor mit einem dieser Lipidvorläufer markiert wurden.

Bei der Synthese von [^3H]-photoSph entstehen die beiden Diastereomere [^3H]-D-*erythro*-photoSph und [^3H]-L-*threo*-photoSph. Die beiden Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch ihre Konfiguration am Kohlenstoffatom C3. Sowohl Sphingamin, das bei der *de novo* Synthese von Sphingolipiden aus Serin und Palmitoyl-CoA entsteht, als auch Sphingosin, das beim Abbau von Sphingolipiden gebildet wird, sind geeignete Lipidvorläufer der Sphingolipid-Biosynthese. Markierungsexperimente mit [^3H]-L-*threo*-Sphingamin zeigten, dass diese Verbindung ein Vorläufermolekül bei der Biosynthese von SM darstellt. Im Gegensatz zu [^3H]-D-*erythro*-Sphingamin wurde sein Diastereomer [^3H]-L-*threo*-Sphingamin jedoch nicht zu glycosylierten Sphingolipiden umgesetzt (Venkataraman et al. 2001). Mit diesen für [^3H]-L-*threo*-Sphingamin beobachteten Ergebnissen steht in Einklang, dass [^3H]-L-*threo*-photoSph zu Cer und SM, jedoch nicht zu GlcCer und höher glycosylierten Sphingolipiden metabolisiert werden konnte (Abbildung 23A).

Das bei 10-ASA/[^3H]-Cholin-Markierungen von der Zelle aufgenommene [^3H]-Cholin ging hauptsächlich in die Biosynthese von PC ein. Ein geringerer Anteil des Cholins konnte in SM nachgewiesen werden (Abbildung 23A). Markierungen von COS7-Zellen mit radioaktiver Stearinsäure zeigten, dass diese in die unterschiedlichsten Lipidklassen (PC, PI und PE) inkorporiert wurden (Kuerschner et al. 2005). Ein Einbau von radioaktiver Stearinsäure in SM war nicht zu beobachten (Kuerschner et al. 2005). Analog dazu wiesen ESI-MS/MS-Analysen von Lipidextrakten aus Zellen, welche für 18h mit 100 μM 10-ASA gefüttert wurden, photoaktivierbare Derivate von PC, PI und PE auf (Haberkant 2003). Photoaktivierbare SM-Spezies konnten nach Inkubation mit 10-ASA nicht beobachtet werden (Haberkant 2003 sowie persönliche Mitteilung von Christoph Thiele, MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden). Zusammenfassend bedeutet dies, dass bei einer Markierung von Zellen mit 10-ASA/[^3H]-Cholin davon auszugehen ist, dass nach Kreuzvernetzung durch UV-Licht, radioaktiv markierte Proteine auf Protein-PC-Interaktionen zurückzuführen sind (Thiele et al.

2000). In den folgenden Abbildungen wird für Markierung mit 10-ASA/[³H]-Cholin daher die Abkürzung photoPC verwendet.

Für Fütterungsexperimente mit M β CD-komplexiertem [³H]-photoChol wurde nach Lipidextraktion neben [³H]-photoChol ein Stoffwechselprodukt beobachtet, bei dem es sich wahrscheinlich um Ester des [³H]-photoChol handelt.

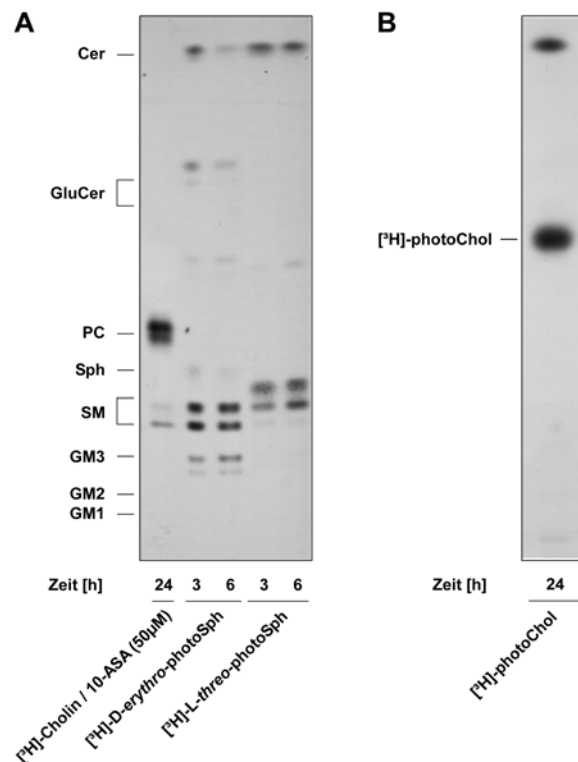


Abbildung 23. Analyse radioaktiv markierter Lipide nach Fütterung von CHO-Zellen mit den jeweils angegebenen Lipidvorläufern. Die Aktivität der eingesetzten radioaktiven Verbindung betrug 200 μCi. Der Markierung folgte die Extraktion der Lipide und die Auftrennung von 0,05 μCi des jeweiligen Lipidextraktes durch Dünnschichtchromatographie. Nach Besprühen der Dünnschichtchromatographie-Platte mit einer Verstärkerlösung (NAMP-100, Amersham) erfolgte die Detektion radioaktiv markierter Lipide durch einen Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham). (A) Gezeigt ist die Auftrennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel CHCl₃/MeOH/H₂O (65:25:4, v/v). (B) Auftrennung mit dem Laufmittel Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v).

4.7 *in vivo* Interaktionen von Lipiden mit Proteinen

Es sollte untersucht werden, ob es sich bei [³H]-D-*erythro*-photoSph um eine geeignete Verbindung zum Nachweis von Protein-Sphingolipid-Interaktionen handelt. Hierzu wurden Zellen nach Fütterung mit den entsprechenden Lipidvorläufermolekülen mit UV-Licht bestrahlt. Dabei wird durch Abspaltung von Stickstoff die photoaktivierbare Diazerin-Gruppe in ein hochreaktives Carben überführt, welches durch Ausbildung einer kovalenten Bindung mit seiner unmittelbaren Nachbarschaft kreuzvernetzt wird. Die auf diese Weise kreuzvernetzten Proteine können über SDS-PAGE voneinander getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Protein-Lipid-Interaktionen werden anschließend durch digitale Autoradiographie detektiert.

4.7.1 Photochemische Markierung von CERT mit [³H]-D-*erythro*-photoSph

Es sollte untersucht werden, ob es sich bei [³H]-D-*erythro*-photoSph um eine geeignete Verbindung zur Studie von Protein-Sphingolipid-Interaktionen handelt. Hierzu sollte der Ceramid-Transporter CERT herangezogen werden. CERT vermittelt den nicht-vesikulären Transport von Cer innerhalb der Zelle (Hanada et al. 2003). Die Biosynthese von Cer findet am ER statt. Von dort wird Cer mittels CERT zum Golgi transportiert, wo es entweder zu SM, GlcCer bzw. zu komplex glycosylierten Sphingolipiden umgesetzt wird.

Um zu zeigen, dass [³H]-D-*erythro*-photoSph zur radioaktiven Markierung von CERT herangezogen werden kann, wurden COS7-Zellen transient mit CERT-FLAG kodierender cDNA transfiziert. Bei FLAG handelt es sich um eine Signalsequenz mit 8 Aminosäuren. Photoaffinitäts-Markierungen erfolgten in delipidiertem α -MEM-Medium, supplementiert mit 10-ASA/[³H]-Cholin, M β CD-komplexiertes [³H]-photoChol oder [³H]-D-*erythro*- bzw. [³H]-L-*threo*-photoSph (6.6). Nach UV-Bestrahlung der Zellen wurden diese lysiert und die Lysate im Anschluss zur Immunpräzipitation eingesetzt. Hierzu diente ein gegen das FLAG-Epitop gerichteter Antikörper. Nach Auftrennung der Zell-Lysate und Immunpräzipitate durch SDS-PAGE erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. Zur Überprüfung der Expression von CERT-FLAG und dessen Immunpräzipitation wurde die PVDF-Membran mit dem bereits in der Immunpräzipitation eingesetzten anti-FLAG Antikörper entwickelt

(Abbildung 24B). Die Detektion radioaktiv markierter Proteine erfolgte durch digitale Autoradiographie (Abbildung 24A).

Da Aufnahme und Einbau der einzelnen Lipidvorläufer variieren, wurden unterschiedliche "Expositionszeiten" (*acquisition times*) verwendet. Diese ermöglichten die Darstellung einer identischen Anzahl an Ereignissen in der mit *Input +UV* gekennzeichneten Spur. Abbildung 24A zeigt, dass Proteine nach Markierung mit einem der jeweiligen Lipidvorstufen durch UV-Bestrahlung radioaktiv markiert werden können. Wie zu erwarten, konnte radioaktiv markiertes CERT ausschließlich nach Markierung mit [³H]-photoSph immunisoliert werden. Dies bestätigt die CERT-Sphingolipid-Interaktion unter *in vivo* Bedingungen und zeigt, dass [³H]-D-*erythro*-photoSph zur Analyse von Protein-Sphingolipid-Interaktionen verwendet werden kann.

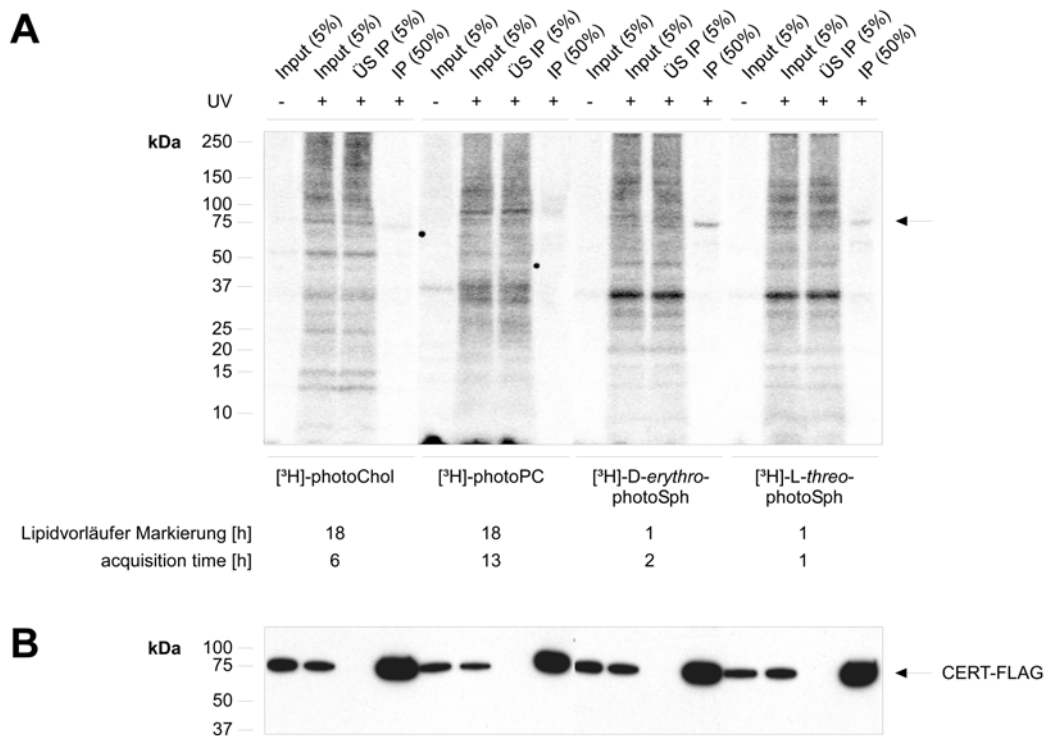


Abbildung 24. *In vivo* Interaktion von CERT mit einem Sphingolipid. COS7-Zellen wurden mit cDNA kodierend für CERT-FLAG transfiziert (6.5). 5h nach Transfektion erfolgte der Austausch des Mediums gegen delipidiertes DMEM-Medium mit M β CD-komplexiertem [³H]-photoChol bzw. 10-ASA/[³H]-Cholin. Bei den mit [³H]-D-erythro- und [³H]-L-threo-photoSph markierten Zellen wurde das Medium zunächst gegen DMEM-Medium mit 10% FKS und nach 17h gegen ein delipidiertes DMEM-Medium ausgetauscht, das mit [³H]-D-erythro- bzw. [³H]-L-threo-photoSph versetzt war. 23h nach Beginn der Transfektion erfolgte die Kreuzvernetzung. Die Immunpräzipitation gelang mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper. Zelllysate (Input), Immunpräzipitate (IP) sowie deren Überstände (ÜS IP) wurden mittels SDS-PAGE (10-20%, Invitrogen) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (**A**) Digitale Autoradiographie der PVDF-Membran. Zur Darstellung unterschiedlicher *Expositionszeiten* (hier: acquisition time) s. Text. (**B**) Western Blot Analyse mit einem gegen das FLAG-Epitop gerichteten Antikörper. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

4.7.2 Cytosolisches PI-TP β interagiert *in vivo* mit einem Sphingolipid

Die beiden Phosphoinositol (PI)-Transfer-Proteine PI-TP α und PI-TP β binden PI und PC (Wirtz 1997). Des Weiteren wurde für PI-TP β gezeigt, dass es *in vitro* eine hohe Affinität zu SM aufweist und dieses in einem liposomalem System zu transportieren vermag (Westerman

et al. 1995; Wirtz 1997). Ob PI-TP β eine derartige Funktion auch unter *in vivo* Bedingungen zugeschrieben werden kann, sollte überprüft werden. Dazu kamen CHO-Zellen zum Einsatz, welche mit cDNA kodierend für PI-TP α -V5 und PI-TP β -V5 transfiziert waren. 20h nach Transfektion wurden die Zellen für 9-12h mit [3 H]-D-erythro-photoSph markiert, UV-bestrahlt, lysiert und PI-TP α / β mit einem gegen das V5-Epitop gerichteten Antikörper immunisoliert (Abbildung 25). Die Quantifizierung der Banden ergab im Vergleich zu PI-TP α eine ungefähr 8mal höhere Affinität von PI-TP β zu einem Sphingolipid. Hiermit konnte erstmals eine Interaktion von PI-TP β mit einem Sphingolipid unter *in vivo* Bedingungen nachgewiesen werden.

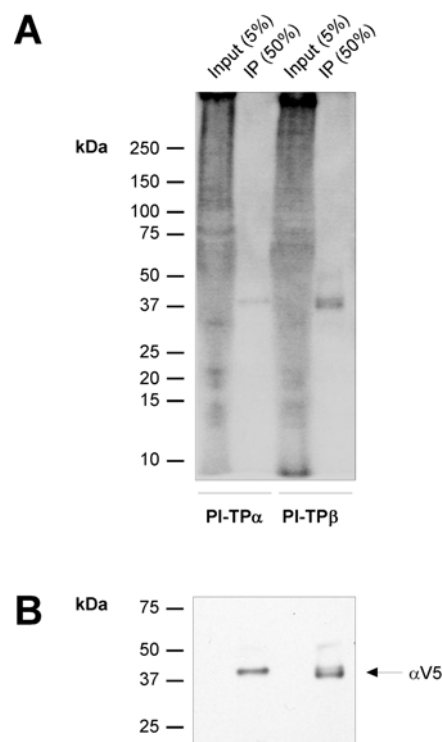


Abbildung 25. PI-TP β weist eine höhere Affinität zu Sphingolipiden als PI-TP α auf. CHO-Zellen wurden transient mit cDNA kodierend für PI-TP α bzw. PI-TP β transfiziert. 20h nach Beginn der Transfektion erfolgte die Markierung der Zellen für 12h mit 1 μ M (200 μ Ci) [3 H]-D-erythro-photoSph. Zur Immunisolierung von PI-TP α / β nach Kreuzvernetzung diente ein Antikörper gegen das V5-Epitop. (A) Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran konnten radioaktiv markierte Proteine mittels digitaler Autoradiographie nachgewiesen werden. (B) Western Blot Analyse mit einem gegen das V5-Epitop gerichteten Antikörper. Das Ergebnis ist exemplarisch für 3 unabhängige Experimente.

4.7.3 Die hohe Affinität von Caveolin-1 zu Cholesterin und Sphingolipiden

Caveolin-1 (Cav-1) ist eine Schlüsselkomponente bei der Bildung von Caveolae (Membraneinstülpungen in der Plasmamembran) und nimmt somit eine Rolle bei der Endocytose ein. Die Verankerung des Proteins mit der Membran wird dabei durch eine zentrale hydrophobe Domäne vermittelt, die sogenannte *hairpin*-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass Cav-1 Cholesterin bindet (Murata et al. 1995). Mit [³H]-photoChol konnte diese Interaktion *in vivo* bestätigt werden (Thiele et al. 2000). Die Protein-Muster nach [³H]-photoChol- bzw. [³H]-photoSph-Markierung und anschließender Kreuzvernetzung wiesen einige Ähnlichkeiten auf (Abbildung 26). In beiden Fällen war eine markante Bande im Bereich von 21-24kDa zu beobachten. Es ist bekannt, dass Cav-1 nicht nur eine Affinität zu Cholesterin aufweist, sondern auch zu den Gangliosiden GM1 (Fra et al. 1995) sowie GM3 (Chigorno et al. 2005). Daher sollte untersucht werden, ob es sich bei dem durch [³H]-photoSph radioaktiv markierten 21-24kDa großen Protein um Caveolin handelt. Es wurden CHO-Zellen mit den entsprechenden Lipidvorstufen markiert und nach UV-Bestrahlung die Zelllysate mit einem Antikörper gegen Cav-1 immunisoliert. Abbildung 26 zeigt, dass sowohl nach [³H]-photoChol - als auch nach [³H]-D-*erythro*- und [³H]-L-*threo*-photoSph - Markierung radioaktives Cav-1 immunisoliert werden konnte. Nach Fütterungen mit 10-ASA und [³H]-Cholin konnte kein radioaktiv markiertes Caveolin nachgewiesen werden. Dies ist in Einklang mit den von Thiele et al. gefundenen Ergebnissen (Thiele et al. 2000).

Dies zeigt, dass Cav-1 nicht nur eine hohe Affinität zu Cholesterin, sondern auch zu Sphingolipiden aufweist. Bei dem Experiment kamen CHO-Zellen zum Einsatz. Da CHO-Zellen kein GM1 aufweisen, kann die gefundene Interaktion nicht auf die von Fra et al. beschriebene Interaktion mit GM1 zurückzuführen sein (Fra et al. 1995). Da nach [³H]-L-*threo*-photoSph ebenfalls eine Markierung erfolgte, kann die Interaktion auch nicht von einem glycosylierten Sphingolipid herrühren sein.

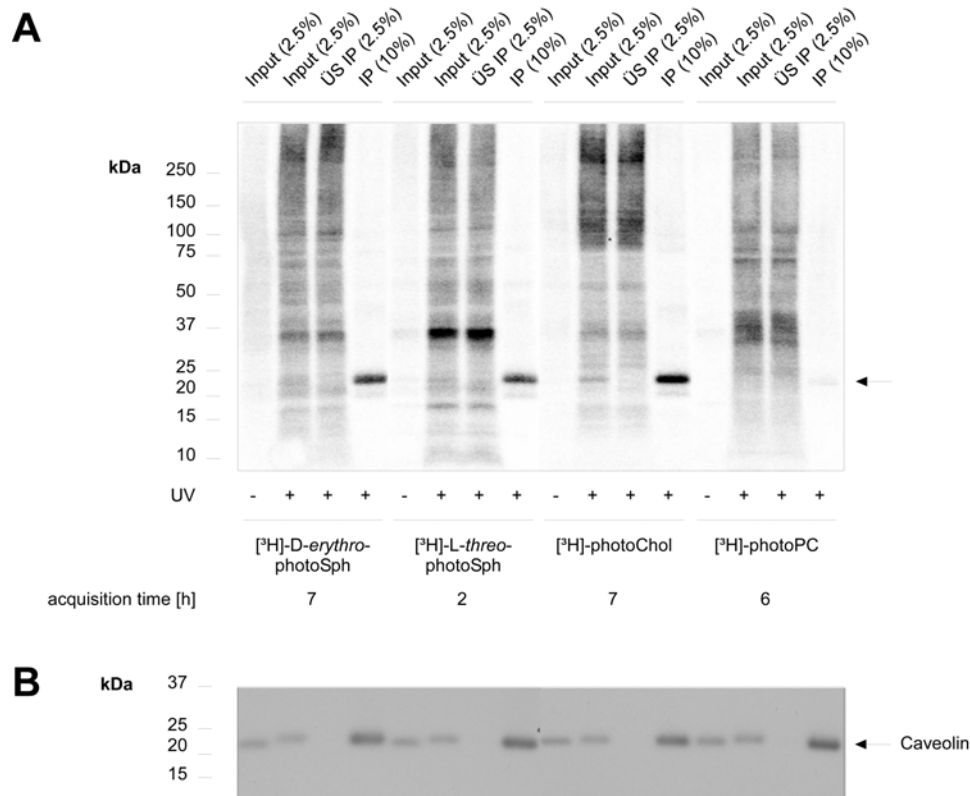


Abbildung 26. Interaktion von Caveolin mit Cholesterin und Sphingolipiden. CHO-Zellen wurden für 20h mit jeweils $200\mu\text{Ci}$ des angegebenen Lipidvorläufers inkubiert (von links nach recht: $[^3\text{H}]$ -D-*erythro*-photoSph, $[^3\text{H}]$ -L-*threo*-photoSph, M β CD-komplexiertes $[^3\text{H}]$ -photoChol und 10-ASA ($50\mu\text{M}$)/ $[^3\text{H}]$ -Cholin). Nach UV-Bestrahlung der Zellen und deren Lyse folgte die Immunpräzipitation von Caveolin. Zelllysat (Input), Immunpräzipitat (IP) sowie deren Überstände (ÜS IP) wurden über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. (A) Digitale Autoradiographie der PVDF-Membran. Zur Darstellung unterschiedlicher *Expositionszeiten* (acquisition time) s. 4.7.1. (B) Western Blot Analyse mit einem gegen Caveolin gerichteten Antikörper.

4.7.4 Detektion von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1

Die Analyse des mit einem Protein kreuzvernetzten Sphingolipids ist von großer Interesse. Daher sollte untersucht werden, ob GM1-bindende Proteine mit Hilfe von Cholera Toxin detektiert werden können. Die B-Untereinheit von Cholera-Toxin weist eine hohe Affinität zu der Kohlenhydrat Struktur des Gangliosids GM1 auf. Da CHO-Zellen im Gegensatz zu COS7-Zellen (s. Abschnitt 4.4.5) kein GM1 synthetisieren, wurden COS7-Zellen verwendet. Nach Fütterung für 24h mit $6\mu\text{M}$ D-*erythro*-photoSph wurde durch UV-Bestrahlung eine Kreuzvernetzung erzielt.

Für Cav-1 ist eine Interaktion mit dem Gangliosid GM1 beschrieben (Fra et al. 1995). Nach Zell-Lyse erfolgte die Anreicherung von Cav-1 mittels Immunpräzipitation, anschließend die Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE und deren Transfer auf eine PVDF-Membran. Den Nachweis von GM1-bindenden Proteinen lieferte die an Meerrettichperoxidase gekoppelte Untereinheit B von Cholera Toxin (Abbildung 27A). Dabei sind ein paar auffällige, nach UV-Bestrahlung hinzukommenden Banden durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Caveolin wurde auf einer zweiten Membran immundetektiert (Abbildung 27B).

Es konnte gezeigt werden, dass die photoaffinitäts Markierung mit *D-erythro*-photoSph und die anschließende Verwendung von Cholera Toxin eine Methode zum Nachweis von Protein-GM1-Interaktionen darstellt. Erste Versuche zeigten, dass eine Anreicherung von GM1-bindenden Proteinen mittels biotinyliertem Cholera Toxin möglich ist (Daten nicht gezeigt).

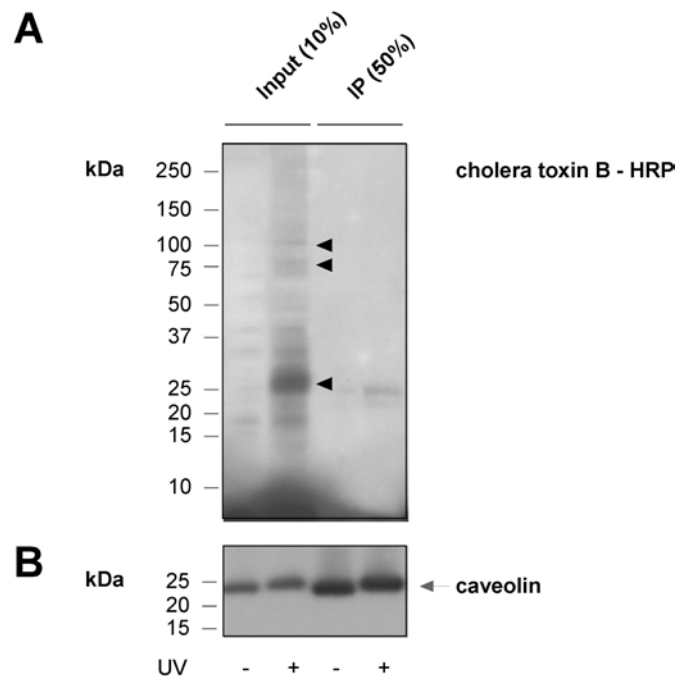


Abbildung 27. Analyse von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1. Nach Markierung einer 10cm-Schale COS7-Zellen für 24h mit $6\mu\text{M}$ *D-erythro*-photoSph erfolgte die Kreuzvernetzung. Die Immunisolierung von Cav-1 gelang mit einem spezifisch gegen Cav-1 gerichteten Antikörper. **(A)** Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (10-20%, Invitrogen) und deren Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis GM1-bindender Proteine über die Untereinheit B von Cholera Toxin mit kovalent gebundener Meerrettichperoxidase. **(B)** Cav-1 wurde auf einer zweiten Membran mit einem gegen Cav-1 spezifischen Antikörper detektiert.

4.8 Beteiligung von p24 an der Lipidsortierung in COPI-Vesikeln?

Es konnte gezeigt werden, dass [³H]-D-erythro-photoSph als Vorläufer für photoaktivierbare Sphingolipide fungiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass nach Markierung von Zellen mit photoaktivierbaren Lipidvorläufern und anschließender UV-Bestrahlung eine Kreuzvernetzung erzielt werden kann, welche die Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen unter *in vivo* Bedingungen ermöglicht. Die hier etablierte Methode sollte eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob es sich bei dem nach D-erythro-photoSph Markierung mit p24 beobachteten Crosslink-Produkt (s. 4.3) um ein Sphingolipid handelt.

4.8.1 Herstellung der Eichproteine p23 und p24 zur Quantifizierung

Zur Differenzierung, inwieweit eine radioaktive Markierung eines p24-Mitglieds nach Kreuzvernetzung als spezifische Interaktion zu bewerten ist, mussten zunächst p23- und p24-Eichprotein-Lösungen hergestellt werden. Dazu dienten Konstrukte, welche für p23 und p24 kodieren. In Abbildung 28 ist der Aufbau der rekombinanten Proteine skizziert.

Thioredoxin 11,7kDa	His tag 1,5kDa	Thrombin* 0,8kDa	S tag 2,5kDa	Faktor Xa* 0,7kDa	p23 21,7kDa	38,9kDa
Thioredoxin 11,7kDa	His tag 1,5kDa	Thrombin* 0,8kDa	S tag 2,5kDa	Faktor Xa* 0,7kDa	p24 22,7kDa	39,9kDa

Abbildung 28. Aufbau der Eichproteine p23 und p24. Zur Herstellung von rekombinatem p23 und p24 wurden Konstrukte, kodierend für die skizzierten Proteine, verwendet.

Es handelt sich dabei um Fusionsproteine mit Thioredoxin, getrennt durch eine Thrombinschnittstelle. Diese ist dabei von einer His- und einer S-Erkennungssequenz umrahmt. Das molekulare Gewicht der rekombinanten Proteine beträgt 38,9kDa für p23 und 39,9kDa für p24. Die Herstellung und Aufreinigung dieser Proteine erfolgte wie unter 6.15 beschrieben.

Es wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt und anhand der ermittelten Konzentrationen und dem molekularen Gewicht der rekombinanten Proteine Eichlösungen herstellen.

Um auszuschließen, dass Verunreinigungen eine falsche Proteinkonzentration für die rekombinanten Proteine widerspiegeln, wurden unterschiedliche Volumina der Eichlösungen durch SDS-PAGE voneinander getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Da beide Proteine zusätzlich eine His-Erkennungssequenz enthielten, konnten die Eichproteine durch einen spezifisch gegen die His-Erkennungssequenz gerichteten Antikörper detektiert und somit direkt miteinander verglichen werden. Hierzu diente das LI-COR System von Odyssey samt zugehöriger Software.

Die ermittelten Werte lieferten ein Korrekturfaktor zur Herstellung neuer Eichlösungen. Wie oben bereits beschrieben erfolgte erneut der Vergleich der Eichprotein-Lösungen (Abbildung 33). Die so hergestellten Eichprotein-Lösungen fanden in Abschnitt 4.8.2 Verwendung.

4.8.2 Spezifische Interaktion von p24 mit einem Sphingolipid

Potentielle Kandidaten, denen eine in COPI-Vesikeln beobachtete Lipidsortierung zukommen kann, sind die Proteine der p24-Familie. Um zu untersuchen, ob ihnen eine Funktion bei der Anreicherung von SM 18:0 zukommen könnte, wurden CHO-Zellen mit [³H]-D-erythro-photoSph markiert und durch UV-Bestrahlung eine Kreuzvernetzung erzielt. Es folgte die Anreicherung der beiden p24-Familienmitglieder p23 und p24 mittels Immunpräzipitation. Zur Konzentrationsbestimmung von p23 und p24 mittels Western Blot diente eine auf die Gele aufgetragene Standardreihe des jeweiligen aufgereinigten Eichproteins (s. Abschnitt 4.8.1). Nach Entwickeln des Blots mit den angegebenen Antikörpern wurden die Signale mit Hilfe des LI-COR-Systems der Firma Odyssey detektiert und mit der zugehörigen Software quantifiziert. Abbildung 29A zeigt Westernblots und die mit Hilfe der Eichgeraden (beispielhaft für p23 in Abbildung 29C angegeben) bestimmten Mengen an p23 bzw. p24 im jeweiligen Immunpräzipitat. Die Analyse von radioaktiv markierten Proteinen erfolgte durch digitale Autoradiographie. Dabei zeigte sich, dass nach Kreuzvernetzung nur p24 nicht aber p23 radioaktiv markiert war. Die Quantifizierung der radioaktiven Banden wurde mittels der β Vision-Software durchgeführt. Abbildung 29D gibt das relative Verhältnis der in der digitalen Autoradiographie detektierten Anzahl der Ereignisse ("counts") zur Stoffmenge (n)

der Proteine an. Dabei wurde der Wert von p24 auf 100% gesetzt. Im Vergleich zu p23 weist p24 eine ca. 7fach höhere Affinität zu Sphingolipiden auf.

Parallel wurden CHO-Zellen für 8h mit [³H]-photoChol markiert und nach Kreuzvernetzung mit UV-Licht die Proteine p23 und p24 mittels Immunpräzipitation angereichert. In beiden Fällen konnte keine Interaktion mit Cholesterin detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

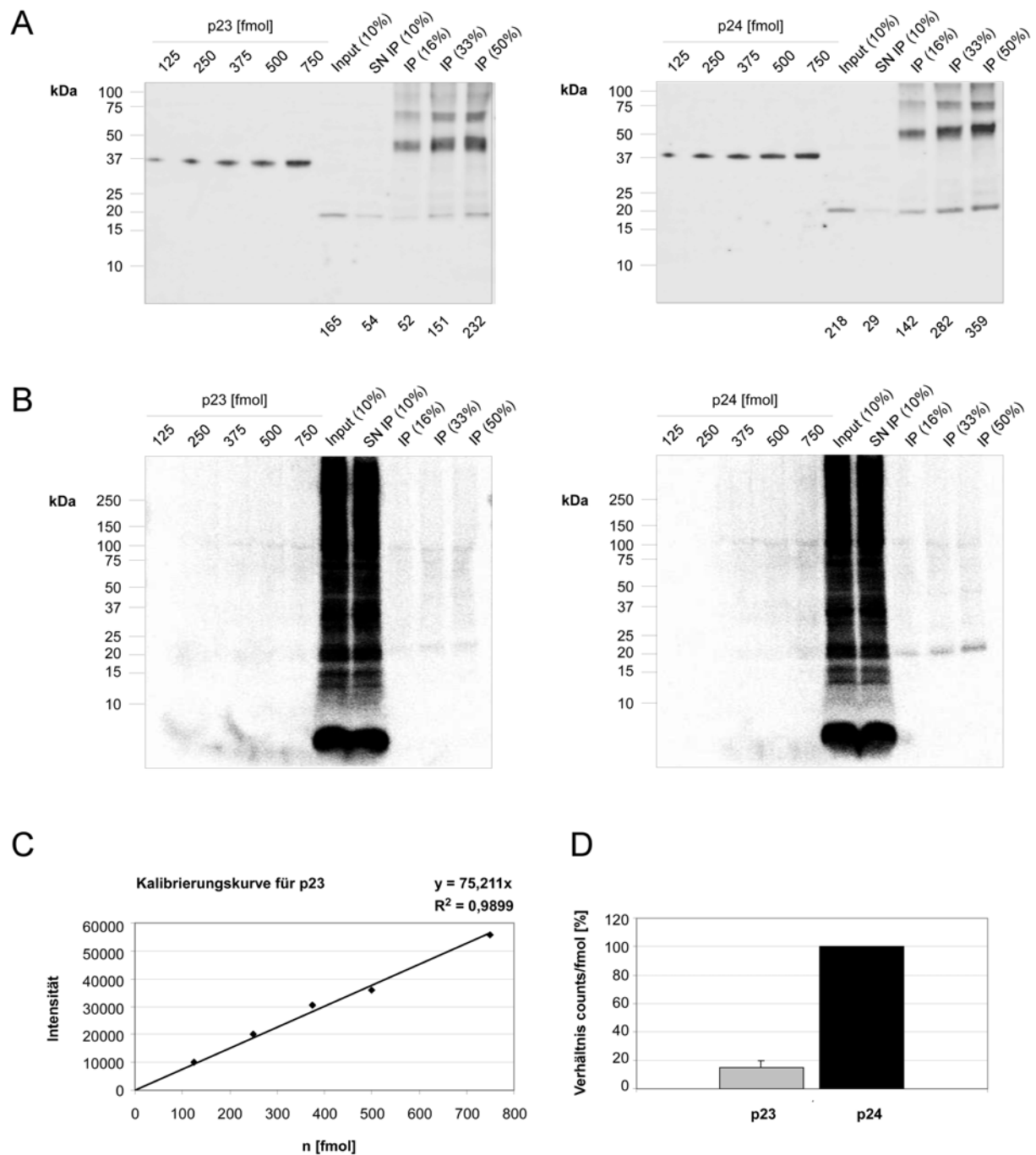


Abbildung 29. Interaktion von p24 mit Sphingolipiden. CHO-Zellen wurden für 6h mit $1\mu\text{M}$ ($200\mu\text{Ci}$) $[^3\text{H}]$ -D-erythro-photoSph markiert und durch UV-Bestrahlung photoaktivierbare Lipide kreuzvernetzt. **(A)** Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen p23 (Henriette, links) sowie mit einem Antikörper gegen p24 (Elfriede, rechts). **(B)** Digitale Autoradiographie der PVDF-Membranen aus A. **(C)** Eichgerade zur Bestimmung von endogenem p23. **(D)** Verhältnis von in der Autoradiographie detektierten Ereignissen (counts) zur Proteinmenge (n). Der für p24 ermittelte Wert wurde auf 100% gesetzt. Das Ergebnis ist das Resultat zweier unabhängiger Experimente.

4.8.3 p24, ein SM-bindendes Protein

Um zu klären, ob p24 mit dem Sphingolipid SM interagiert, wurden CHO-Zellen zunächst zum Hungern für 7h in einem lipiddefizienten Medium gehalten und anschließend für 19h mit 50 μ M 10-ASA und 200 μ Ci [3 H]-Cholin bzw. mit 6 μ M *D-erythro*-photoSph und 200 μ Ci [3 H]-Cholin markiert. Da 10-ASA nicht zur Biosynthese von SM herangezogen wird (4.6), dient die Markierung von 10-ASA/[3 H]-Cholin ausschließlich zur Analyse von Protein-PC-Interaktionen. Auf die UV-Bestrahlung folgte die Anreicherung der Proteine p23 und p24 mittels Immunpräzipitation, dann die Trennung der Proteine über SDS-PAGE und schließlich deren Transfer auf eine PVDF-Membran. Das Ergebnis der digitalen Autoradiographie und die Western-Blot Analysen der jeweiligen Membran zeigt Abbildung 30A/B. Abbildung 30C stellt die Lipidanalyse der mit [3 H]-Cholin und dem jeweiligen photoaktivierbaren Lipidvorläufer (10-ASA bzw. *D-erythro*-photoSph) gefütterten Zellen dar. 63% des von der Zelle aufgenommenen Cholins gingen in die Biosynthese von PC ein, während 37% in Form von radioaktiv markiertem SM vorlagen.

Durch Fütterung von Zellen mit [3 H]-Cholin/photoSph und UV-Bestrahlung ließen sich eine Reihe von Proteinen radioaktiv markieren. Wie durch eine Immunpräzipitation gezeigt werden konnte, ließ sich auch p24 radioaktiv markieren. Mit [3 H]-Cholin/10-ASA erfolgte die Markierung von p23 und p24. Interessanter Weise ist ein deutlicher Unterschied im Migrationverhalten von dem mit [3 H]-Cholin/10-ASA markiertem p24 zu dem mit [3 H]-Cholin/*D-erythro*-photoSph markiertem p24 zu beobachten.

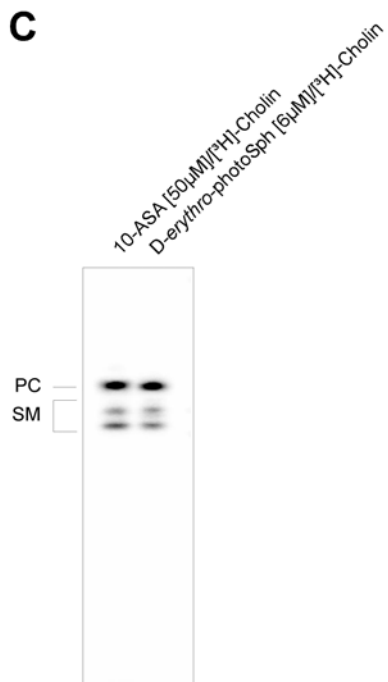
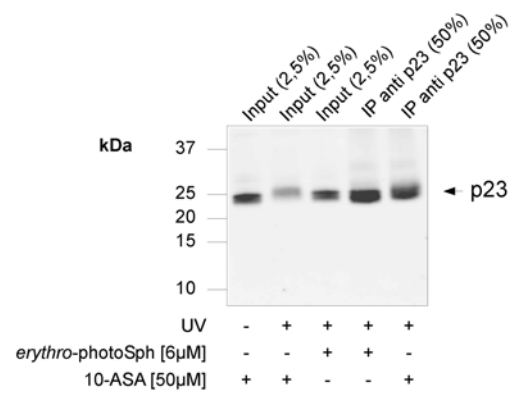
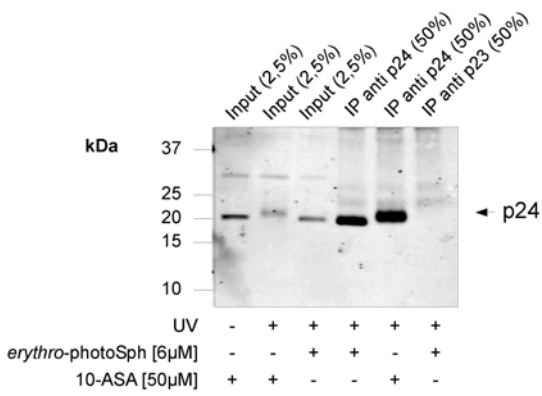
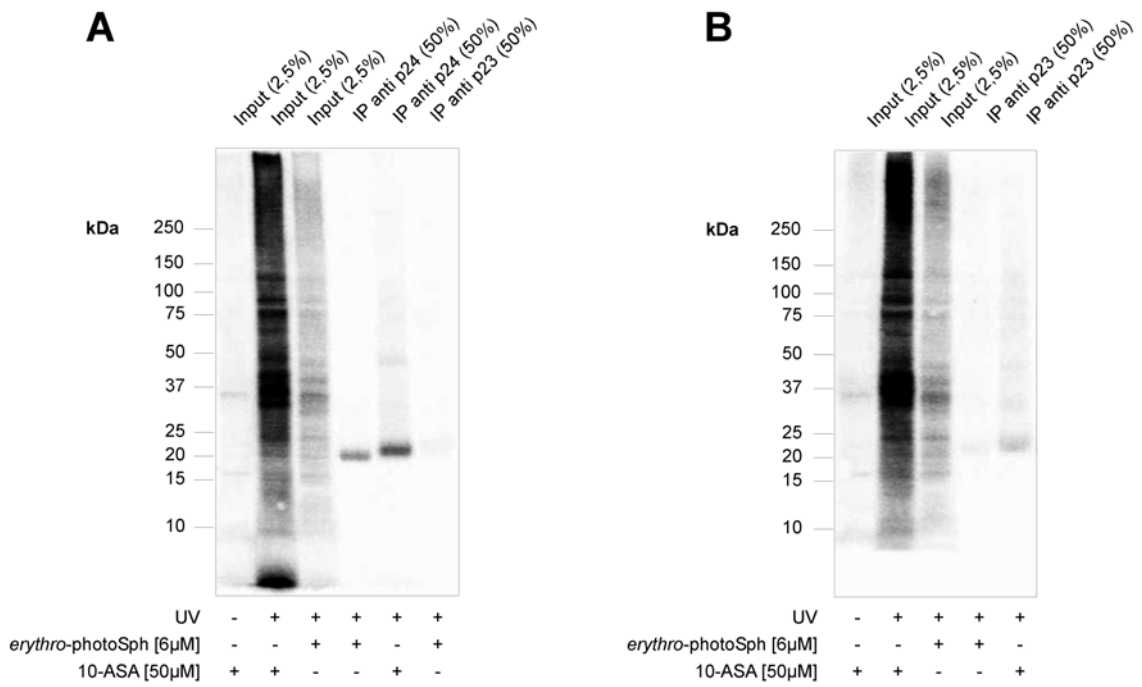


Abbildung 30. Spezifische Interaktion von p24 mit SM unter *in vivo* Bedingungen. Inkubation von CHO-Zellen in lipiddefizientem Medium für 7h; Markierung mit 10-ASA (50 μ M)/[3 H]-Cholin (200 μ Ci) bzw. mit D-*erythro*-photoSph (6 μ M)/[3 H]-Cholin (200 μ Ci) in delipidiertem α -MEM-Medium für 19h; Bestrahlung mit UV-Licht; Immunisolierung von p23 (Henriette) bzw. p24 (Elfriede) mit den in Klammern angegebenen Antikörpern; Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und anschließender Transfer auf eine PVDF-Membran. (A/B) Digitale Autoradiographie der PVDF-Membranen (oben) sowie Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen (A) p24 (Elfriede) bzw. (B) p23 (Henriette) (untere Hälfte). (C) Lipidanalyse von nicht bestrahlten Zellen; Auftrennung der Lipide in der Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel CHCl₃/MeOH/H₂O (65:25:4, v/v).

4.9 Massenspektrometrischer Nachweis des Transmembranspanns von rekombinantem p24

Die in Abschnitt 4.3 und 4.8 erläuterten Experimente zeigen, dass p24 spezifisch mit dem Sphingolipid SM interagiert. Da sowohl p24 als auch die SM-Spezies SM 18:0 in COPI-Vesikeln angereichert vorliegen, stellt sich die Frage, ob es sich bei dem mit p24 verbundenen Lipid um SM 18:0 handelt.

Dazu sollte zunächst der massenspektrometrische Nachweis des Transmembranspanns (TMS) von p24 optimiert werden. Zunächst wurde versucht, den TMS durch herkömmliche Methoden nachzuweisen. Hierzu wurde rekombinantes p24 über SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein nach Detektion durch Coomassiefärbung mit Trypsin im Gel verdaut. Abbildung 31 zeigt die Aminosäuresequenz von p24. Zusätzlich sind die Trypsin-Schnittstellen gekennzeichnet. Das Peptidfragment, das den TMS beinhaltet ist rot hervorgehoben.

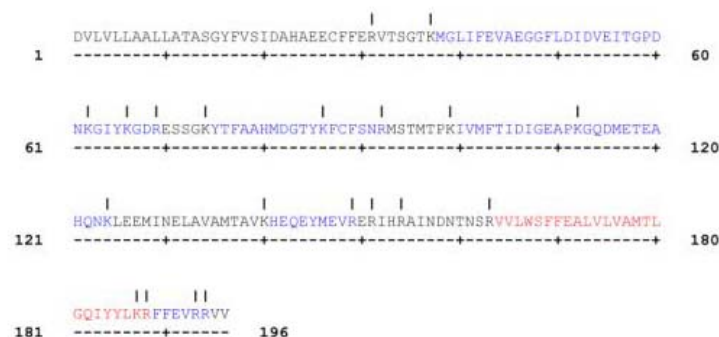


Abbildung 31. Aminosäuresequenz von endogenem p24 (Stamnes et al. 1995). Zusätzlich sind Trypsin-Schnittstellen gekennzeichnet. Die in Abbildung 32 mit Sternchen (*) markierten Peptide sind in blau, der Transmembranspann (TMS) in rot dargestellt.

Die massenspektrometrische Analyse des mit Trypsin verdauten p24 führte zu dem in Abbildung 32A abgebildetem Spektrum. Mit einem Stern versehene Massen konnten den in Abbildung 31 in blau dargestellten Peptidfragmenten zugeordnet werden. Eine dem TMS von p24 (in Abbildung 31 in rot dargestellt) entsprechende Masse war nicht zu detektieren.

Hydrophobe Peptide stellen in der Massenspektrometrie aufgrund ihrer schlechten Ionisierbarkeit ein Problem dar. Die hydrophobe Eigenschaft des TMS von p24 sollte genutzt werden, um dieses Peptid nach dem Verdau anzureichern. Hierzu wurde das Protein durch eine Chloroform/Methanol-Fällung präzipitiert und der Niederschlag in 50mM Tris-Puffer pH 8,9 aufgenommen. Proteine wurden durch Zugabe von Trypsin verdaut. Der Ansatz wurde mit Chloroform extrahiert. Nach Entfernen der organischen Phase wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom verblasen, der Rückstand in Methanol aufgenommen und direkt im Anschluss eine *Target*-Präparation durchgeführt. Noch am gleichen Tag erfolgte die Vermessung der Probe mittels *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI). Das Spektrum zeigt Abbildung 32B. Die dabei gefundenen Massen konnten dem Transmembranspan von p24 zugeordnet werden konnten. Durch die aufeinander folgenden Aminosäuren Lysin (K) und Arginin (R) kommt es bei der Spaltung des Proteins durch Trypsin zu einem sogenannten *miss cleavage*, und somit zur Bildung zweier Fragmente (Abbildung 31). Die detektierten Signale ließen sich auf Na⁺- und H⁺-Addukte bzw. Oxidationsprodukte der Fragmente zurückführen.

Der massenspektrometrische Nachweis des TMS von p24 stellt einen wichtigen Schritt zur Analyse von Protein-Lipid Crosslink-Produkten dar. Zur Identifizierung einer Protein-Lipid-Interaktion, bei dem eine definierte Spezies eine Rolle spielt, ist eine massenspektrometrische Analyse unumgänglich.

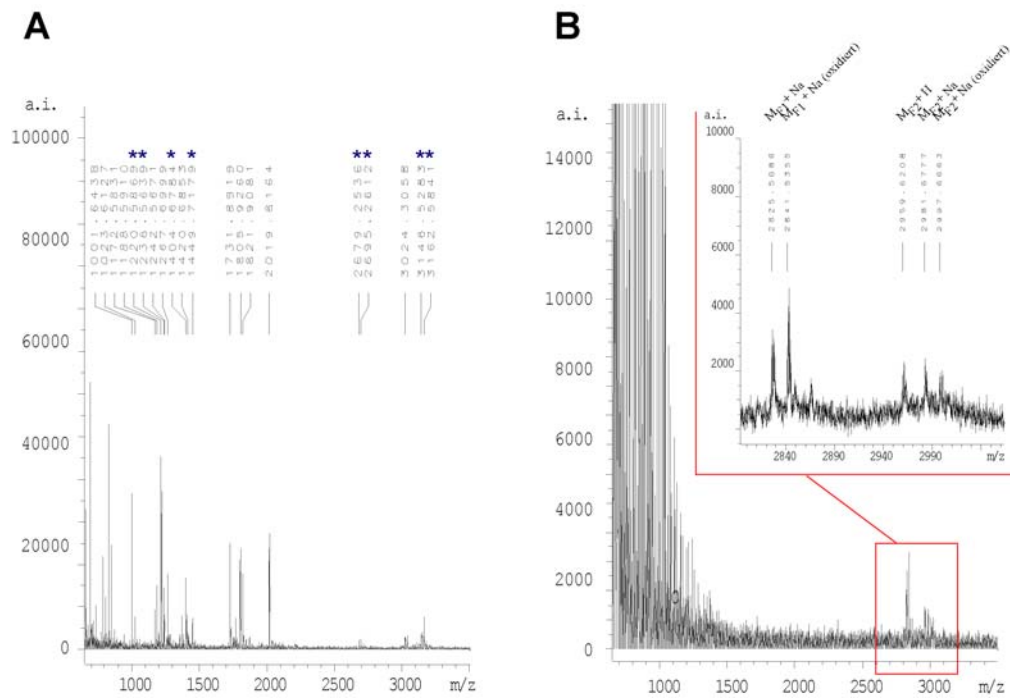


Abbildung 32. Massenspektrometrischer Nachweis des Transmembranspans von rekombinantem p24 mittels MALDI. (A) Auftrennung von rekombinantem p24 durch SDS-PAGE; Detektion von rekombinantem p24 durch Färben des Gels mit Coomassie; tryptischer Verdau im Gel. Peptide, die endogenem p24 zugeordnet werden konnten, sind mit einem Stern (*) markiert und in Abbildung 31 in blau dargestellt. **(B)** Massenspektrometrischer Nachweis des *Trans Membran Spans* (TMS) von rekombinantem p24: Ankonzentrierung des rekombinanten p24 durch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ -Fällung; Verdau von rekombinantem p24 durch Trypsin; Anreicherung von hydrophoben Peptiden durch Extraktion mit CHCl_3 ; Entfernung des organischen Lösungsmittels im Stickstoffstrom; MALDI-Analyse des Extraktes nach dessen Aufnahme in Methanol.

5 Diskussion

Die quantitative Analyse der Lipidzusammensetzung von COPI-Vesikeln zeigte, dass Cholesterin und Sphingomyelin (SM) in diesen - im Vergleich zur Golgi-Membran - angereichert sind (Brugger et al. 2000). Interessanter Weise konnte trotz geringer SM-Konzentration eine Akkumulation der SM-Spezies N-Stearyl-SM (SM 18:0) in den Vesikeln beobachtet werden. Die Anreicherung von SM 18:0 in COPI-Vesikeln könnte über eine spezifische Protein-Lipid-Interaktion erfolgen. Die Proteine der p24-Familie werden im Vergleich zur Donormembran ebenfalls in COPI-Vesikeln angereichert (Stamnes et al. 1995; Sohn et al. 1996; Gommel et al. 1999). Dies macht sie zu möglichen Kandidaten, welche über eine spezifische Protein-Lipid-Interaktion eine Anreicherung von SM 18:0 bewirken könnten.

In dieser Arbeit gelang es, spezifische Protein-Lipid-Interaktionen zu analysieren. Hierzu wurden photoaktivierbare Lipidvorläufer herangezogen, welche die photoaktivierbare Diazerin-Gruppe aufweisen. Diese kann durch UV-Bestrahlung Stickstoff abspalten. Daraus resultiert ein hoch reaktives Carben, welches ohne Präferenz gegenüber funktionellen Gruppen eine kovalente Bindung mit seiner unmittelbaren Umgebung eingeht. Durch Verwendung solcher photoaktivierbarer Lipidvorläufer zur Analyse von Protein-Lipid-Interaktionen konnte Thiele et al. eine Wechselwirkung von Synaptophysin mit Cholesterin unter *in vivo* Bedingungen nachweisen (Thiele et al. 2000). Durch den Einsatz einer photoaktivierbaren Stearinsäure (10-ASA) in Kombination mit [³H]-Cholin können Protein-Phosphatidylcholin (PC)-Interaktionen untersucht werden (s. diese Arbeit und Thiele, C. 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von Thiele et al. beschriebenen photoaktivierbaren Lipidvorläufer 10-Azi-Stearinsäure (10-ASA) und photoaktivierbares Cholesterin ([³H]-photoChol) synthetisiert (Thiele et al. 2000). Dies ermöglichte die Untersuchung von Proteinen, welche eine hohe Affinität zu Phosphatidylcholin (PC) bzw. Cholesterin haben (diese Arbeit und Thiele et al. 2000). Um jedoch zu untersuchen, ob ein Protein eine Affinität zu Sphingolipiden aufweist, wurde ein neuer, für Sphingolipide spezifischer Lipidvorläufer - photoaktivierbares Sphingosin (photoSph) - synthetisiert.

Die Analyse der Metabolite nach photoSph-Markierung bilden den Grundstein einer Methode zur Untersuchung von Protein-Sphingolipid-Interaktionen. Es gelang die radioaktive Markierung Sphingolipid-bindender Proteine mit Hilfe von [³H]-D-*erythro*-photoSph. Die hiermit etablierte Methode wurde eingesetzt, um zu untersuchen, ob den Proteinen der p24-Familie eine Funktion bei der in COPI-Vesikeln beobachteten Anreicherung von SM 18:0 zukommen kann.

5.1 Synthese von photoaktivierbarem Sphingosin

Die Synthese von D-*erythro*-photoSph erfolgte nach einer von Dr. Christoph Thiele (MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) ausgearbeiteten Synthesestrategie. Wie unter 4.2.3 beschrieben, war 1,10-Decandiol (**1**) Ausgangspunkt der Synthese. Eine der Alkohol-Gruppen wurde in Form eines Esters geschützt. Das Produktgemisch aus Edukt, Mono- und Diester konnte säulenchromatographisch getrennt werden. Der Monoester (**2**) wurde in einer folgenden Swern-Oxidation eingesetzt. Die ungeschützte Alkohol-Gruppe wurde dabei mit Oxalylchlorid, Dimethylsulfoxid und Triethylamin zum Aldehyd (**3**) umgesetzt. Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 98%. Die Umsetzung des Aldehyds (**3**) mit Butylbromid zum sekundären Alkohol (**4**) erfolgte in einer Grignard-Reaktion. Der durch die Kettenverlängerung entstehende sekundäre Alkohol (**4**) wurde erneut mittels Swern-Oxidation zum Keton (**5**) umgesetzt. Hierauf folgte die Freisetzung der in Form eines Esters geschützten Alkohol-Gruppe durch alkalische Hydrolyse. Zur Einführung der photochemisch aktivierbaren Diazirin-Gruppe wurde aus dem Keton (**6**), analog der Synthese von 10-ASA, in einer methanolischen mit Ammoniak gesättigten Lösung zunächst ein Imin und durch anschließende Zugabe von Aminohydroxysulfonsäure das Diaziridin gebildet. Dieses wurde nach Einengen des Reaktionsgemisches mit einer methanolischen Iod-Lösung zum Diazirin (**7**) umgesetzt. Nachfolgende Swern-Oxidation lieferte den Aldehyd (**8**).

In allen drei Fällen der Swern-Oxidation zeichnete sich diese als schnelle und praktikable Reaktion aus, welche in hohen Ausbeuten das jeweilige Oxidationsprodukt lieferte. Der durch die Swern-Oxidation gebildete Aldehyd (**8**) wurde in einer Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit dem β -Ketophosphonat (**13**) umgesetzt. Durch diese Reaktion bildet sich selektiv eine *trans*-Doppelbindung. Das β -Ketophosphonat (**13**) wurde zuvor aus dem Garnerester (**12**), dem Dimethylmethylphosphonat und Butyllithium gebildet. Die Ausbeute

dieser Reaktion betrug 21%. Da es sich bei der photoSph-Synthese um eine konvergente Synthese handelt und diese zu Beginn der Reaktion steht, kann die geringe Ausbeute in Kauf genommen werden.

Das aus der Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion hervorgehende geschützte 3-Keto-14-Azi-Sphingosin (**9**) wurde unter Luche-Bedingungen mit CeCl_3 und NaBH_4 zum geschützten photoSph (**10**) umgesetzt. Anschließend folgte die Entschützung des Produktes unter sauren Bedingungen sowie dessen säulenchromatographische Aufreinigung. Die geringe Ausbeute dieser Reaktion von 18% ist eine Folge der Aufreinigung. Durch die Reduktion entstehen zwei Diastereomere: *D-erythro*-photoSph und *L-threo*-photoSph. Dabei weist erstere Verbindung die natürlichem Sphingosin entsprechende Stereokonfiguration auf. Aufgrund der Reaktionsbedingungen bei der Reduktion entsteht bevorzugt *D-erythro*-photoSph. Eine Anreicherung der *D-erythro*-Form (**11**) gelang durch die säulenchromatographische Aufreinigung.

Die Synthese von [^3H]-photoSph wurde analog durchgeführt. Die Reduktion des geschützten Keto-photoSph (**9**) erfolgte mit [^3H]- NaBH_4 . Dieses wies eine spezifische Aktivität von 80Ci/mmol auf. Ein Äquivalent [^3H]- NaBH_4 kann 4 Äquivalente des geschützten Keto-photoSph (**9**) reduzieren. Die spezifische Aktivität von [^3H]-photoSph beträgt somit $\frac{1}{4}$ von der des eingesetzten [^3H]- NaBH_4 . Bei der Reduktion entstehen, wie unter ABSCHNITT beschrieben, zwei Diastereomere. Nach Entfernung der Schutzgruppen erhält man [^3H]-*D-erythro*-photoSph sowie [^3H]-*L-threo*-photoSph. Diese können über präparative Dünnschichtchromatographie von einander getrennt und isoliert werden. Die Ausbeute für [^3H]-*D-erythro*-photoSph und [^3H]-*L-threo*-photoSph lag bei 50% und 14% (bezogen auf eingesetztes [^3H]- NaBH_4). Um die Autoradiolyse der Produkte einzuschränken, wurden diese in Form einer ethanolischen Lösung bei -20°C gelagert. Die Konzentration betrug dabei 0,5mCi/ml.

5.1.1 Beweis der Stereokonfiguration von [^3H]-*D-erythro*-photoSph und [^3H]-*L-threo*-photoSph

Sphingosin besitzt 2 chirale Kohlenstoffatome, woraus 4 verschiedene Stereoisomere resultieren. Natürliche Sphingolipide treten in der *D-erythro*-Konfiguration auf. Sphingosin bzw. Sphinganin sind Vorläufer für die Biosynthese von Sphingolipiden. Während

Sphinganin bei der *de novo* Synthese gebildet wird, handelt es sich bei Sphingosin um ein Degradationsprodukt, das beim Abbau von Sphingolipiden entsteht. Eine Untersuchung der verschiedenen Stereomere bezüglich ihrer Metabolisierung ergab, dass nur *D-erythro*- sowie *L-threo*-Sphinganin unter *in vivo* Bedingungen zu Ceramid (Cer) und SM metabolisiert wird. Im Gegensatz zu *D-erythro*-Sphinganin, das zu Glucosylceramid (GlcCer) verstoffwechselt wird, kann *L-threo*-Sphinganin nicht zu GlcCer umgesetzt werden (Venkataraman et al. 2001). Sphinganin, das bei der *de novo* Synthese von Sphingolipiden aus Serin und Palmitoyl-CoA gebildet wird, sowie Sphingosin, ein Zwischenverbindung beim Abbau von Sphingolipiden, sind Vorläufer für die Sphingolipid-Biosynthese. Aufgrund der von Venkataraman et al. gemachten Beobachtung wurde untersucht, ob [³H]-*L-threo*-photoSph im Gegensatz zu [³H]-*D-erythro*-photoSph nur zu Cer und SM und nicht zu glycosylierten Sphingolipiden umgesetzt wird. In der Tat konnten Lipidanalysen von Zellen, welche mit [³H]-*D-erythro*- bzw. [³H]-*L-threo*-photoSph markiert wurden, diese Vermutung bestätigten (4.6).

5.1.2 Ausschließliche Markierung von Sphingolipid-bindenden Proteinen

In [³H]-*D-erythro*- bzw. [³H]-*L-threo*-photoSph ist das Tritium an das Kohlenstoffatom C3 gebunden. Für die Verwendung von [³H]-*D-erythro*-photoSph zur Untersuchung von Protein-Sphingolipid-Interaktionen ist die Position des Tritiums von entscheidender Bedeutung: Beim Abbau von Sphingosin wird dieses zunächst phosphoryliert. Anschließend wird die C2-C3 Bindung des Sphingosin-1-phosphats (Sph1P) gespalten. Dabei entsteht Phosphoethanolamin und Hexadecenal. Letzteres kann durch Oxidation in eine Fettsäure überführt werden.

Geht man davon aus, dass [³H]-*D-erythro*-photoSph analog abgebaut wird, so kommt es bei der Oxidation des photoaktivierbaren Aldehyds zur Trennung des Tritiums von der photoaktivierbaren Gruppe. Folgeprodukte der photoaktivierbaren Fettsäure sind somit nach Kreuzvernetzung in der Autoradiographie nicht detektierbar. Die durch [³H]-*D-erythro*-photoSph radioaktiv markierten Proteine sind somit ausschließlich auf Protein-Sphingolipid Interaktionen zurückzuführen.

5.1.3 Charakterisierung von photoSph

Eine Voraussetzung für die Verwendung von [³H]-D-*erythro*-photoSph zum Nachweis von Protein-Sphingolipid-Interaktionen ist die zelluläre Aufnahme dieser Verbindung und dessen Prozessierung durch die im Sphingolipid-Stoffwechsel involvierten Enzyme. Die intrinsische Radioaktivität der Verbindung ermöglicht die Aufnahme sowie die Metabolisierung von [³H]-D-*erythro*-photoSph zu verfolgen. Fütterungsexperimente, bei denen CHO-Zellen für 3h mit 6μM [³H]-D-*erythro*-photoSph inkubiert wurden, zeigten dabei eine Aufnahme von ca. 30%. Lipidextrakte von mit [³H]-D-*erythro*-Sphingosin bzw. [³H]-D-*erythro*-photoSph markierten Zellen zeigten nach ihrer Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie ein auffallend ähnliches Muster (4.4.2). Dabei nahm entsprechend der biosynthetischen Abfolge die Signalintensität der jeweiligen Sphingolipide mit der Zeit zu. Das nahezu identische Laufverhalten von photoaktivierbaren Sphingolipiden gegenüber endogenen Sphingolipiden lässt die Verwendung von nicht-photoaktivierbaren Lipidstandards in der Dünnschichtchromatographie zu. Ein Vergleich der Lipidmuster zeigt, dass [³H]-D-*erythro*-photoSph in CHO-Zellen zu photoaktivierbarem Cer, SM, GlcCer sowie zu dem Gangliosid GM3 umgesetzt wird. Des Weiteren ist eine zusätzliche Bande zu erkennen, dessen Migrationsverhalten zwischen dem von SM und GlcCer liegt. Dabei handelt es sich vermutlich um Ceramidphosphorylethanolamin (Daten nicht gezeigt). Trotz großer Ähnlichkeit der Lipidmuster ist ein Unterschied in der Intensitätsverteilung bei den durch SM gekennzeichneten Banden feststellbar. Während bei der [³H]-D-*erythro*-Sphingosin-Markierung ein stärkerer Einbau in kurzkettige SM-Spezies (untere Bande) beobachtet wird, ist ein bevorzugter Einbau von [³H]-D-*erythro*-photoSph in längerkettige SM-Spezies (obere Bande) zu beobachten. Es existiert eine ganze Familie von Cer-Synthasen, die Präferenzen bezüglich unterschiedlich langer Fettsäuren aufweisen. Das unterschiedliche Verhältnis von kurz- zu langkettigen SM-Spezies könnte auf einen durch die photoaktivierbare Gruppe gehinderten Enzym-Substrat-Komplex zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu CHO-Zellen bilden andere Zelllinien nach Markierung mit [³H]-D-*erythro*-photoSph vornehmlich kurzkettige SM-Spezies (4.4.5).

5.1.4 Sphingomyelinase Verdau von [³H]-D-erythro-photoSM

Lipidanalysen von Zellen, welche zuvor mit [³H]-D-erythro-photoSph markiert wurden, lieferten in der Dünnschichtchromatographie zwei radioaktive Banden, welche ein ähnliches Laufverhalten wie natürlich vorkommendes SM zeigten. Durch Behandlung der Lipidextrakte mit Sphingomyelinase (SMase) konnte eine gleichzeitige Abnahme beider Banden beobachtet werden, welche mit einer Intensitätszunahme einer weiteren Bande (Cer) einher ging (4.4.4). Unbeeinflusst von der SMase zeigte sich hingegen ein radioaktives Produkt, aus dessen Laufverhalten auf photoaktivierbares GM3 geschlossen werden kann. Durch erhöhte SMase Konzentrationen und Inkubationszeiten konnte ein vollständiger Verdau der beiden mit SM gekennzeichneten Banden erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass es sich bei den in der Dünnschichtchromatographie mit SM gekennzeichneten Banden ausschließlich um SM-Spezies handelt.

5.1.5 Massenspektrometrischer Nachweis von photoaktivierbarem Sphingomyelin

In der Arbeit gelang der massenspektrometrische Nachweis von photoaktivierbarem Sphingomyelin (photoSM). Dazu wurden Zellen mit D-erythro-photoSph markiert, ihre Lipide extrahiert und Glycerolipide mittels ammoniakalischer Hydrolyse entfernt. Es folgte die Auftrennung der Lipide durch Dünnschichtchromatographie. Nicht-photoaktivierbare Lipidstandards dienten zur Abschätzung des Migrationsverhaltens von photoaktivierbaren Sphingolipiden wie z.B. photoSM. Letzteres wurde aus dem Kieselgel rückextrahiert und mittels nano-ESI-MS/MS analysiert. Dabei kam eine für SM- und PC-Spezies spezifische Scan-Technik (+PAR184) zum Einsatz (Brugger et al. 2000). Zusätzlich zu den zwei für die endogenen SM-Spezies SM 16:0 bzw. SM 24:1 spezifischen Signalen konnten nach D-erythro-photoSph Markierung zwei weitere Signale detektiert werden (4.4.3). Diese wiesen eine jeweils 26Da höhere Masse auf als die von endogenem SM 16:0 bzw. SM 24:1. Durch nachfolgende UV-Bestrahlung der Probe verschwanden diese Signale. Gleichzeitig konnte eine Zunahme des Signals bei 701Da beobachtet werden. Diese Intensitätszunahme ist wahrscheinlich auf einen intramolekularen Crosslink zurückzuführen. Der massenspektrometrische Nachweis von photoaktivierbaren SM-Spezies beweist, dass D-

erythro-photoSph von der Zelle aufgenommen und zu photoSM umgewandelt wird.

5.1.6 Metabolisierung von [³H]-D-*erythro*-photoSph

Um den Einbau von [³H]-D-*erythro*-photoSph in die unterschiedlichen Sphingolipide zu untersuchen, wurden Zellen unterschiedlich lang mit den photolabilen Lipidvorläufern inkubiert (4.4.5). Bei Markierungszeiten bis zu einer Stunde konnte eine rasche Umsetzung von [³H]-D-*erythro*-photoSph zu Ceramid beobachtet werden. Längere Inkubationen lieferten höhere Ausbeuten an photoaktivierbarem SM und GM3 bei gleichzeitiger Abnahme von Cer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden [³H]-D-*erythro*-photoSph-Kinetiken in den folgenden Zelllinien durchgeführt: CHO, COS7 sowie MEB4 und GM95-Zellen. Beim Vergleich der radioaktiv markierten Lipide von CHO- und COS7-Zellen fällt auf, dass das Verhältnis der Intensitäten der mit SM-gekennzeichneten Banden unterschiedlich ist. Die untere der beiden Banden repräsentiert kurzkettige SM-Spezies, die obere Bande langkettige. Eine nach 24h Stunden zu beobachtende Anreicherung der oberen Bande, wie sie im Falle der Markierung von CHO-Zellen zu beobachten war, spiegelt nicht die endogenen Verhältnisse wider (persönliche Mitteilung von Britta Brügger, Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg). Für eine mögliche Erklärung s. 5.1.3. Im Gegensatz zu CHO-Zellen wird in COS7-Zellen das [³H]-D-*erythro*-photoSph bevorzugt in kurzkettige SM-Spezies eingebaut (4.4.5). Zusätzlich treten nach längeren Inkubationszeiten zwei weitere Banden auf, welche vermutlich auf die Ganglioside GM1 und GM2 zurückzuführen sind. Bei GM95-Zellen handelt es sich um eine Glycosphingolipid defiziente melanome Zelllinie der Maus. Im Gegensatz zur GM95-Zelllinie ist die verwandte MEB4-Zelllinie in der Lage glycosylierte Sphingolipide zu synthetisieren. Der Vergleich beider Lipidanalysen bestätigt, dass es sich bei den in der Dünnschichtchromatographie von MEB4-Lipidextrakten zusätzlich auftretenden Banden um glycosylierte Sphingolipide handelt.

5.1.7 Photolabile Sphingolipide sind ein Bestandteil von DRMs

Cholesterin und SM sind Hauptbestandteile von sogenannten *Rafts*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass photoSM seinem natürlichen Analogon SM insofern gleicht, als

es ebenfalls als Bestandteil von *detergent resistant membranes* (DRM) vorzufinden ist. Hierzu wurden Zellen zunächst mit [³H]-D-*erythro*-photoSph markiert. Die in Detergens unlösliche Membranen (DRM) konnten von den in Detergens löslichen durch Behandlung der Zellen mit Triton X-100 bei 4°C und anschließender Flotation in einem Optiprep-Gradienten getrennt werden.

Erfolgte die Markierung der Zellen für 6h mit [³H]-D-*erythro*-photoSph, so lagen 20% des photoaktivierbarem SMs DRM-assoziert vor. In einem parallel durchgeführten Ansatz wurde die Verteilung von endogenem SM durch quantitative Massenspektroskopie ermittelt. Der Anteil an endogenem SM in der DRM-Fraktion betrug dabei 34%. Um zu untersuchen, ob ein geringerer Anteil von photoSM in den DRM einen Zustand widerspiegelt, welcher nicht dem Gleichgewichtszustand entspricht, wurden Zellen für 24h markiert. Dabei reduzierte sich der Anteil von DRM-assoziertem photoSM noch weiter auf 12%. Somit kann die im Vergleich zu SM geringere Konzentration an photoSM in den DRM nicht auf einen noch nicht erreichten Gleichgewichtszustand zurückgeführt werden.

Neben photoSM konnten photoaktivierbare Derivate von Ceramid, Glycosylceramid und GM3 in den DRM detektiert werden. 5-10% des jeweiligen Sphingolipids lag DRM-assoziert vor. Längere Markierungszeiten zeigten keinen wesentlichen Einfluss auf deren Verteilung. Es konnte eine Präferenz für kurzkettige SM-Spezies, DRM-assoziert vorzuliegen, festgestellt werden. Dieser Trend, dass kurzkettige SM-Spezies bevorzugt in DRM auftreten, konnte auch für endogenes SM festgestellt werden.

Mittels der beschriebenen Untersuchungen konnte das Auftreten von photoSM in DRM nachgewiesen werden. Allerdings wurden Unterschiede bezüglich der Konzentration von DRM-assoziertem photoSM zu natürlichem SM in CHO-Zellen festgestellt.

5.2 Anwendung der Methode

5.2.1 Metabolisierung der photolabilen Lipidvorläufer

Werden Zellen mit 10-ASA markiert, so wird diese hauptsächlich in PC, PI und PE eingebaut. Darauf weisen nano-ESI-MS/MS-Spektren von mit 10-ASA markierten Zellen hin (Haberkant 2003). Diazerinhaltiges SM konnte nach Markierungen von Zellen mit 10-ASA nicht nachgewiesen werden (Haberkant 2003, sowie persönliche Mitteilung von Christoph Thiele,

MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden). Der Einbau von 10-ASA in die Phospholipide PC, PI und PE ist in Einklang mit Fütterungsexperimenten mit radioaktiver Stearinsäure (Kuerschner et al. 2005). Markierungsexperimente mit [³H]-Cholin zeigten dessen Einbau in PC und SM, wobei PC das Hauptprodukt ist (diese Arbeit und Thiele et al. 2000). Bei Zellmarkierungen mit 10-ASA und [³H]-Cholin entsteht somit radioaktives photoaktivierbares Phosphatidylcholin, welches die Analyse von Protein-PC Interaktionen gestattet.

Nach Markierung von CHO-Zellen mit [³H]-photoChol konnte neben diesem ein weiteres Stoffwechselprodukt beobachtet werden. Dabei handelt es sich vermutlich um einen Cholesterinester.

5.2.2 Anwendung der Methode zum Nachweis von Protein-Sphingolipid Interaktionen am Beispiel des Ceramid-Transporters

Es werden zwei Transportwege für Cer vom ER zum Golgi diskutiert: Einen ATP- und cytosolabhängigen, sowie einen ATP- und Cytosol un-, bzw. weniger abhängigen Weg. Ersterer scheint dabei eine Hauptrolle einzunehmen. Dieser nicht-vesikuläre Transport wird durch das von Hanada et al. identifizierte Protein CERT (Ceramid Transporter) vermittelt (Hanada et al. 2003). CERT ist in drei Domänen strukturiert: (1) Eine Phosphatidylinositol-4-Phosphat bindende *Pleckstrin Homology* Domäne, welche die Bindung an die Golgi-Membran vermittelt, (2) eine zentrale Domäne mit *coiled coil*-Motiven, von der man annimmt, dass sie für die Bindung an die ER-Membran verantwortlich ist, sowie (3) eine START-Domäne, welche das zu transportierende Lipid Cer bindet. Die Phosphatidylinositol-4-Kinase III β reguliert die SM-Synthese, indem sie den Cer-Transport vom ER zum Golgi steuert (Toth et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass CERT effizient Cer 16:0 extrahiert, jedoch keine Affinität zu Sphingosin, SM, PC und Cholesterin aufweist (Hanada et al. 2003). Kumagai K. et al. untersuchten die Transfereigenschaft von CERT in einem liposomalen System in Bezug auf verschiedene Stereoisomere von Cer (Kumagai et al. 2005). Im Vergleich zu *D-erythro*-Cer zeigte CERT nur eine geringe Transferaktivität gegenüber *L-threo*-Cer.

CERT transportiert das Sphingolipid Cer, hat jedoch keine Affinität zu PC und Cholesterin.

Dies macht es zu einem idealen Protein zur Überprüfung, ob [³H]-*erythro*-photoSph sich zur Analyse von Sphingolipid-bindenden Proteinen eignet. Durch Markierungsexperimente mit [³H]-*erythro*-photoSph und anschließender Kreuzvernetzung durch UV-Bestrahlung konnte CERT radioaktiv markiert werden. Nach Markierung mit [³H]-*threo*-photoSph konnte ebenfalls radioaktiv markiertes CERT immunisoliert werden. Dies ist in Einklang mit der von Kumagai et al. gefundenen, wenn auch geringen Transferaktivität gegenüber *L-threo*-Cer. Die beobachtete geringe Transferaktivität könnte auch daher resultieren, dass das Diastereomer von CERT gebunden, dessen Freisetzung jedoch verzögert ist.

Parallel wurden Zellen mit 10-ASA/[³H]-Cholin bzw. [³H]-photoChol markiert und eine Kreuzvernetzung durchgeführt. Wie erwartet konnte durch Verwendung dieser Lipidvorläufer CERT nicht radioaktiv markiert werden. Die alleinige Markierung von CERT durch die Verwendung von [³H]-*D-erythro*-photoSph sowie die unterschiedlichen Proteinmuster des Zelllysats nach Markierung mit 10-ASA/[³H]-Cholin, [³H]-photoChol bzw. [³H]-*D-erythro*-photoSph zeigen, dass sich letztere Verbindung zur Analyse von Protein-Sphingolipid-Interaktionen eignet.

5.2.3 Caveolin-1 weist eine hohe Affinität zu Cholesterin und Sphingolipiden auf

Caveolin-1 (Cav-1) ist ein 21-24kDa großes Protein und bildet den Hauptbestandteil der an der Zelloberfläche auftretenden Caveolae. Bei diesen handelt es sich um Membraneinstülpungen, denen eine Rolle bei der Endocytose zugeschrieben wird. Cav-1 ist mehrfach palmitoyliert (Parat et al. 2001). Es besitzt zudem eine zentrale hydrophobe Domäne, von der man vermutet, dass sie in der Membran eingebettet vorliegt, während N- und C-Terminus der cytosolischen Seite zugewandt sind. Dadurch verhält sich Cav-1 wie ein integrales Membranprotein. Von Cav-1 existieren zwei Isoformen, Cav-1 α und Cav-1 β . Letzteres weist ein schnelleres Migrationsverhalten bei der Gelelektrophorese auf. Cav-1 wird eine Rolle bei der Cholesterin-Homöostase zugeschrieben (Martin et al. 2005).

Rekonstitutionsexperimente von aus *E. coli* aufgereinigtem Cav-1 mit Liposomen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung zeigten, dass Cav-1 nur in Gegenwart von Cholesterin an diese bindet (Murata et al. 1995). Ferner konnte Cholesterin in Lipidextrakten von aus Lungengewebe isoliertem Cav-1 nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise war die

zu beobachtende Interaktion in Gegenwart von 0,2% SDS beständig (Murata et al. 1995). Experimente mit photoaktivierbarem Cholesterin konnten diese Affinität unter *in vivo* Bedingungen bestätigen (s. diese Arbeit und Thiele et al. 2000). Bei der Verwendung von photoaktivierbaren Gangliosid-Derivaten wurden Interaktionen von Cav-1 mit GM1 (Fra et al. 1995) und GM3 (Chigorno et al. 2000) beobachtet. Die mit dem Gangliosid GM3 nachgewiesene Wechselwirkung ist dabei offenbar nur von vorübergehender Natur und nicht unter Gleichgewichtsbedingungen zu finden. Ferner konnten Cheng et al. zeigen, dass die durch Caveolae vermittelte Internalisierung von glycosylierten Sphingolipiden abhängt (Cheng et al. 2006).

Proteinmuster von CHO-Zellen nach [³H]-photoChol, [³H]-*erythro*- bzw. [³H]-*threo*-photoSph Markierung und anschließender Kreuzvernetzung zeigten auffällige Ähnlichkeiten: In allen drei Fällen konnte eine prominente Bande im Bereich von 21-24kDa beobachtet werden (4.7.3).

Zunächst wurde untersucht, ob es sich dabei um Cav-1 handelt, das für seine Interaktion mit Cholesterin bekannt ist. Durch Immunpräzipitation von Cav-1 von den mit [³H]-photoChol markierten CHO-Zellen konnte die prominente Bande bei etwa 23kDa als das Cholesterin-bindende Cav-1 identifiziert werden (Thiele et al. 2000). Interessanter Weise handelte es sich bei dem durch [³H]-*D-erythro*- bzw. [³H]-*L-threo*-photoSph markierten Proteinen ebenfalls um Cav-1.

CHO-Zellen können neben GlcCer und GM3 keine weiteren glycosylierten Sphingolipide synthetisieren. Damit kann die gefundene Interaktion nach [³H]-*D-erythro*-photoSph Markierung hier nicht auf GM1 zurückgeführt werden. Nach 24h Inkubation sind [³H]-photoSM und [³H]-photoGM3 die beiden vorliegenden Hauptspezies. Die Interaktion von Cav-1 mit einem Sphingolipid kann jedoch nicht nur von GM3 herrühren, da auch nach [³H]-*L-threo*-photoSph Cav-1 radioaktiv markiert werden konnte. [³H]-*L-threo*-photoSph wird in CHO-Zellen nur zu photoaktivierbarem Cer und SM verstoffwechselt (4.6). Dies ist in Einklang mit den von Venkataraman et al. gefundenen Ergebnissen, bei denen *L-threo*-Sphingarin als Vorläufer zur Synthese von Cer und SM dient, jedoch nicht für die Synthese von glycosylierten Sphingolipiden herangezogen wird (Venkataraman et al. 2001). Da auch nach Fütterung von [³H]-*L-threo*-photoSph radioaktives Cav-1 isoliert werden konnte, ist eine Interaktion von Cav-1 mit SM zu vermuten.

5.2.4 Eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1

Für Cav-1 wurde eine Interaktion mit dem Gangliosid GM1 beschrieben (Fra et al. 1995). Diese Interaktion konnte durch den Einsatz von *D-erythro*-photoSph, dem Vorläufermolekül für das photolabile Gangliosid GM1, bestätigt werden (4.7.4). Dazu wurden COS7-Zellen für 24h mit *D-erythro*-photoSph markiert und die Kreuzvernetzung mittels UV-Bestrahlung durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und deren Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion von Proteinen mit kovalent gebundenem GM1 mit Hilfe von Cholera Toxin B. Die Untereinheit B von Cholera Toxin bindet spezifisch an die Kohlenhydratstruktur von GM1.

Bei genauer Betrachtung der Proteinmuster von bestrahlten und unbestrahlten Zellen nach Detektion mit Cholera Toxin erkennt man einige Ähnlichkeiten. Jedoch finden sich auch zusätzliche Banden in der mit UV-Licht bestrahlten Probe. Auffallend dabei sind ein stark markiertes Protein mit einem molekularen Gewicht von ca. 26kDa sowie die weniger stark markierten Proteine bei ca. 75kDa und 100kDa. Durch Immunpräzipitation mit einem gegen Cav-1 spezifischen Antikörper konnte dessen Affinität mit GM1 nachgewiesen werden. Insgesamt lässt sich eine starke Intensitätszunahme nach UV-Bestrahlung erkennen, welche auf eine Vielzahl an mit GM1-interagierenden Proteinen schließen lässt. Die Verwendung von Cholera Toxin zur Analyse von Proteinen mit hoher Affinität zu GM1 beschreibt einen Ansatz zur Charakterisierung des an das jeweilige Protein gebundenen Sphingolipids.

5.2.5 PI-TP β weist eine Affinität zu Sphingolipiden unter *in vivo* Bedingungen auf

Im tierischen Organismus existieren 2 Isoformen der löslichen Phosphoinositol-Transfer Proteine: PI-TP α und PI-TP β . Sie sind zu 77% identisch und weisen 94% Ähnlichkeit auf. Beide vermitteln den Energie unabhängigen Transfer von PI und PC in einem liposomalen System, wobei PI-TP β zusätzlich den Transfer von SM vermittelt (Westerman et al. 1995; Wirtz 1997). Für die Affinität sind die Länge der mit dem Lipid verknüpften Fettsäure, dessen Rückgrat sowie die Kopfgruppe von entscheidender Bedeutung. Der *in vitro* beobachtete

Transfer von PC ist in beiden Phosphoinositol-Transfer Proteinen gering (Westerman et al. 1995). Anhand von Röntgenstrukturanalysen von PI-TP α konnte bevorzugt die Bindung von PI gegenüber PC erklärt werden (Snoek et al. 2004). Lokalisationsstudien zeigten, dass PI-TP α hauptsächlich im Cytosol und im Nukleus vorliegt, während PI-TP β vornehmlich am Golgi lokalisiert ist.

Die Phosphorylierung der beiden Proteine wird als wesentlicher Faktor bei der Regulation ihrer Funktion diskutiert (Snoek et al. 2004). PI-TP β ist essentiell für die Aufrechterhaltung der SM-Konzentration in der Plasmamembran (Van Tiel et al. 2000).

Bislang gab es keinen Beweis für eine *in vivo* Wechselwirkung von PI-TP β mit SM. Durch Anwendung der in dieser Arbeit etablierten Methode gelang der Nachweis einer *in vivo* Interaktion von PI-TP β mit einem Sphingolipid. Dies lässt vermuten, dass zumindest ein kleiner Teil von SM auf der cytosolischen Seite der Membran lokalisiert und somit für PI-TP β zugänglich ist.

5.3 COPI-Vesikel vermittelte Lipidsortierung

Die p24-Familie besteht aus kleinen (20-24kDa) Typ I Transmembranproteinen, welche in COPI-Vesikeln angereichert vorliegen (Stamnes, M., Sohn, K., Gommel, D. 1999). COPI-Vesikel weisen im Vergleich zur Golgi-Membran eine geringere Cholesterin- und SM-Konzentration auf (Brugger et al. 2000). Interessanter Weise konnte trotz genereller Abreicherung von SM eine Anreicherung von SM 18:0 beobachtet werden (Brugger et al. 2000). Die in dieser Arbeit etablierte Methode wurde auf die Proteine der p24-Familie angewandt, um zu untersuchen, inwieweit ihnen eine Funktion bei der Lipidsortierung zukommen kann.

5.3.1 Markierungsexperimente mit *D-erythro*-photoSph und 10-ASA - Mögliche Kandidaten bei der Sortierung von Lipiden: p23 & p24

Bei Markierungen von CHO-Zellen mit *D-erythro*-photoSph konnte nach Kreuzvernetzung durch UV-Licht ein Crosslink-Produkt mit p24, nicht jedoch mit p23 beobachtet werden. Bei Verwendung von 10-ASA wurden mit beiden Proteinen Crosslink-Produkte nachgewiesen. Interessanter Weise konnten nach 10-ASA-Markierung und UV-Bestrahlung zwei zusätzliche Banden mit einem gegen p23-gerichteten Antikörper detektiert werden. Diese wiesen ein langsames Migrationsverhalten in der Gelelektrophorese auf als p23 selbst. Möglicherweise handelt es sich dabei um p23 Proteine, welche mit einem bzw. zwei Lipiden kovalent verknüpft sind. Das mit p24 gefundene Crosslink-Produkt wies im Gegensatz zu p23 ein schnelleres Laufverhalten auf. Ein schnelleres Migrationsverhalten nach Lipidmodifizierung eines Proteins kann beispielsweise auch nach Myristylierung von Arf beobachtet werden (Franco et al. 1993). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass das in SDS-Probenpuffer aufgenommene Produkt durch verstärkte SDS-Anlagerung eine höhere negative Ladung aufweist, und somit ein schnelleres Laufverhalten bedingt. Die beste Trennung der Crosslink-Produkte erfolgte mit 16%-Laemmli-SDS-Gelen. Da das Crosslink-Produkt jedoch nur eine geringe Massendifferenz im Verhältnis zu unvernetztem p24 aufweist, wurden 16cm² große Gele verwendet und somit die Trennung von Crosslink-Produkt und endogenem Protein optimiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das beobachtete Crosslink-Produkt auf die Markierung mit photoaktivierbaren Sphingosin zurückzuführen ist, da bei UV-Bestrahlung von unbehandelten bzw. mit *D-erythro*-Sphingosin markierten Zellen keine zweite Bande auftrat. Dass es sich bei dem mit p24 kovalent verknüpften Lipid höchstwahrscheinlich um ein Sphingolipid handelt, zeigten Experimente mit Inhibitoren der Sphingolipid-Synthese. Fumonisin B₁ inhibiert die Synthese von Cer, während PDMP die Synthese von GlcCer inhibiert. Durch den Einsatz der Inhibitoren, welche vor und während der Markierung mit *D-erythro*-photoSph zugegen waren, wurden die Crosslink-Ausbeuten minimiert (25µM Fumonisin B₁) bzw. komplett aufgehoben (50µM PDMP). Niedrigere Konzentrationen an PDMP (10µM) zeigten keinen bzw. nur leichten Einfluss auf den gefundenen Crosslink (Daten nicht gezeigt). Rosenwald et al. fanden, dass eine geringe Konzentration an PDMP (2,5-10µM) die Synthese von Glucosylceramid inhibiert (Rosenwald et al. 1992). Bei höheren Konzentrationen ($\geq 25\mu\text{M}$)

kam es zudem zu einer verminderte SM-Synthese.

Da 10-ASA in mehreren Phosphoglycerolipiden nachgewiesen wurde (s. Abschnitt 5.2), kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine bestimmte Lipidklasse mit p23 interagiert.

Prinzipiell gestatten die in 4.3 beschriebenen Experimente, bei denen nach *D-erythro*-photoSph Markierung ein Crosslink-Produkt mit p24 jedoch nicht mit p23 auftrat, nicht von einem spezifischen Crosslink zu reden: Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche Crosslink-Produkte in dem gewählten Gelelektrophoreseverfahren nicht von den unmarkierten Proteinen trennbar sind.

Um eine Aussage treffen zu können, ob p24 tatsächlich und vor allem aber spezifisch mit einem Sphingolipid interagiert, wurden Markierungsexperimente mit [³H]-*D-erythro*-photoSph durchgeführt.

5.3.2 p24 weist eine Affinität zu SM auf

Die Proteine der p24-Familie liegen in unterschiedlichen Konzentrationen in der Zelle vor (Jenne et al. 2002). Um auszuschließen, dass ein eventuell gefundenes Crosslink-Produkt lediglich auf die Häufigkeit des in der Zelle vorliegenden Proteins zurückzuführen ist, wurden rekombinante Eichproteine zur Quantifizierung eingesetzt. Durch Markierungsexperimente mit [³H]-*D-erythro*-photoSph konnte so eine ca. 7fach höhere Affinität von p24 zu einem Sphingolipid im Vergleich zu p23 beobachtet werden (4.8.2).

Dass es sich bei der mit p24 beobachteten Interaktion um eine spezifische handelt, welche nicht auf eine unterschiedliche Lokalisation des Proteins innerhalb des frühen sekretorischen Weges zurückzuführen ist, zeigten auch erste Untersuchungen mit anderen p24-Familienmitgliedern. Es konnte beispielsweise keine Protein-Sphingolipid-Interaktion mit p26, dem p24-Protein mit der höchsten Konzentration, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration von p26 in den Organellen des frühen sekretorischen Weges ist ca. 10-25mal höher als die für p24 (Jenne et al. 2002). Dies belegt, dass es sich bei dem mit p24 gefundenen Crosslink um eine spezifische Interaktion handelt, und dass diese nicht durch die relative Häufigkeit des Proteins innerhalb eines Kompartiments bedingt ist.

Ebenso gelang die radioaktive Markierung von p24 durch Fütterung von Zellen mit *D-erythro*-photoSph in Kombination mit [³H]-Cholin. Wie oben bereits erläutert, kann photoaktivierbares Sphingosin abgebaut werden und die resultierende photoaktivierbare

Fettsäure mit [³H]-Cholin zu radioaktiv markiertem photoaktivierbaren PC prozessiert werden. Um auszuschließen, dass eine radioaktive Markierung des Proteins auf eine Interaktion mit PC zurückzuführen ist, wurden Zellen zusätzlich mit 10-ASA/[³H]-Cholin markiert. In beiden Fällen konnte p24 radioaktiv markiert werden. Interessanter Weise zeigten die radioaktiven Crosslink-Produkte mit p24 ein unterschiedliches Migrationsverhalten in der Gelelektrophorese. In der Western Blot Analyse mit einem gegen p24 spezifischen Antikörper konnte im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.3 und 5.3.1 diskutierten Crosslink-Produkten, bei denen nach Markierung mit *D-erythro*-photoSph eine zweite Bande nach 5-minütiger UV-Bestrahlung zu beobachten war, keine zweite Bande detektiert werden. Außerdem wurde nach UV-Bestrahlung ein schnelleres Laufverhalten der gesamten Bande festgestellt. Dies spricht für eine 100%ige Crosslinkausbeute. Anders als in den nur mit *D-erythro*-photoSph markierten Zellen (s. 4.3) wurden die Zellen hier 15 statt 5min lang mit UV-Licht bestrahlt. Die Diazeringruppe weist eine für sie charakteristische Absorption bei 350nm auf (4.2.3.1). Die Umsetzung der Diazerin-Gruppe bei UV-Bestrahlung kann im Photometer verfolgt und somit die ungefähre Crosslink-Ausbeute zu einer gegebenen Zeit ermittelt werden. Daraus ergibt sich, dass nach 5min etwa 70% der photoaktivierbaren Substanz aktiviert wurden, während man nach 15min von einer nahezu 100%igen Kreuzvernetzung ausgehen kann (Haberkant 2003). Die beobachtete Diskrepanz kann daher - zumindest nicht allein - auf die Dauer der UV-Bestrahlung zurückzuführen sein. Allerdings waren die Inkubationszeiten mit *D-erythro*-photoSph wesentlich länger (19h) im Vergleich zu den unter 4.3 geschilderten Experimenten (3-5h). Zur Markierung einer 10cm-Schale wurden 60nmol *D-erythro*-photoSph eingesetzt. Nach 3h konnte bei dieser Konzentration eine Aufnahme von 30% ermittelt werden (4.4.1). Bei längeren Inkubationszeiten ließ sich bei niederen Konzentrationen keine weitere nennenswerte Aufnahme von Radioaktivität feststellen (4.4.5). Somit können die in den Zellen vorliegenden photoaktivierbaren Sphingolipide auf etwa 18nmol abgeschätzt werden. Nach 19h sind in CHO-Zellen die beiden Hauptspezies photoSM sowie photoGM3 demnach mit etwa 9nmol vertreten. Ein geringer Teil davon liegt DRM-assoziert vor (10-20%). In einer 10cm-Schale CHO-Zellen ($\sim 5 \times 10^6$ Zellen) konnten ca. 2000fmol p24 detektiert werden (4.8.2). Nach dieser groben Abschätzung liegen in der Zelle etwa 4000mal mehr photoSM bzw. photoGM3 als p24 vor. Auch wenn keine Aussage über die Lokalisation der photoaktivierbaren Sphingolipide innerhalb der Zelle gemacht werden kann, so wäre eine Crosslink-Ausbeute von 100% theoretisch möglich. Aufgrund von Verdünnungseffekten mit endogenem SM ist dies jedoch eher unwahrscheinlich. Eine Erklärung für den beobachteten Befund steht daher noch aus.

Des Weiteren muss geklärt werden, ob p23 und p24 auch eine spezifische Affinität zu PC an den Tag legen. Eine alleinige radioaktive Markierung könnte auch unspezifischer Natur sein. Eine genaue Quantifizierung der gefundenen Crosslink-Produkte sowie der endogen vorliegenden Konzentration der jeweiligen p24-Proteine ist dabei unumgänglich. Eine radioaktive Markierung von p23 bzw. p24 durch Verwendung von [³H]-photoChol konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.2.1 Membranorganisation und die Rolle der p24-Proteine

Emery et al. zeigten, dass bei einer Mutation der cytoplasmatischen KKXX-Sequenz von p25, bei der KK durch SS ersetzt wurden (p25SS), p25 an die Zelloberfläche transportiert wird (Dominguez et al. 1998; Emery et al. 2003). Von dort wird p25 wieder internalisiert und kolokalisiert dann mit Markern der späten Endosomen. In diesen konnten ebenso p23 und p24 nachgewiesen werden. Neben der Akkumulation von p25SS in Endosomen konnten Cholesterin-Cluster beobachtet werden. Interessanter Weise wurde ein Mosaik von *Rafts*, "p25-Domänen" und Transferrin-Rezeptor enthaltenden Domänen an der Plasmamembran beobachtet, welche nebeneinander vorlagen (Emery et al. 2003).

Die von Emery et al. gefundenen Ergebnisse lassen vermuten, dass p25 an der Organisation von Membranplattformen beteiligt ist. Diese unterscheiden sich von den cholesterinreichen Domänen sowie den Membrandomänen, welche den Transferrin-Rezeptor enthalten. In Golgi-Membranen existieren Mikrodomänen. Die Proteine der p24-Familie liegen in den in Detergens löslichen Fraktionen vor (s. diese Arbeit und Gkantiragas et al. 2001). Folgender Mechanismus könnte die in COPI-Vesikeln beobachtete Lipidsortierung erklären: COPI-Vesikel schnüren sich von den durch p25-Oligomeren gebildeten Plattformen ab. Neben p25 enthalten diese weitere Proteine der p24-Familie, welche über die *coiled-coil* Motive sowie ihre Transmembran Domäne miteinander interagieren (Emery et al. 2003). Eine dicht gepackte Anordnung von p25 Proteinen mit einem für den frühen sekretorischen Weg charakteristischen *Transmembran Span* (TMS) (Munro 1995) bewirkt die Verdrängung von Cholesterin und vermutlich auch SM. Die in den p25-Domänen vorliegenden p24-Familienmitglieder könnten über Protein-Lipid Interaktionen eine Anreicherung von SM 18:0 bewirken. Ob der Interaktion von p24 mit einem Sphingolipid ein Mechanismus zugrunde liegt, der die Aufnahme und Abgabe des Lipides zu einer gegebenen Zeit steuert, ist unklar.

Vorstellbar wäre, dass die Bildung von Heterooligomeren die Auf- und Abnahme des von p24 gebundenen Sphingolipids bewirken. Nach Jenne et al. haben die Heterooligomere der p24-Proteine, welche in den Kompartimenten des frühen sekretorischen Weges vorliegen, eine jeweils unterschiedliche Zusammensetzung (Jenne et al. 2002).

Die in dieser Arbeit beschriebene Interaktion von p24 mit SM zeigt, dass es sich bei p24 um einen potentiellen Kandidaten zur Anreicherung von SM 18:0 in COPI-Vesikeln handelt. Um zu klären, ob p24 eine Präferenz bezüglich einer definierten SM-Spezies aufweist, sind massenspektrometrische Untersuchungen des Crosslink-Produktes unerlässlich.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien, Geräte und Zubehör

Ammoniak 3.8 (Messer Griesheim), Bacto™ Agar (DIFCO, #214010), Bacto™ Yeast Extract (DIFCO, #212750), 1-Brombutan zur Synthese (MERCK, 8.01602.0100), Ceramidphosphorylethanolamin (Sigma, #4987), Cer(III)-chlorid Heptahydrat (Aldrich, 22,893-1), Cholera Toxin Untereinheit B gekoppelt an Meerrettichperoxidase (LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, #105), CL-4B Sepharose Beads (Sigma, #CL4B200-100ML), [Methyl-³H]-Cholinchlorid (Amersham, TRK593), 1,10-Decandiol (Fluka, 30580), delipidiertes fötales Kälberserum (PAN-Biotech GmbH), DH5alpha (Invitrogen), Dichlormethan (MERCK, 1.06051.0500), Dimethylsulfoxid (Aldrich, 27,685-5), DMP - Dimethylpimelidatdihydrochlorid (Sigma, 8388-1G), EDTA (MERCK, 1.08418.0250), Ethanolamin (Fluka, 02400), Fumonisin B₁ (Biomol, SL-220-0005), Fuji Medical X-Ray Filme (über Bechthold Röntgenhandel, Kelkheim), Garner Ester (Aldrich, 41,043-8), Glycin (Acros Organics, 220910010), HEPES (ROTH, Art. 9105.2), HPTLC-Platten 0.2mm Schichtdicke (Merck, 1.05641.), Hydroxylamin-O-sulfonsäure (Fluka, 55493), Hyperfilm™ (Amersham Biosciences, HP79NA), myo-[³H]-Inositol (Amersham, TRK883), Kaliumcarbonat (Aldrich, 20,961-9), Kaliumpermanganat (MERCK, 1.05082.0250), 6-Ketocholesterin (Sigma, K-1250), Kieselgel 60 (MERCK, 1.07734.1000), Lipofectin (Invitrogen, #18292-037), Magnesiumsulfat (Trockenmittel, Grüssing), Magnesium-Späne für Grignard-Reaktion (Fluka, 63035), α -MEM bzw. DMEM-Medium ohne Inositol bzw. ohne Cholin (AppliChem GmbH, α -MEM A1330 bzw. DMEM A1314), MIDI-Kit NucleoBond PC100 (MACHEREY-NAGEL, #740573), Methanol - absolut über Molekularsieb getrocknet (Fluka, #65542), Methyl-beta-cyclodextrin Zellkultur getestet (Sigma, C-4555), Methylphosphonsäure-dimethylester (Fluka, 64258), Myriocin from Mycelia (Sigma, M1177-5MG), Amplify Fluorographic Reagent (Amersham, NAMP100), Natriumborhydrid (Fluka, 71320), [³H]-Natriumborhydrid Feststoff (Biotrend, ART121B, 80Ci/mmol), [³H]-Natriumborhydrid in 0.1M NaOH 20-40Ci/mmol (Amersham, TRK663), NaCl (Riedel-de-

Haen, 31434), Natriumpyrosulfit (Aldrich, 25,555-6), Natriumdeoxycholat (Fluka, 30970), Ni-NTA Agarose (Quiagen, #1018240), Oxalylchlorid (MERCK, 8.07066.0025), 10-Oxo-octadecansäuremethylester (Aldrich, 40,470-5-1G), (+/-)-*threo*-PDMP Hydrochlorid (Sigma P7340-50MG), Precision Plus Protein™ Standards All Blue (BIO-RAD, Catalog #161-0373), Propionsäure (MERCK, 8.00605.0100), Protease inhibitor cocktail tablets – Complete, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, 11 836 170 001), Protein A Sepharose™ 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, 17-5280-04), PVDF – Immobilon-FL Transfer Membrane (Millipore, #IPFL00010), PVDF- Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, #IPVH00010), PSC-Platten 20 x 20 cm Kieselgel 60, 2mm (Merck, 1.05745.), Rotiphorese R Gel 30 37,5:1 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Art.-Nr. 3029.1), Sphingomyelinase (Sigma, #S-8633), [3-³H]-D-*erythro*-Sphingosin (American Radiolabeled Chemical, Inc. ART490), 1,5l Spinnerflaschen (Techne über Thermolux, Wertheim), TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (BIO-RAD, #161-0801), Tetrahydrofuran getrocknet (Riedel-de-Haen, #34946), p-Toluolsulfonsäure Hydrat (Aldrich, T3,592-0), 10-20% Tricine Gel (Invitrogen, #EC66252BOX), Triethylamin (Fluka, 90340), Triethylamine für beta-Imager (Sigma-Adrich GmbH, #90340), Trypton/Pepton aus Casein (Roth, #8952.3), UV-Lampe (SYLVANIA R 100W, MERCURY FLOOD USA, H44JM-100; UV-Labortechnik, 61479 Glashütten)

6.1.2 Lipidstandards

Lipid	Konzentration	Lösungsmittel	Firma / Bestellnummer	Quelle
Monogangliosid-Mix, GM ₃ , GM ₂ , GM ₁	0,5mg/ml	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 2:1:0,1	Matreya / #1508	Rind
D- <i>erythro</i> -Sphingosin-1- phosphat (Sph1P)	1mM	MeOH	Calbiochem / #567727	keine Angaben
Sphingomyelin (SM)	1mM	MeOH	Sigma / S-0756	Huhn, Eigelb
Sphingosin (Sph)	6mM	EtOH	Sigma / #85621	aus Rinderhirn Cerebrosiden
Glucosyl Ceramid (GlcCer)	1mM	CHCl ₃ /MeOH 2:1	Matreya / #1521	Rind, Buttermilch
Ceramid (Cer)	1mM	CHCl ₃	Avanti / 860052 P	Schwein, Gehirn
Phosphatidylcholin / PC	1mM	CHCl ₃	Avanti / 840055 C	Rind, Leber
Phosphatidylethanolamin (PE)	1,3mM	nicht Angegeben	Avanti / 840026 C	Rind, Leber
Cerebroside	1mM	CHCl ₃ /MeOH 1:1	Avanti / 131303 P	Schwein, Gehirn
Sulfatide	1mM	CHCl ₃ /MeOH 2:1	Matreya / #1049	Rind
Lactosylceramid (LacCer)	1mM	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 5:1:0,1	Matreya / #1507	Rind, Buttermilch

6.1.3 Primärantikörper

gegen	Name / Tier	Epitop	von / Bestellnummer	Verdünnung (WB)
p23	Henriette / Kaninchen	rekombinante luminale Domäne	AK Wieland / Kai Sohn	1:10000
p23	M2 / Meerschweinchen	rekombinante luminale Domäne	AK Wieland / Sylvia Rieger	1:5000
p24	#1533 Elfride / Kaninchen	C-Terminus	AK Wieland / Kai Sohn	1:10000
p25	#1708 R2 61T / Kaninchen	C-Terminus	AK Wieland / Daniel Gommel	1:10000
p26	#2088 R2 100T / Kaninchen	C-Terminus	AK Wieland / Daniel Gommel	1:500
p27 (affi)	#2087 140iT / Kaninchen	C-Terminus	AK Wieland / Daniel Gommel	1:200
tp24	#2501 Glycerol / Kaninchen	C-Terminus	AK Wieland /	1:5000
Flotillin-1	#1768, anti-Flotillin-1 / Kaninchen	AA 277-286	Ioannis Gkantiragas	1:10000
Transferrin-Rezeptor	anti-Transferrin Rezeptor / Maus	N-Terminus	Invitrogen / #13-6890	1:500
FLAG M2 AB	FLAG / Maus (monoclonal IgG1)	FLAG-Epitop	Sigma / #F1804	1:1000
V5	V5 / Maus (monoclonal IgG2a)	V5-Epitop	Invitrogen / #R960-25	1:5000
Caveolin-1	Caveolin-1 / Kaninchen (polyclonal. N-Terminus)	N-Terminus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500
HIS	anti-HIS / Maus	Penta-His	Qiagen / #34660	1:500

6.1.4 Sekundärantikörper

gegen / Bestellnummer	gekoppelt an	von	Verdünnung
Kaninchen / A21076	Alexa FluorR 680	Molecular Probes (Invitrogen detection technologies)	1 :10000
Maus / A21057	Alexa FluorR 680	Molecular Probes (Invitrogen detection technologies)	1 :10000
Kaninchen / 111-007-003	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000
Maus / 115-035-003	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000
Meerschwein / 106-035-003	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000
Huhn	Meerrettichperoxidase	Dianova, Hamburg	1:5000

6.1.5 Plasmide

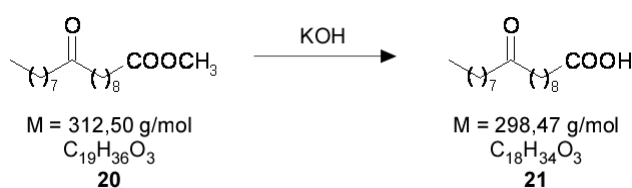
Protein	Konstrukt	von
CERT-FLAG	-	Kentaro Hanada, Tokio
PI-TPα-V5	-	Hein Sprong, Utrecht
PI-TPβ-V5	-	Hein Sprong, Utrecht
p23	pET-32-Xa/LIC-p23 #002 #1	Julien Bethune / AK Wieland
p24	pET-32-Xa/LIC-p24 #002 #1/#2	Julien Bethune / AK Wieland

6.2 Methoden

6.2.1 Synthese photolabiler Lipidvorläufer

6.2.1.1 9-(3-Octyl-3H-diazirin-3-yl)-nonansäure (10-ASA, 22) (Church et al. 1970; Thiele et al. 2000)

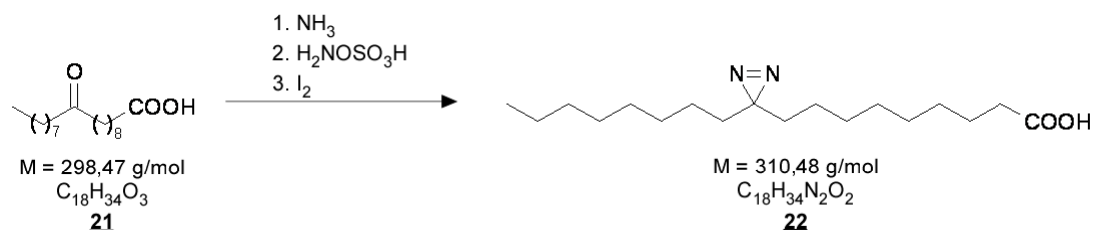
6.2.1.1.1 10-Oxo-octadecansäure (21)



20,62g (367,51mmol) Kaliumhydroxid und 4g (12,25mmol) des Esters (20) wurden in 250ml MeOH vorgelegt. Der Ansatz wurde 5h auf 75°C erwärmt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit 50ml Wasser versetzt und mit konz. Salzsäure auf pH 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde 5-mal mit 100ml Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Aufarbeitung in der nächsten Reaktion eingesetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan/Diethylether (1:1, v/v); Detektion: 20%ige H₂SO₄).

Ausbeute: 3,6g (11,52mmol, 94,04%)

6.2.1.1.2 9-(3-Octyl-3H-diazirin-3-yl)-nonansäure (10-ASA, **22**)



3,6g (11,52mmol) 10-Oxostearinsäure (**21**) wurden unter Schutzgas in einem ausgeheizten 500ml DHK in 250ml über Molekularsieb getrocknetem MeOH vorgelegt. Die Suspension wurde auf 4°C gekühlt. Anschließend wurde solange Ammoniak eingeleitet, bis die Lösung gesättigt war (ca. 1h). Der Verlauf der Sättigung konnte anhand der Volumenzunahme verfolgt bzw. das Ende der Sättigung am leichten Erwärmen des Molekularsiebs in einer hinterschalteten Waschflasche erkannt werden.

Zu der nun klaren Lösung wurden unter Schutzgas 2,4g (21,22mmol) Aminohydroxy-sulfonsäure zugesetzt. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur (RT) gebracht und 2h gerührt. Ausgefallenes Ammoniumsulfat wurde abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer auf ca. 50 ml eingeeengt. Zum Rückstand wurden 100ml MeOH und 5ml Triethylamin zugegeben.

Zu dieser Lösung wurde eine Lösung von 3g Iod in 50ml MeOH unter Rühren so lange zugetropt, bis sich die Lösung bei weiterer Zugabe nicht mehr entfärbte, sondern eine schwach gelbe Farbe annahm. Überschüssiges Iod wurde durch Zugabe einer konzentrierten Thiosulfatlösung zerstört, wodurch sich die Lösung klar färbte. Es wurden 100ml Wasser zugegeben und die Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 gebracht, wobei das Reaktionsgemisch wieder eine gelbe Farbe annahm. Die Lösung wurde 4-mal mit 100ml Essigester extrahiert. Zur besseren Trennung der beiden Phasen wurden gegebenenfalls 50ml einer gesättigten Kochsalzlösung zugesetzt. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Der Rückstand wurde umkristallisiert, wozu er in 60ml Hexan/Essigester 80:20 aufgenommen und solange auf 40°C erwärmt wurde, bis der Rückstand sich vollständig gelöst hatte. Über Nacht kristallisierte bei 4°C nicht umgesetztes Edukt aus. Der Überstand wurde durch Dekantieren abgetrennt und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ø = 2cm, h = 20cm, Hexan/Diethylether/Essigsäure (82:18:0,1, v/v)). Das so erhaltene Produkt wurde in MeOH umkristallisiert. Zur

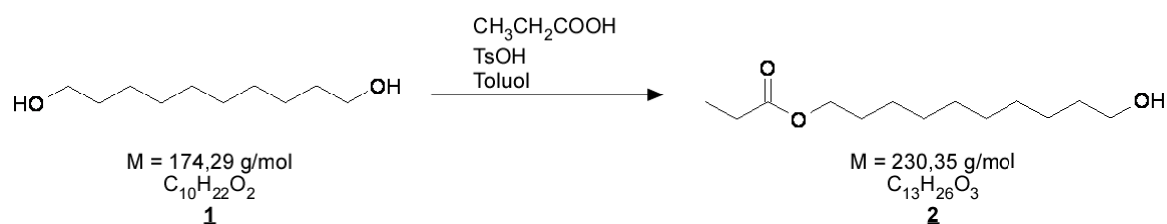
besseren Kristallisation wurden ein paar Tropfen Wasser zugesetzt, bis die Lösung eine milchig trübe Farbe annahm. Es folgte die Trocknung im Hochvakuum. Die Charakterisierung erfolgte mittels ESI-MS-MS (Neutral Loss 28, ES-, [M-H]⁻): m/z = 309,17 sowie photometrisch: UV (EtOH, λ_{max}) [nm] (ε): 350 (50), 367,5 (34,38)

Ausbeute: 1g (3,22mmol, 26,7%)

6.2.1.2 (E)-(2S,3R)-2-Amino-13-(3-butyl-3H-diazirin-3-yl)-tridec-4-en-1,3-diol (*D-erythro*-photoSph, **11**)

Die Synthese von *D-erythro*-photoSph erfolgte nach der von Dr. Christoph Thiele (MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) ausgearbeiteten Synthesestrategie.

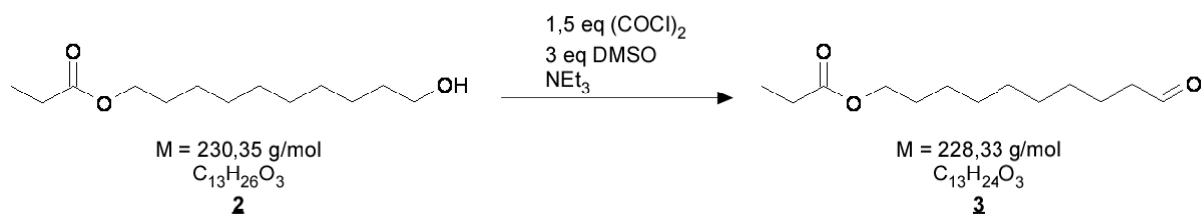
6.2.1.2.1 Decandiol-mono-propionat (**2**)



34,9g (0,2mol) 1,10-Decandiol (**1**) und 1g (5,25mmol) p-Toluolsulfonsäure Hydrat wurden in 250ml Toluol vorgelegt und unter Rückfluss gekocht, wobei sich der Ansatz komplett löste. Innerhalb von 5min wurden 7,47ml (0,1mol; M = 74,08 g/mol, Dichte = 0.992 g/ml) Propionsäure zugetropft. Das bei der Reaktion entstehende Wasser (ca. 1,8ml) wurde mittels Wasserabscheider entfernt. Nach ca. 2h (keine weitere Wasserabscheidung mehr beobachtbar) wurde der Ansatz auf 4°C gekühlt, wobei nicht umgesetztes 1,10-Decandiol auskristallisierte und abfiltriert wurde. Der Filterkuchen wurde mit eiskaltem Toluol gewaschen und die vereinigten organischen Phasen 3mal mit 200ml einer 0,1M NaHCO₃-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das farblose, ölige Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, Ø = 3cm, h = 40cm). Dabei wurde zunächst der bei der Reaktion entstandene Diester mit einem Lösungsmittelgemisch von Hexan/Ethylacetat (9:1, v/v) und anschließend das Monopropionat (**2**) mit Hexan/Ethylacetat (1:1, v/v) eluiert.

Ausbeute: 11,03 - 16,91g (48 - 73% bezogen auf die eingesetzte Menge an Propionsäure)

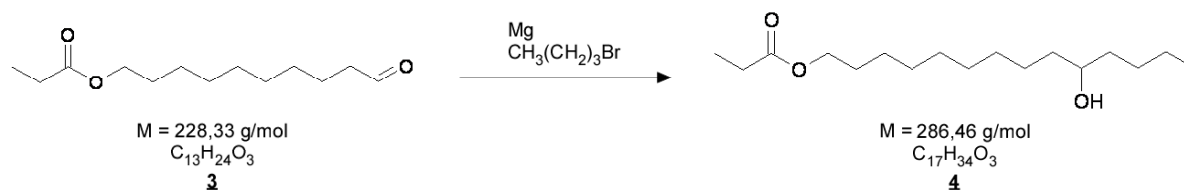
6.2.1.2.2 Propionyl-decan-1-ol-10-al (**3**)



8,25ml (97,4mmol; M=126,93g/mol, d=1,5g/ml, 1,53 Äquivalente) Oxalylchlorid wurden unter Stickstoffatmosphäre in 180ml über Molekularsieb getrocknetem CH₂Cl₂ gelöst und mit Hilfe eines EtOH/Trockeneisbades auf -78°C gebracht. Alle folgenden Schritte erfolgten bei -78°C. Unter Schutzgas wurden 3 Äquivalente (13,7ml, 191,1mmol; M=78,73g/mol, d=1,1g/ml) DMSO zugetropft. Nach 5min erfolgte unter heftigem Rühren die Zugabe von 14,67g (63,69mmol) Decandiol-mono-propionat (**2**). Der Ansatz wurde eine weitere Stunde gerührt und dann 54ml Triethylamin (6 Äquivalente; M=101,99g/mol, d=0,72g/ml - frisch geöffnete Flasche) zugegeben. Der Ansatz wurde auf RT gebracht, 200ml H₂O zugesetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit 100ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit jeweils 100ml einer 10%iger Citronensäurelösung, einer gesättigter Kochsalzlösung und einer 5%igen NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Ø = 3cm, h = 40cm Hexan/Ethylacetat (8:2, v/v)).

Ausbeute: 10,6g (46,42mmol, 72,9%)

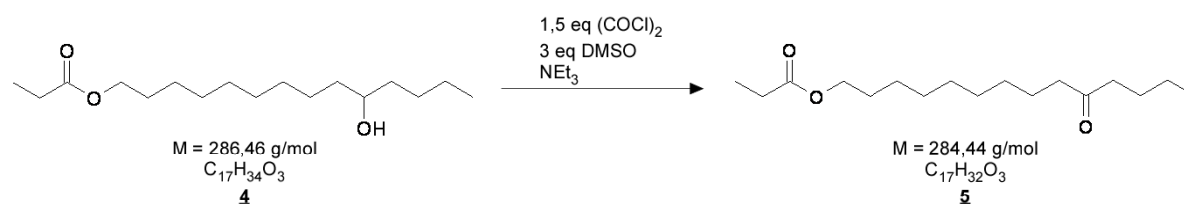
6.2.1.2.3 1-Propionyl-tetradecan-1,10-diol (**4**)



2,43g (0,1mol) Magnesiumspäne wurden in 100ml über Molekularsieb getrocknetem Diethylether vorgelegt und unter Rühren 13,7g (0,1mol, 10,79ml; $M=137,03\text{g/mol}$, $d=1,27\text{g/ml}$) 1-Brombutan zugegeben.

In einem zweiten Kolben wurden 10,6g (46,42mmol) des Aldehyds (**3**) in 120ml Diethylether vorgelegt. Der Ansatz wurde auf eine Temperatur von 0°C gebracht. Unter heftigem Rühren erfolgte dann zügig die Zugabe von 53ml (1.14 Äquivalente) der zuvor frisch hergestellten 1M Grignard-Lösung. Nach ca. 5min wurde das ausgefallene Salz durch Zugabe von 120ml 1M Salzsäure hydrolysiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und zuerst mit H_2O und dann mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das so erhaltene Rohprodukt (12,84g) wurde ohne weitere Aufarbeitung in der folgenden Swern-Oxidation eingesetzt.

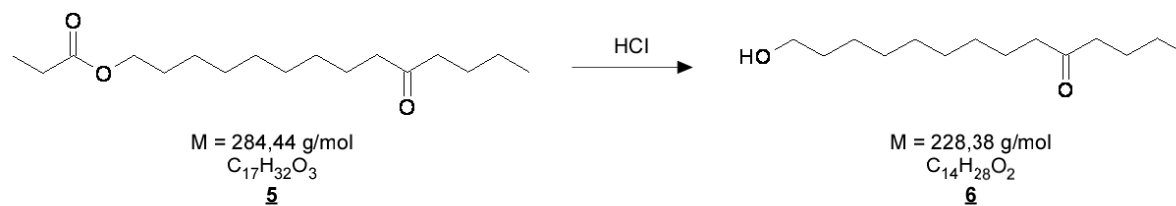
6.2.1.2.4 10-Keto-tetradecanyl-1-propionat (**5**)



Die Umwandlung des sekundären Alkohols (**4**) in das Keton (**5**) erfolgte mittels Swern-Oxidation (s. auch 6.2.1.2.2). 63,57mmol Oxalylchlorid (1,5 Äquivalente) wurde in 250ml getrocknetem CH_2Cl_2 gelöst und der Ansatz auf -78°C gebracht. Unter Schutzgas wurden 127,14mmol DMSO (3 Äquivalente von **4**) zugetropft. Nach 5min Rühren wurden 12,14g (42,38mmol) des Rohprodukts (**4**) zugegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde gerührt und unter Schutzgas 29,5ml Triethylamin (5 Äquivalente) zugegeben. Der Ansatz wurde auf RT gebracht und 100ml Kochsalzlösung (50%) zugesetzt. Die organische Phase wurde mit 100ml

einer 10%igen Citronensäurelösung extrahiert, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

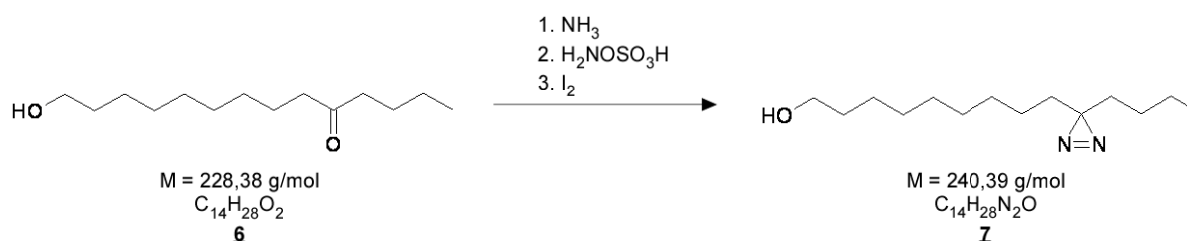
6.2.1.2.5 14-Hydroxy-tetradecan-5-on (**6**)



Das Rohprodukt (**5**) wurden in 150ml MeOH vorgelegt und 30ml einer 10M Kaliumhydroxid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde 3h bei 42°C gerührt. Es wurden 200ml H₂O zugesetzt und das sich abscheidende Öl von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde 2-mal mit 60ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer 1M Salzsäure sowie einer gesättigten Hydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan/Ethylacetat (6:2, v/v)). Das Produkt wurde in Hexan umkristallisiert. ESI-MS-MS (M+H): m/z = 228,86

Ausbeute: 3,41g (14,93mmol, 32,2% bezogen auf den in 6.2.1.2.3 eingesetzten Aldehyd **4**)

6.2.1.2.6 9-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-nonan-1-ol (**7**)



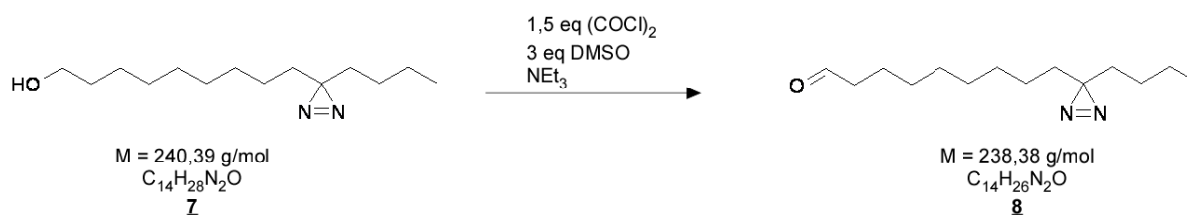
5g (21,89mmol) des Ketons (**6**) wurden in 200ml trockenem MeOH gelöst und auf 4°C gekühlt. Anschließend wurde solange Ammoniak eingeleitet, bis die Lösung gesättigt war. Es folgte die Zugabe von 4,46g (39,40mmol) der in 20ml MeOH gelösten Aminohydroxysulfonsäure, wobei sich der Ansatz trübte. Nach 10min wurde der Ansatz auf RT gebracht und für weitere 2,5h gerührt. Ausgefallenes (NH₄)₂SO₄ wurde abfiltriert und zum Filtrat 10ml Triethylamin zugesetzt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 50ml MeOH und 10ml Triethylamin aufgenommen.

5,56g (21,90mmol) Iod wurden in 200ml MeOH gelöst und unter Rühren zum Ansatz zugetropft bis keine Entfärbung mehr auftrat (ca. 0,4 Äquivalente; am Iod-Verbrauch kann die ungefähre Ausbeute abgeschätzt werden).

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 100ml Ethylacetat aufgenommen und mit 100ml H₂O extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch 2-mal mit 100ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (2-mal: SiO₂, Ø = 3cm, h = 45cm, Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v)). Die Produktfraktionen wurden durch UV-Spektroskopie ermittelt (charakteristische Absorption bei λ = 350nm), vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (weiße Kristalle).

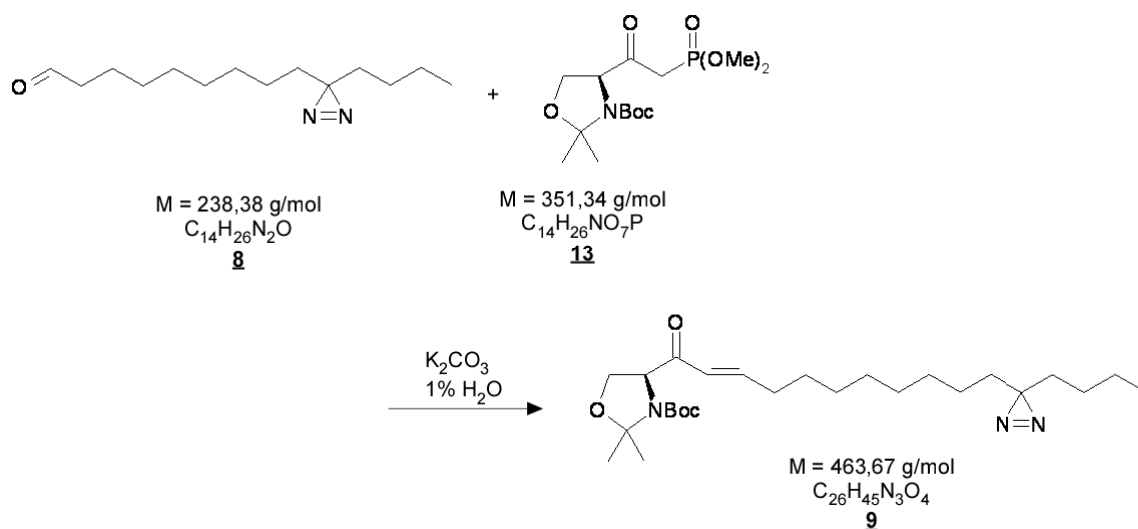
Ausbeute: 2,05g (8,53mmol, 39%)

6.2.1.2.7 9-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-nonal (**8**)



7 wurde durch Swern-Oxidation in **8** überführt (s. auch 6.2.1.2.2 und 6.2.1.2.4). Das Oxalylchlorid (1,5 Äquivalente von **7**) wurde unter Schutzgas in 180ml CH₂Cl₂ gelöst und auf – 78°C gebracht. Um zu verhindern, dass DMSO beim Abkühlen die Nadel verstopft, wurde das DMSO relativ rasch zugetropft. Nach 10 min wurde eine Lösung von 1,6g (6,7mmol) des Alkohols (**7**) in 10ml CH₂Cl₂ bei -78°C innerhalb von 5min zugegeben. Nach 1h Rühren folgte die Zugabe von 5 Äquivalenten Triethylamin. Der Ansatz wurde auf RT gebracht und mit 100ml H₂O versetzt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 3-mal mit 100ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit jeweils 100ml einer 10%igen Citronensäure sowie einer 5%igen NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand (1,5g) wurde gleich umgesetzt. Reaktionskontrolle mittels DC (Hexan/Ethylacetat (85:15, v/v)): 100%iger Umsatz

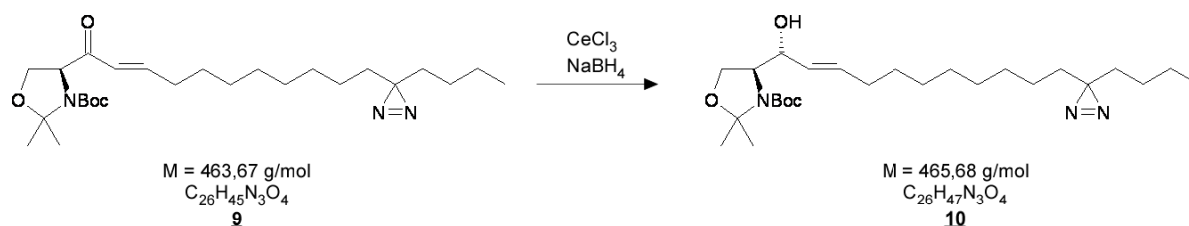
6.2.1.2.8 (S)-4-[(E)-11-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)undec-2-enoyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure-tert-butylester (**9**)



Die Umsetzung des Aldehyds (**8**) in das geschützte photoaktivierbare Keto-photoSph (**9**) erfolgte in einer Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion. Dazu wurden 2g (5,69mmol) Oxazolidin (**13**) in 38ml Acetonitril gelöst. Zum Ansatz wurden 1,52g (11mmol) K_2CO_3 und 380 μ l H_2O gegeben. Nach 5min wurden 1,5g des Rohproduktes (**8**) aus der vorherigen Reaktion in 6ml CH_2Cl_2 zugegeben und 6h bei 45°C gerührt. Die Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Es wurden 100ml einer 10%igen Citronensäurelösung zugegeben, die organische Phase abgetrennt und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , $\varnothing = 2\text{cm}$, $h = 25\text{cm}$, Hexan/Ethylacetat (85:15, v/v)).

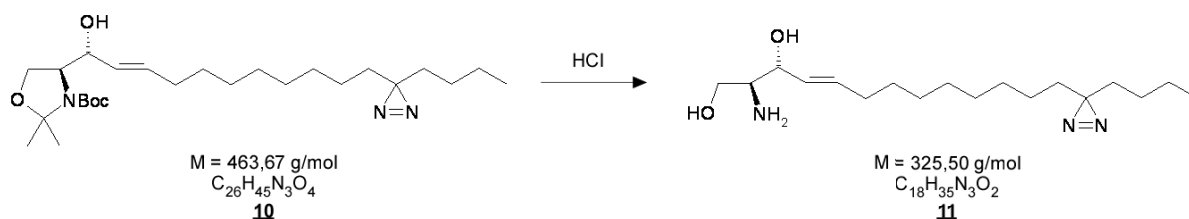
Ausbeute: 1,63g (3,52mmol, 52,5% bezogen auf **7**)

6.2.1.2.9 (S)-4-[(R)-(E)-11-(3-Butyl-3H-diazirin-3-yl)-1-hydroxy-undec-2-enyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure tert-butyl-ester (**10**)



1,75g (3,77mmol) des Ketons (**9**) und 1,64g (4,40mmol) $CeCl_3 \times 7 H_2O$ wurden in 200ml MeOH gelöst. Eine frisch angesetzte Lösung von 750mg (19,82mmol) $NaBH_4$ in 100ml eiskaltem MeOH wurde bei 4°C zügig zum Ansatz gespritzt. Der Ansatz wurde mit 100ml 10% Citronensäure versetzt und 3-mal mit 100ml CH_2Cl_2 extrahiert. Das Rohprodukt (1,5g) wurde ohne weitere Aufarbeitung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

6.2.1.2.10 (E)-(2S,3R)-2-Amino-13-(3-butyl-3H-diazirin-3-yl)-tridec-4-en-1,3-diol (14-Azi-Sphingosin) (**11**)



1,5g des Rohproduktes der vorherigen Reaktion (**10**) wurden in 75ml MeOH gelöst. Nach Zugabe von 22,5ml 6N HCl wurde der Ansatz für 6h bei 50°C gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in 100ml $CHCl_3$ aufgenommen. Nach Zugabe von 50ml H_2O wurde der pH-Wert mit Dimethylethylamin auf pH 8 eingestellt und die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wurde 3-mal mit 100ml H_2O zurückextrahiert, über $NaSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (2-mal: SiO_2 , $\varnothing = 2\text{cm}$, $h = 35\text{cm}$, $CH_2Cl_2/MeOH$ (5:1, v/v) und SiO_2 , $\varnothing = 2\text{cm}$, $h = 35\text{cm}$ $CH_2Cl_2/MeOH$ (9:1, v/v)).

Ausbeute: 192,1mg (0,59mmol, 15,7% bezogen auf **9**)

Charakterisierung:

$R_f(\text{SiO}_2, \text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2\text{N NH}_4\text{OH } 4:1:0,1) = 0,49$ *erythro*-photoSph (**11**)

$R_f(\text{SiO}_2, \text{CHCl}_3/\text{MeOH}/2\text{N NH}_4\text{OH } 4:1:0,1) = 0,39$ *threo*-photoSph

Detektion: 20% H_2SO_4

ESI-MS-MS (M+H): $m/z = 325,94$

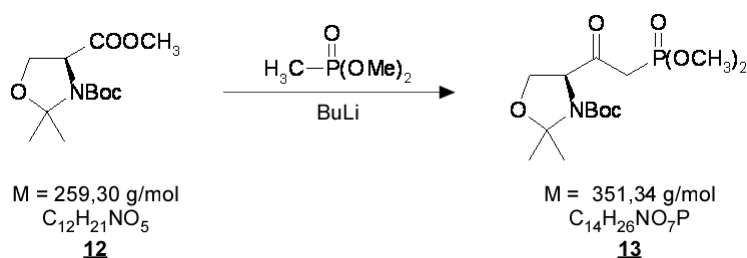
^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125,76MHz):

$\delta = 13,8$ (CH_3), 22,3 (CH_2), 23,8 (CH_2), 25,9 (CH_2), 29,0 (CH_2), 29,0 (CH_2), 29,2 (CH_2), 29,4 (CH_2), 29,4 (CH_2), 32,3 (CH_2), 32,6 (CH_2), 32,9 (CH_2), 56,7 (CHNH_2), 58,3 (CH_2OH), 70,3 (CHOH), 126,1 (CH), 135,0 (CH)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500,13MHz):

$\delta = 0,80$ -1,60 (m, 46H, CH_2), 0,79 (t, 3H, CH_3), 5,76 (m, CHCHCH_2 , $J_{4,5} = 14,9\text{Hz}$), 5,40 (m, CHOHCHCH), 4,57 (CHOH), 3,83 (CH_2OH), 3,47 (CHNH_2), 1,97 (m, CHCH_2).

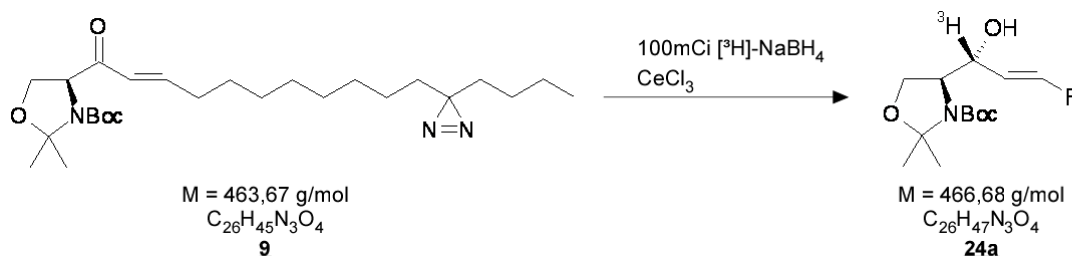
6.2.1.2.11 (S)-4-[2-(Dimethoxy-phosphoryl)-ethanoyl]-2,2-dimethyl-oxazolidin-3-carbonsäure tert-butylester (**13**)



Das 2,92ml (26,95mmol) Dimethylmethylphosphonat wurde unter Stickstoffatmosphäre in 40ml THF gelöst und auf -78°C gebracht. 9,36ml einer 2,5M BuLi-Lösung in Hexan (Sigma, #230707) wurden unter heftigem Rühren innerhalb von 10min zugegeben. Der Ansatz wurde weitere 30min bei -78°C gerührt, wobei das Reaktionsgemisch mehrmals aus dem Aceton/Trockeisbad genommen wurde, so dass die Lösung auf ca. -40 bis -50°C erwärmt wurde. Der Ansatz wurde erneut auf -78°C gekühlt und unter Schutzgas innerhalb von 5min zu einer Lösung von 5,0g (19,28mmol) Garner-Ester (**12**) in 20ml trockenem THF getropft. Die nun klare Lösung wurde für 30 min bei -78°C gerührt. Der Ansatz wurde unter Rühren zu 120ml einer eiskalten 10%igen Citronensäure-Lösung gegeben und die wässrige Phase mit Ethylacetat (4x100ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über NaSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Es folgte die säulenchromatographische Reinigung des öligen Rohprodukts (SiO_2 , $\varnothing = 3\text{cm}$, $h = 35\text{cm}$ Ethylacetat/Hexan (3:1, v/v). Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (leicht gelbliches, öliges Produkt). Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (Detektion: Iod-Kammer)

Ausbeute: 1,58g (5,46mmol, 28,3%)

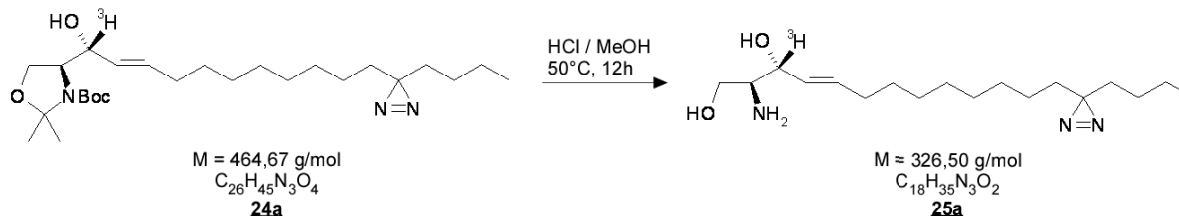
6.2.1.2.12 Synthese von geschütztem [³H]-D-erythro- und [³H]-L-threo-photoSph



3,2mg (7 μ mol) des geschützten Enons (**9**) wurde in 420 μ l MeOH gelöst und 75,5 μ l einer methanolischen CeCl₃ x 7 H₂O Lösung (4mg/100 μ l) zugesetzt. Der Ansatz wurde auf 4°C gekühlt und 100mCi, (1,25 μ mol, spezifische Aktivität: 80Ci/mmol) [³H]-NaBH₄ (ART 121B solid, Biotrend) in 62,2 μ l einer 0,1M NaOH Lösung aufgenommen und zum Ansatz gegeben. Um die Reaktion zu vervollständigen wurde der Ansatz über Nacht gerührt.

Es wurden 200 μ l einer 10%igen Citronensäurelösung sowie 1ml H₂O zugesetzt. Der Ansatz wurde 1h bei RT inkubiert und anschließend mit CH₂Cl₂ extrahiert (12mal mit je 3ml). Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel mittels eines sanften Stickstoffstroms verblasen. Der so erhaltene Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung in der folgenden Reaktion eingesetzt.

6.2.1.2.13 Synthese von [³H]-D-erythro- und [³H]-L-threo photoSph



Das Rohprodukt aus der vorherigen Reaktion wurde in 560 μ l MeOH gelöst und es wurden 165 μ l 6N HCl zugesetzt. Das Reaktionsgefäß (Wheaton-Röhrchen) wurde verschlossen (Teflonband, Parafilm) und im Thermoblock bei 50°C für 12h inkubiert. Zum Ansatz wurden 520 μ l einer 2N NH₄OH-Lösung gegeben und das Produkt mit CHCl₃ extrahiert (10mal mit je

2ml). Die organischen Phasen wurden vereinigt, eingeeengt und mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC-Platte, 20 x 20cm, 0.2mm Schichtdicke; Laufmittel: CHCl₃/MeOH/2N NH₄OH (40:10:1, v/v)) gereinigt. Die Detektion erfolgte mittels HyperfilmTM (ca. 12h Expositionszeit). Um radioaktiven Staub zu vermeiden, wurde die Dünnschichtchromatographieplatte mit H₂O benetzt (4 prominente Banden wurden abgekratzt). Abgekratztes Material wurde mit Ethanol eluiert.

Ausbeute: 64% der beiden Diastereomere **25a/b** (bezogen auf die eingesetzte Menge an Radioaktivität). Des Weiteren entstanden wesentliche Anteile an radioaktiv markierten Nebenprodukten.

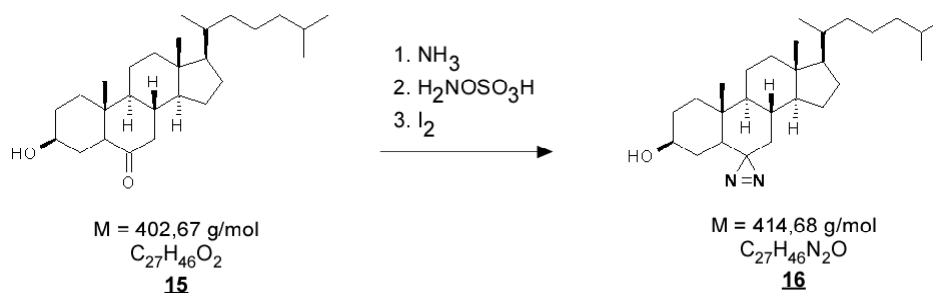
[³ H]-L- <i>threo</i> -photoSph (25b):	14mCi
[³ H]-D- <i>erythro</i> -photoSph (25a):	50mCi

Spezifische Aktivität: 20mCi/mmol

Die spezifische Aktivität des eingesetzten [³H]-NaBH₄ betrug 80Ci/mmol. Da bei der Reaktion jeweils nur ein [³H] auf das geschützte Keto-photoSph (**9**) übertragen wurde, beträgt die spezifische Aktivität der reduzierten Verbindung ¼ von der des eingesetzten [³H]-NaBH₄.

6.2.1.3 Synthese von [3 α -³H]-6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol ([³H]-photo-Chol, **18a**)

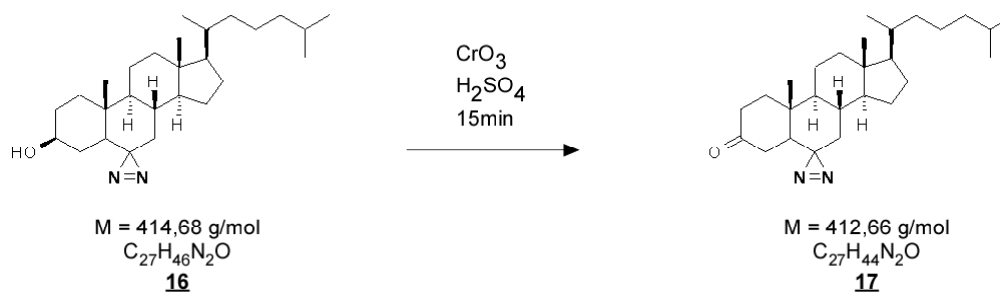
6.2.1.3.1 Synthese von 6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol (photoChol, **16**)



1g (2,48mmol) 6-Keto-cholesterin (**15**) wurden in 50ml trockenem MeOH gelöst, der Ansatz auf 4°C gebracht und die Lösung mit Ammoniak gesättigt. 1g Aminohydroxysulfonsäure wurde in 10ml trockenem MeOH gelöst und zügig zum Ansatz gespritzt. Nach 10min wurde das Eisbad entfernt und die Lösung für 2h bei RT gerührt. Ausgefallenes $(NH_4)_2SO_4$ wurde abfiltriert. Zum Filtrat wurden 0,5ml Triethylamin gegeben das Volumen auf ca. 20ml eingengt. Erneut ausgefallenes $(NH_4)_2SO_4$ wurde abfiltriert, das Lösungsmittel vollständig entfernt und der Rückstand in 30ml MeOH und 1ml Triethylamin aufgenommen. Das Iod wurde in MeOH gelöst und solange zugetropft, bis keine Entfärbung mehr auftrat. Zur Reaktionsmischung wurden 300ml H_2O gegeben und überschüssiges Iod mittels einer Spatelspitze Natriumthiosulfat reduziert. Es wurde mit 200ml Ethylacetat extrahiert (3x), das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , 2 x 20cm, Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v)). Das Produkt weist eine charakteristische Absorption bei 371nm ($\epsilon = 64$) und 354nm ($\epsilon = 70$) auf.

Ausbeute: 0.27g (0,65mmol, 26,3%)

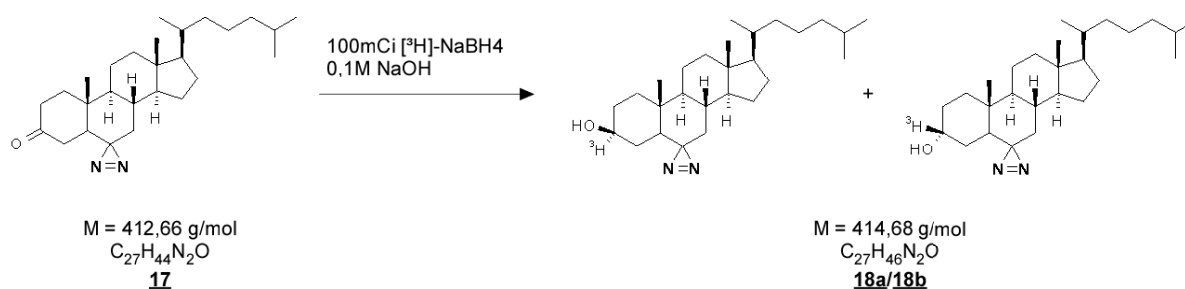
6.2.1.3.2 Synthese von 6-Azi-5 α -cholestan-3-on (3-Keto-photoChol, **17**)



100mg (1mmol) CrO_3 wurden in 1ml 10% H_2SO_4 gelöst. 60mg (144,7 μmol) photoChol (**16**) wurden in 10ml Aceton gelöst und 500 μl der frisch angesetzten CrO_3 -Lösung wurden innerhalb 10min unter Rühren zugegeben. Anschließend wurden 200 μl Isopropanol zugegeben, wobei die Lösung eine grüne Farbe annahm. Es wurden 20ml H_2O zugegeben und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Der Essigester wurde bei 50°C im Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , 2 x 30cm, Hexan/Ethylacetat (3:1, v/v)). Fraktionen mit Produktanteil wurden vereinigt, nach Entfernung des Lösungsmittels in Ethylacetat aufgenommen und die Konzentration mittels Photometer bestimmt (354nm, $\epsilon = 70$).

Ausbeute: 35,8mg (86,8 μmol , 60%)

6.2.1.3.3 Synthese von [3α - ^3H]-6-Azi-5 α -cholestan-3 β -ol ([^3H]-photo-Chol, **18**)



Für die Reaktion wurden 2,6mg (6,3 μmol) 3-Keto-photoChol (**17**) eingesetzt. Dazu wurde das

Lösungsmittel der 3-Keto-photoChol-Lösung aus 6.2.1.3.2 bei 50°C am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand für 2h an der Ölpumpe getrocknet. Der Rückstand wurde in 1ml THF aufgenommen. 100mCi (1,25µmol, spez. Aktivität: 80Ci/mmol) [³H]-NaBH₄ (ART 121B, Biotrend) wurden in 1ml 0,1M NaOH gelöst und unter heftigem Rühren zum Ansatz gegeben (RT). Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Um eventuell nicht umgesetztes [³H]-NaBH₄ zu zerstören, wurden zum Ansatz 300µl einer 1M HCl-Lösung gegeben (Abzug!). Das Gemisch wurde für eine weitere Stunde bei RT gerührt.

Das Produkt wurde mit Ethylacetat (5x1ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im sanften Stickstoffstrom eingeengt. Der Rückstand wurde auf eine PSC-Platte (20x20cm, 0.2mm Schichtdicke, MERCK) mit Konzentrierungszone aufgetragen und mit dem Laufmittel Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v) radioaktiv markierte Produkte voneinander getrennt.

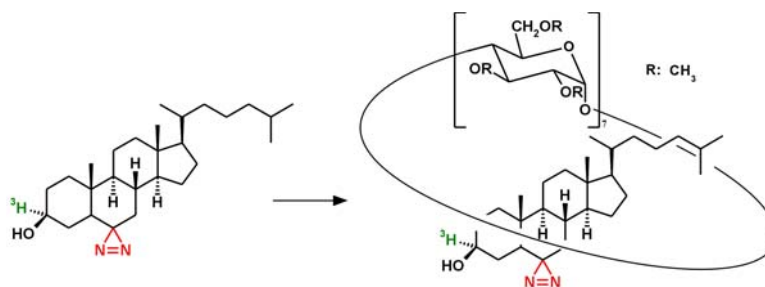
Zur Detektion von radioaktiven Produkten wurde ein für Tritium optimierter Röntgenfilm (HyperfilmTM, Amersham) für 12-48h bei -80°C exponiert. Das Kieselgel wurde von der DC-Platte gekratzt. Dazu wurde die Platte zuvor mit H₂O benetzt um die Bildung von radioaktivem Staub zu vermeiden (Abzug!). Das isolierte Kieselgel wurde in ein 15ml Greiner-Röhrchen überführt und 5-mal mit 2ml EtOH extrahiert. Kieselgelspuren in den Extrakten wurde durch Zentrifugieren entfernt. Der so erhaltene Überstand wurde bei -20°C gelagert. Zur Charakterisierung wurden 10nmol photoChol sowie 200µCi der [³H]-photoChol Lösung auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (PSC-Platte, MERCK) aufgetragen und mit zwei verschiedenen Laufmitteln entwickelt (Hexan/Ethylacetat (2:1, v/v) und CHCl₃/MeOH/H₂O (65:25:4, v/v)). Dabei zeigte [³H]-photoChol gleiche Laufeigenschaften wie das nicht radioaktive photoChol. Die Detektion erfolgte in der Iodkammer (Achtung: Bei Detektion mittels H₂SO₄ entsteht radioaktives H₂O!). Die spezifische Aktivität beträgt ¼ der spezifischen Aktivität des eingesetzten [³H]-NaBH₄. Das Produkt ist gegenüber Autoradiolyse stabil.

Ausbeute: **18a**: 80mCi

18b: 4mCi

Anmerkung: Neben **18a** und **18b** entstanden weitere radioaktive Nebenprodukte.

6.2.1.3.4 Herstellung von M β CD-komplexiertem [3 H]-photoChol



Zu 700 μ l einer Methyl- β -Cyclodextrin Lösung in H₂O (10mg/ml) wurden 200 μ l einer ethanolischen Lösung von [3 H]-photoChol (**18a**) (8,2 μ Ci/ μ l, 82nmol, spez. Aktivität 20Ci/mmol) gegeben. Die Lösung wurde für 10min bei 40°C im Ultraschallbad inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000rpm, 15min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und in der Speedvac getrocknet. Der Rückstand wurde in 400 μ l PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Endkonzentration betrug etwa 4 μ Ci/ μ l. M β CD-komplexiertes [3 H]-photoChol wurde bei -20°C gelagert.

6.3 Zellkultur

Die Kultivierung von CHO-Zellen erfolgte in α -modifiziertem Minimal-Essential-Medium (α -MEM), dem 9,1% (v/v) fötales Kälberserum (FCS) und je 500 Einheiten Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurden. Die Inkubation wurde bei 37°C, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung in einem Brutschrank der Firma Heraeus durchgeführt. COS7-, GM95- und MEB4-Zellen wurden entsprechend in DMEM gehalten. Für die photochemische Markierung von Zellen mit photoaktivierbaren Lipidvorläufern wurden den entsprechenden Medium 9,1% (v/v) lipidfreies fötales Kälberserum der Firma PAN-Biotech zugesetzt. Bei der Anzucht in Spinnerkultur wurden 1,5l Spinnerflaschen (Techne über Thermolux, Wertheim) benutzt.

6.4 Präparation von Golgi aus CHO- Zellen

Homogenisationspuffer:	250mM Saccharose 25mM Hepes/KOH pH 7,2
29% Saccharoselösung:	29% (w/v) Saccharose in 25mM Hepes/KOH pH 7,2
35% Saccharoselösung:	35% (w/v) Saccharose in 25mM Hepes/KOH pH 7,2
62% Saccharoselösung:	62% (w/v) Saccharose in 25mM Hepes/KOH pH 7,2

2l Spinnerkulturen (2x 1,5l) CHO-Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml kultiviert. Nach Isolierung der Zellen (600g_{av}, 10min, 4°C) erfolgte das Waschen dieser in 50ml PBS (2x) sowie in 50ml Homogenisationspuffer (1500g_{av}, 10min, 4°C). Um das Volumen zu bestimmen, wurden die Zellen in 10ml Homogenisationspuffer aufgenommen und in ein 50ml Greinerröhrchen überführt (Zellvolumen: ~7ml). Nach Aufnahme der Zellen im 4fachen Volumen an Homogenisationspuffer (Gesamtvolumen: 35ml) erfolgte deren Aufschluss im Balch Homogenisator. Dabei wurde das Homogenisat etwa 25-30 mal passagiert (ca. 30ml Homogenisat). Der Aufschluss wurde mit dem Mikroskop verfolgt. 15ml Homogenisat wurden mit 13,75ml 62% Saccharoselösung und 144 μ l 0,2M EDTA-Lösung pH 7,2 versetzt. Mit Hilfe eines Refraktometers erfolgte die Bestimmung der Saccharosekonzentration. Zur Einstellung auf eine Saccharosekonzentration

von 37% diente eine 62% Saccharose- bzw. eine 25mM Hepes pH 7,2 Lösung. In einem SW28 Röhrchen wurden zunächst 10ml Homogenisat, 15ml 35% Saccharoselösung und schließlich mit 10ml 29% Saccharoselösung überschichtet und für 2,5h bei 25000rpm und 4°C im SW28-Rotor zentrifugiert. Der Golgi reichert sich in der Interphase zwischen 35% und 29% Saccharose an und wurde durch Anstechen des Röhrchens mit einer Kanüle in eine 5ml Spritze gesaugt. Pro Gradient wurden ca. 3,6ml „gezapft“. Die gepoolten Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Aus insgesamt 3 Gradienten ergaben sich 11ml Golgi. Die Proteinkonzentration betrug 0,2mg/ml (Proteinbestimmung nach Bradford).

6.5 Transfektion mit Lipofectin

Zur Transfektion von Zellen diente Lipofectin. Es wurden 20µg cDNA und 100µl Lipofectin zur Transfektion einer 10cm-Schale verwendet. Die verwendete cDNA wurde bei 4°C gelagert. Die zu transfizierenden Zellen wurden über Nacht in Medium (mit Serum, ohne Antibiotikum) inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach Angabe des Herstellers: 20µg DNA wurden in 1ml Opti-MEM-Medium (ohne Serum und Antibiotika) gelöst. Parallel wurden 100µl Lipofectin zu 1ml Opti-MEM-Medium (ohne Serum und Antibiotika) gegeben und für 30-45min bei RT inkubiert. Die cDNA- und die Lipofectin-Lösung wurden vereinigt und das Gemisch für 10-15min inkubiert. Anschließend wurde dieses zu 8ml Opti-MEM (ohne Serum und Antibiotika) gegeben. Die Zellen wurden mit normalem Medium (ohne Serum und Antibiotikum) gewaschen und das Transfektionsmedium zugegeben. Nach 5h wurde das Medium entfernt und gegen Wachstums-Medium (mit Serum, ohne Antibiotika) ersetzt.

6.6 Photochemische *in vivo* Markierung von Zellen mit 10-ASA/[³H]-Cholin, [³H]-photoChol und [³H]-photoSph

Photoaffinitätsmarkierungen erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in 10cm-Petrischalen. Alle Lipid-Markierungen erfolgten in einem lipidfreien Medium. Im Fall von [³H]-Cholin-Markierungen wurde, sofern nicht anders angegeben, ein Lipid- und Cholin defizientes Medium verwendet.

Für Photoaffinitätsmarkierung kamen 200 μ Ci des jeweiligen Lipidvorläufers zum Einsatz. Das Lösungsmittel ethanolischer [³H]-Cholin- sowie [³H]-photoSph-Lösung wurde einen Tag zuvor in der SpeedVac entfernt, der Rückstand in absolutem Ethanol aufgenommen und bei -20°C gelagert (200 μ Ci/50 μ l Ethanol). Das Medium wurde vorgelegt und die zur Markierung verwendeten Lipidvorstufen zugegeben (10-ASA/[³H]-Cholin, M β CD-komplexiertes [³H]-photoChol bzw. [³H]-photoSph). Nach Waschen der Zellen mit 10ml PBS erfolgte die Zugabe des Mediums. Die Endkonzentration von Ethanol im Medium betrug 0,5%. Die Dauer der Markierung erfolgte wie im einzelnen angegeben.

Nach der Markierung wurden die Schalen auf Eis überführt. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C: Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit je 10ml PBS gewaschen und anschließend mit 5ml PBS überschichtet. Wenn angegeben, wurde die Schale für 15min mit UV-Licht bestrahlt. Der Abstand der UV-Lampe zur Schale betrug 10cm. Dabei wurde die Schale auf einen mit H₂O benetzten Metallblock im Eisbad positioniert. Nach der Bestrahlung wurde das PBS entfernt, die Zellen in 800 μ l PBS mittels Zellschaber geerntet und pelletiert (16000g_{av}, 5min, 4°C). Die Zelllyse erfolgte in 100 oder 200 μ l Lyse-Puffer (mit Protease Inhibitor Cocktail) bei 4°C für 1h. Kerne und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abgetrennt (3000g_{av}, 8min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

6.7 Photochemische *in vivo* Markierung von Zellen mit 10-ASA und D-erythro-photoSph, sowie die Verwendung von Inhibitoren

PDMP: 1 Teil einer 50mM PDMP-Lösung in EtOH wurde zu 25 Teilen einer 2mM BSA (*fatty acid free*) Lösung in H₂O gegeben. Das Gemisch wurde sofort gevortext und auf Eis überführt. Als Negativkontrolle wurde 1 Teil EtOH und 25 Teile BSA-Lösung verwendet und gleichermaßen verfahren. Bei einer Endkonzentration von 50µM PDMP betrug die Endkonzentration für EtOH im Medium 2,5%.

Fumonisin B1: Fumonisin B1 wurde aus einer 10mM Lösung in H₂O zum Medium gegeben.

Die Markierung von Zellen mit D-erythro-photoSph erfolgte wie unter 6.6 beschrieben. Dabei wurde der jeweilige Lipidvorläufer in 50µl EtOH gelöst und zu 10ml delipidiertem Medium gegeben. Zur Kreuzvernetzung sowie Aufarbeitung s. Abschnitt 6.6. Bei Verwendung von Inhibitoren der Sphingolipid Biosynthese wurde wie folgt verfahren: Die Inhibitoren wurden zu delipidiertem αMEM-Medium gegeben und die Zellen in diesem für die angegebene Zeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium in ein steriles Greiner-Röhrchen überführt, der photoaktivierbare Lipidvorläufer zugesetzt und das Medium nach Mischen erneut zu den Zellen gegeben.

6.8 Methanolische Lipidextraktion

Die Vorgehensweise zur Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie ist im folgenden für eine 3cm-Schale beschrieben: Die Schale wurde auf Eis überführt, das Medium entfernt und die Zellen mit 1ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 800 μ l PBS mittels Zellschaber von der Schale gelöst und pelletiert (16000g_{av}, 5min, 4°C). Es folgte die Aufnahme des Zellpellet in 10 μ l H₂O und die anschließende Zugabe von 100 μ l MeOH. Die Probe wurde für 15s gevortext und ausgefallene Proteine abzentrifugiert (16000g_{av}, 15min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Extraktion erfolgte in 1,5ml Eppendorfgefäßen.

6.9 Milde ammoniakalische Hydrolyse

Der methanolische Lipidextrakt (s. 6.8) von ca. 1×10^7 Zellen wurde verblasen und in 2ml MeOH aufgenommen. Zur Lösung wurden 2ml einer 25% NH₄OH-Lösung gegeben das Reaktionsgemisch für 3,5h bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels bei 37°C in einem sanften N₂-Strom.

6.10 Saure Lipidextraktion nach Bligh & Dyer (Bligh et al. 1959)

Saure Bligh & Dyer-Lösung (SBD-Lösung):

10ml	MeOH
5ml	CHCl ₃
75 μ l	konz. HCl

Die zu untersuchenden Proben wurden mit Millipore-Wasser auf ein Volumen von 500 μ l gebracht und in ein Wheaton-Glasröhrchen mit Teflon-Schraubverschluss überführt. Es folgte die Zugabe von 1,875ml SBD-Lösung, 500 μ l CHCl₃ und 500 μ l H₂O. Dabei wurde nach jeder Zugabe die Lösung gründlich durch Vortexen gemischt. In den folgenden Schritten wurden, um eine schnellere Phasentrennung zu erzielen, die Proben nach Extraktion zentrifugiert

(800g_{av}, 2min, 4°C). Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein zweites Glasröhrchen überführt. Zu dieser wurden 500µl H₂O und zur wässrigen Phase 500µl CHCl₃ gegeben. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurde die mit H₂O rückextrahierte CHCl₃-Phase abgenommen und in ein drittes Glasröhrchen überführt. Zur verbleibenden wässrigen Phase wurde dann die CHCl₃-Phase gegeben, mit der zuvor die wässrige Phase in Glasröhrchen 1 extrahiert worden war. Nach Vortexen und Zentrifugieren wurden die organischen Phasen vereinigt und im sanften Stickstoffstrom bei 37°C verblasen.

Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden die Proben in MeOH aufgenommen und durch Zugabe einer methanolischen Ammoniumacetat-Lösung auf eine Konzentration von 5mM Ammoniumacetat gebracht.

6.10.1 Massenspektrometrische Analyse- und quantitative Bestimmung von Membranlipiden

Die massenspektrometrischen Analysen wurden an einem QII-Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer nano-Elektrosprayquelle, der Firma Micromass durchgeführt. Die Borosilikatglaskapillaren wurden von der Firma Teer Coatings (England) bezogen. Die Vorläuferionen-Spektren wurden bei einer Cone-Spannung von 30V und einer Kollisionsenergie von 30eV bei einem Druck von $2,5 \times 10^{-3}$ mbar in der Kollisionskammer aufgenommen.

Zur quantitativen Bestimmung von Membranlipiden wurde die Lipidextraktion in Gegenwart von Phospholipidstandardlösungen durchgeführt. Dazu wurden vor der Lipidextraktion die Standards vorgelegt, zu denen dann die Proben gegeben wurden. Bei den Standards handelte es sich um synthetisch hergestellte Phospholipide der Firma Avanti Polar Lipids, welche in Chloroform/Methanol (1:2, v/v) gelöst waren. Die quantitative Bestimmung von Lipiden mittels Massenspektrometrie erfolgte wie beschrieben (Brugger et al. 2000).

6.11 Immunpräzipitation

Lyse-Puffer: 20mM Hepes/KOH pH 7.4
 100mM NaCl
 5mM EDTA
 1% Triton X-100
 0,5% Natrium Deoxycholat
 Protein Inhibitor Cocktail Tablette

Borat-Puffer: 0,2M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{H}_3\text{BO}_3$ pH 9

Herstellung von 100ml Borat-Puffer:

7,63g (0,02mol) Natriumtetraborat-10-hydrat wurden bei 37°C unter Rühren in 75ml H_2O gelöst. Durch Zugabe von 1,47 g Borsäure erfolgte die Einstellung des pH-Werts (pH 9 bei 25°C). Dazu wurde der Puffer erwärmt und zur Überprüfung des pH-Wertes auf RT abgekühlt. Der Puffer wurde auf 100ml aufgefüllt und bei RT gelagert.

Kopplungs-Puffer: Borat-Puffer mit 20mM Dimethylpimelidatdihydrochlorid (DMP)
 $M(\text{DMP}) = 259,2\text{g/mol}$
 5,184mg DMP/ml Borat-Puffer

Ethanolamin-Puffer: 0,2M Ethanolamin/HCl pH8
 $M(\text{Ethanolamin}) = 61,08\text{ g/mol}$
 $d(\text{Ethanolamin}) = 1,015\text{g/ml}$
 1,20ml Ethanolamin auf 100ml

2ml Protein A- bzw. Protein G-Sepharose sowie 2ml CL4B- Sepharose wurden zusammen gegeben und in 20%Ethanol bei 4°C gelagert (Volumen: 12ml). Die Verwendung von ProteinA- bzw. G-Sepharose erfolgte nach der unten aufgeführten Tabelle.

20µl Protein A bzw. Protein G-Sepharose (1:1 Gemisch mit CL4B) wurden 3-mal mit 1ml Lyse-Puffer gewaschen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation pelletiert (16000g_{av}, 1min, 4°C - dies gilt auch für die folgenden Schritte). Das Entfernen des Überstandes erfolgte durch Absaugen mit einer Kapillarspitze. Um zu vermeiden, dass nach Wasch- bzw. Inkubationsschritten ungewollt Sepharose mit abgenommen wurde, wurden jeweils ca. 10-20µl der Lösungen über der Sepharose stehen gelassen. Es folgte die Zugabe des Antikörperserums zur Protein A/G-Sepharose in 500µl Lyse-Puffer. Anschließend wurde für 90min bzw. über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Um ein Ausfallen des Borat-Puffers zu vermeiden, erfolgten die weiteren Schritte bei RT. Sepharose-Beads wurden pelletiert und 2-mal mit 1ml 0,2M Natriumboratlösung gewaschen. Kovalentes Vernetzen von Antikörpern mit Protein A/G-Sepharose wurde mit 1ml Kopplungs-Puffer (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen) für 30min bei RT durchgeführt. Anschließend wurde die Kopplungsreaktion gestoppt. Hierzu wurde 2-mal mit je 1ml einer 0,2M Ethanolaminlösung (pH 8) gewaschen und anschließend, nach Zugabe von 1ml 0,2M Ethanolaminlösung (pH 8), für weitere 2h bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Zuvor gelegentlich ausgefallener Boratpuffer konnte dabei wieder in Lösung gebracht werden.

Die Sepharose wurde einmal mit 1ml 0,1M Tris pH 8 (4°C) gewaschen (16000g_{av}, 3min, 4°C) wobei sich das Volumen der Sepharose reduzierte. Durch das darauf folgende Waschen mit Lyse-Puffer vergrößerte sich das Volumen der Sepharose jedoch wieder. Nach dem Waschen der Sepharose mit 1ml Lyse-Puffer (3-mal, 4°C) wurden diese in Lyse-Puffer bei 4°C gelagert. Bei längerer Lagerung wurde diesem 0,02% (w/v) Natriumazid zugesetzt.

Für die Immunpräzipitation wurden 100 bzw. 200µl Lysat (s. 1.8) zu den Beads gegeben und für 90min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Um ein Pelletieren von nicht aufgeschlossenem Zellmaterial zu verhindern, wurde im Folgenden bei 600g_{av} für 3min bei 4°C zentrifugiert. Die Sepharose Beads wurden abzentrifugiert und der Überstand zur Ermittlung der IP-Effizienz abgenommen. Anschließend wurde die Sepharose 5-mal mit Lyse-Puffer gewaschen (bei radioaktiven Proben wurden die Waschlösungen ausgezählt). Die Elution der an die Sepharose gebundenen Proteine erfolgte mit 30µl 3xProteinprobenpuffer für 5min bei 95°C.

Tabelle 3. Die Tabelle gibt Aufschluss darüber, welcher Antikörper mit Protein A bzw. Protein G-Sephrose kombiniert wurde.

Polyklonale Antikörper:			
	ProteinA	ProteinG	
Meerschweinchen	➤		
Maus		➤	
Kaninchen	➤		
Ratte		➤	
Monoklonale Antikörper:			
	Isotyp	ProteinA	ProteinG
Maus	IgG1		➤
	IgG2a	➤	
	IgG2b	➤	
	IgG3	➤	
Ratte	alle		➤

6.11.1 Proteingelektrophorese

3x Proteinprobenpuffer:	187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	6%	SDS (w/v)
	30%	Glycerin
	15%	β-Mercaptoethanol
	0,03%	(w/v) Bromphenolblau

Die Proben wurden mit 0,5 Volumenteilen 3x Proteinprobenpuffer versetzt und für 5min auf 95°C erhitzt, abzentrifugiert und sofern nicht gleich verwendet bei -20°C gelagert.

Molekulargewichtsstandard: Als Molekulargewichtsstandard wurde zum einen der Prestained Proteinmarker - Precision Plus Protein™ Standards All Blue - der Firma Biorad verwendet. Zum anderen kam der BMW-Marker (broad molecular range) der Firma Biorad zum Einsatz.

6.11.1.1 Invitrogen 10-20% Tris/Tricine Gele

10x Schagger Kathoden-Puffer: 1M Tris
1M Tricine
1% SDS (w/v)

Für alle radioaktiven Proteinmarkierungen wurden 10-20% Tris/Tricine Gele von Invitrogen verwendet. Als Laufpuffer diente 1x Schagger Kathoden-Puffer. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 90min bei 120V (~80mA).

6.11.1.2 SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli 1970)

Laufpuffer:	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	0,4%	SDS (w/v)

Entsprechend der gewünschten Acrylamidkonzentration wurde das Trenngel gemischt und nach kurzem Vortexen in die vorbereitete Apparatur gegossen. Acrylamid/Bisacrylamid wurde als Lösung erworben (Rotiphorese R Gel 30 37,5:1, Roth). Das Trenngel wurde sofort mit Isopropanol überschichtet. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für zwei Gele der Mini-ProteanII-Apparatur von BioRad, München. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Isopropanol mit Hilfe eines Filterpapiers entfernt, das frisch gemischte Sammelgel eingefüllt und der Kamm eingesetzt.

Acrylamidkonzentration	12%	16%	
	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
H₂O (ml)	3,4	2	3
1,5M Tris/HCl, pH 8,8 (ml)	2,5	2,5	-
0,5M Tris/HCl, pH 6,8 (ml)	-	-	1,25
10% SDS-Lösung (µl)	100	100	50
Acrylamid/Bisacrylamid (ml)	4	5,3	0,67
25% APS-Lösung (µl)	50	50	25
TEMED (µl)	5	5	5

Die Auftrennung der SDS-denaturierten Proteine erfolgte zunächst bei 100V (bis die Proteine das Trenngel erreichten) und anschließend bei 200V. Bei der Auftrennung der in Abschnitt 4.3 abgebildeten Crosslink-Produkte kamen - um eine bessere Auftrennung zu erzielen - 16cm² große 16%-Lämmli-Gele zum Einsatz, für die speziell angefertigte Glasplatten verwendet wurden. Die Gele hatten eine Dicke von 1mm, die Proteintaschen eine Breite von 3,5mm. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25mA (8-10h).

6.12 Western Blot-Analyse

Blot-Puffer:	25mM	Tris
	192mM	Glycin
	10%	Methanol

Der Transfer von über SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-Membran erfolgte wie angegeben: Die Membran wurde kurz mit MeOH benetzt und in den Blot-Puffer überführt. Zwei Schaumstoffkissen sowie vier Whatman-Filterpapiere (10 x 7,5cm) wurden ebenfalls in Blot-Puffer getränkt. Auf eines der beiden Schaumstoffkissen wurde ein Filterpapier und darauf die Membran platziert. Auf diese wurde das Gel, welches zuvor kurz in Blot-Puffer getaucht worden war, gelegt und mit zwei weiteren, ebenfalls mit Blotpuffer durchtränkten Filterpapieren bedeckt. Durch sanftes Ausstreichen konnten Luftblasen entfernt werden. Abschließend wurden auf die beiden Filterpapiere noch das zweite Schaumstoffkissen gelegt. Der so aufgebaute "Sandwich" wurde in eine Nass-Blot Apparatur der Firma Biorad gespannt. Der Transfer erfolgte für 1h bei 100V.

PBS-T:	35,7mM	Na ₂ HPO ₄
	14,3mM	KH ₂ PO ₄
	136mM	NaCl
	3mM	KCl
	0,05%	Tween (v/v)

ECL:	100mg	Luminol
	124µl	H ₂ O ₂
	20ml	1M Tris pH 8,5 (0,1M)
	(mit H ₂ O auf 200ml auffüllen)	

Enhancer:	11mg	p-Coumaric-Säure
	in 10ml DMSO	

Nach dem Transfer der durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Membran wurde diese wie folgt analysiert:

Falls erforderlich (Verwendung von BMW-Protein-Marker), wurde die Membran mit PonceauS (100mg PonceauS, 100ml H₂O, 1ml Eisessig) gefärbt. Die so sichtbar gewordenen Banden des verwendeten Protein-Markers wurden mit Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die Membran mit H₂O entfärbt. Zur Immundetektion wurde die Membran für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 5% Milchpulver in PBS-T blockiert. Die Membran wurde 10min mit PBS-T gewaschen und anschließend für 60min mit dem ersten Antikörper (verdünnt in PBS-T mit 1% BSA) inkubiert. Danach wurde die Membran für 10min mit PBS-T gewaschen und für 30-60min mit dem Zweit-Antikörper inkubiert (verdünnt in PBS-T mit 1% Milchpulver). Anschließend wurde die Membran 3-mal für jeweils 10min mit PBS-T gewaschen und das Signal mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Hierzu wurden zu 8ml ECL 2ml H₂O sowie 20µl Enhancer gegeben und die PVDF Membran darin kurz (1min) inkubiert. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden Fuji Medical X-Ray Filme (über Bechthold Röntgenhandel, Kelkheim) verwendet.

Zur Detektion von Proteinen mit Hilfe des LI-COR (Odyssey) wurde wie folgt verfahren: Als Marker diente ein *prestained* Protein-Marker. Zunächst erfolgte die Inkubation der Membran in 5% Milchpulver in PBS (1h, RT). Danach wurde die Membran 3-mal mit PBS-T gewaschen und mit dem entsprechenden Primäantikörper für 1h bei RT inkubiert. Nach Waschen der Membran mit PBS-T (3-mal für 10min) folgte deren Inkubation mit einem mit Alexa markierten Sekundäantikörper (30min, RT). Dieser wurde in PBS-T mit einer Konzentration von 0,01% SDS gelöst. Anschließend wurde noch 4-mal mit PBS-T gewaschen (je 5min) und noch 3-mal mit PBS (je 5min). Anschließend erfolgte die Erfassung der Signale mittels dem LI-COR-System und deren Auswertung mit der zugehörigen Quantifizierungs-Software.

6.13 Isolierung von *Detergent Resistant Membranes* (DRM)

TXNE-Puffer:	50mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	150mM	NaCl
	5mM	EDTA
	1mM	DTT
	1%	Triton X-100

Zellen von zwei 10cm-Schalen (ca. 1×10^7 Zellen) wurden in PBS (je 800 μ l) mittels Zellschaber abgelöst und pelletiert (16000g_{av}, 10min, 4°C). Die Zellpellets wurden vereinigt, sofort in 350 μ l TXNE-Lysepuffer resuspendiert und anschließend für 15min auf Eis inkubiert. 300 μ l davon wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 600 μ l Optiprep (60%) versetzt, durch auf- und abpipettieren gemischt und schließlich in ein SW60 Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde mit 2,5ml 28% Optiprep und 0,6ml TXNE-Puffer überschichtet und anschließend bei 35000rpm, bei 4°C für 3h zentrifugiert (SW60-Rotor). Es wurden von oben je 500 μ l Fraktionen gezapft.

6.14 Behandlung von Lipidextrakt mit Sphingomyelinase

Sphingomyelinase:	50% Glycerol
	0,25M Phosphat-Puffer, pH 8
	1,44mg Protein/ml (nach Lowry)
	174 units/mg Protein

Eine 10cm-Schale CHO-Zellen wurde mit 200 μ Ci [³H]-D-erythro-photoSph für 6h markiert und vom Zellpellet eine Lipidextraktion mit MeOH durchgeführt. Dazu wurde das Pellet in 100 μ l H₂O resuspendiert und durch Zugabe von 1ml Methanol die Lipide extrahiert (6.8). 25 μ l des Lipidextraktes wurden zum Verdau eingesetzt (~ 0,5 μ Ci). Dazu wurde zunächst das Lösungsmittel bei RT entfernt und der Rückstand in 25 μ l 0,1M Tris, pH 8 aufgenommen. Die SMase wurde 1:250 in 0,1M Tris pH8 verdünnt. 1 μ l der Verdünnung (1×10^{-3} units) wurde zum Verdau eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für die jeweils angegebene Zeit bei 37°C inkubiert. 2,5 μ l (0,05 μ Ci) des Ansatzes wurden auf eine Dünnschichtchromatographie-

Platte mit Konzentrierungszone aufgetragen und die Lipide mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v) aufgetrennt.

6.14.1 Transformation von DH5 α

LB-Medium (500ml): 5g NaCl
 5g Trypton
 2,5g Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract, DIFCO)
 mit H_2O aufgefüllt, autoklaviert

LB-Platten: wie LB-Medium + 1,5% Agar (Bacto™ Agar, DIFCO)

Ampicillin Stock-Lösung: 100mg/ml in H_2O (Lagerung bei: -20°C)

Tetracyclin Stock-Lösung: 5mg/ml in EtOH (Lagerung -20°C)

Zu 50 μl DH5 α Zellen (Life Technologies) wurden 0,5 μl des entsprechenden Konstrukts (s. 6.1.5) gegeben. Es wurde für 30min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 20sec bei 37°C im Wasserbad, danach wurden die Zellen sofort auf Eis überführt. Nach 2min wurde 450 μl LB-Medium (37°C , ohne Antibiotika) zugegeben und für 60-90min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert; 50-200 μl davon wurden ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4°C gelagert.

6.14.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Anreicherung und Isolierung der Plasmide wurden 100ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet. Die Bakterien wurden am folgenden Tag abzentrifugiert (3200 g_{av} , 15min, 4°C). Zur Isolierung des Plasmids wurde das MIDI-Kit NucleoBond PC100 der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die durch Isopropanol gefällte DNA wurde in Millipore H_2O aufgenommen und bei 4°C gelagert (Durch Einfrieren der DNA bei -20°C wurden

Expressionsverluste bei der Transfektion von Zellen mit Lipofectin festgestellt.).

6.15 Expression von rekombinantem p23 und p24

SOC-Medium:	20g	Trypton
	5g	Hefeextrakt (Bacto™ Yeast Extract, DIFCO)
	0,5g	NaCl
	2,5ml	1M KCl-Lösung

Nach Zugabe von 900ml H₂O wurde die Lösung autoklaviert.
Anschließend wurden folgende Lösungen zugegeben:

10ml	1M MgCl ₂
20ml	1M Glucose

wenn angegeben: Ampicillin (100µg/ml) und Tetracyclin (5µg/ml)

Lyse-Puffer:	50mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 8
	400mM	NaCl
	10mM	Imidazol
	4%	Triton X-100 (v/v)

Wasch-Puffer:	50mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 8
	400mM	NaCl
	50mM	Imidazol
	1%	Triton X-100 (v/v)

Elutions-Puffer:	50mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 8
	400mM	NaCl
	250mM	Imidazol
	1%	Triton X-100 (v/v)

IPTG Stock-Lösung:	0,1M in H ₂ O
---------------------------	--------------------------

6.15.1 Transformation von Origami

Origami Zellen besitzen eine Thioredoxin-Reduktase und Glutathion-Reduktase Defizienz; dadurch wird die Ausbildung von Schwefelbrücken im Zytoplasma begünstigt.

Zu 5µl Origami Zellen (Invitrogen) wurden 0,5µl des entsprechenden Plasmids gegeben und für 5min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30s im Wasserbad bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und sofort auf Eis überführt. Nach 2min wurden 80µl SOC Medium zugegeben und für 1h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 1h wurden die Bakterien ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.15.2 Expression von p23 und p24

4ml SOC-Medium mit Ampicillin und Tetracyclin wurden am Abend mit einer Einzelkolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Vorkultur zum Animpfen von 2l LB-Medium eingesetzt. Nach Erreichen einer Dichte von 0,6 bis 0,8 bei OD₆₀₀ (4-8h) wurden die Kolben auf 16°C gekühlt und mit IPTG induziert (Endkonzentration: 0,1mM). Die Expression erfolgte über Nacht bei 16°C. Am folgenden Tag wurden die Zellen isoliert (2400g_{av}, 20min, 4°C, Sorval/SLC6000) und das Pellet in knapp 30ml Lyse-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte durch Ni-NTA Affinitäts-Chromatographie. Hierzu wurden die Zellen zunächst aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte mit dem Microfluidizer M110L der Firma Microfluidics. Das daraus erhaltene Zelllysate wurde 2-mal zentrifugiert: 1. Entfernung von Zelltrümmern (SS34: 30000g, 15min, 4°C); 2. Entfernung unlöslicher Proteine (Type 50.2Ti: 100.000g, 1h, 4°C). Es folgte die Isolierung der Proteine aus dem Überstand mittels Ni-NTA-Beads. 1ml der Beads wurden zuvor in Lyse-Puffer equilibriert. Hierzu wurden die Beads 3-mal kurz mit 25ml Lyse-Puffer gewaschen (200g_{av}, 3min, 4°C). Schließlich wurde das Lysat zu den Ni-Beads gegeben und für 1h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Beads wurden 3-mal mit je 40ml Wasch-Puffer gewaschen (kurz, durch Überkopfschwenken), anschließend wurde das Protein eluiert. Hierzu wurden die Beads 3-mal mit 2ml Elutions-Puffer inkubiert (10min, 4°C auf dem Drehrad), die Beads pelletiert und der Überstand abgenommen.

Zur Überprüfung der Expression, der Aufreinigung und der Reinheit des rekombinanten

Proteins wurden Zelllysat, Wasch-, sowie Elutions-Fractionen auf ein 12% Lämmli-Gel aufgetragen und die Proteine nach Auftrennung mit Coomassie gefärbt.

Ausbeute (nach Lowry): p23#1: $1,142 \pm 0,23\text{mg/ml}$ (n=4)
p24#1: $0,234 \pm 0,06\text{mg/ml}$ (n=3)

Es wurden Eichprotein-Lösungen in SDS-Probenpuffer hergestellt ($50\text{fmol}/\mu\text{l}$) und diese nach SDS-PAGE und Western Blot mit einem gegen die 6fach-HIS-Sequenz gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abbildung 33).

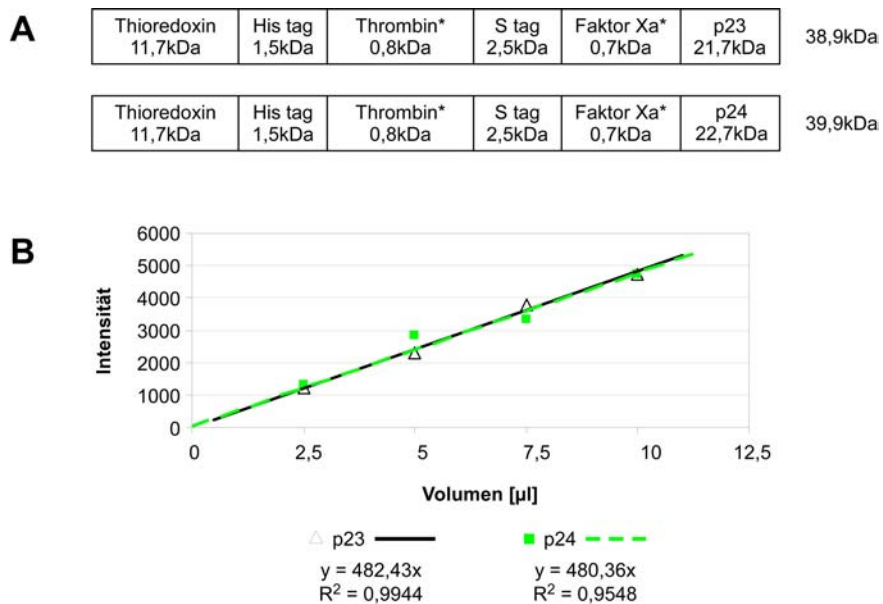


Abbildung 33. Eichproteinlösungen von p23 und p24. (A) Zur Herstellung von rekombinantem p23 und p24 wurden Konstrukte, kodierend für die skizzierten Proteine, verwendet. (B) Unterschiedliche Volumina der Eichprotein-Lösungen in 1x Probenpuffer ($50\text{fM}/\mu\text{l}$) wurden über SDS-PAGE (16%-Lämmli) aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurde ein gegen die HIS-Signalsequenz gerichteter Antikörper verwendet. Auswertung der Signale mittels LI-COR-System.

6.16 Proteinbestimmung nach Lowry

Diese Methode der Proteinbestimmung hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass störende Agenzien wie Imidazol und Triton X-100 durch eine TCA-Fällung entfernt werden.

Lowry A:	7mM	KNa-Tartrat (M=282,22 g/mol; 0,2g auf 100ml)
	0,94M	Na ₂ CO ₃ (M=105,99 g/mol; 10g auf 100ml)
	50ml	1N NaOH-Lösung
Lowry B:	7mM	KNa-Tartrat
	40mM	CuSO ₄ x5H ₂ O (M=249,69g/mol; 1g auf 100ml)
	10ml	1N NaOH -Lösung
Lowry C:	Folin-Ciocalteu-Reagenz 1:12,5 mit H ₂ O verdünnen (erst kurz vor Zugabe zusetzen)	

Als Standard diente eine BSA-Lösung (0,5mg/ml). Dabei kamen 2,5-30µg BSA zum Einsatz. Zu den Proben wurden 20µl 0,1% DOC zugegeben. Die Proben wurden mit H₂O auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt, und es folgte die Zugabe von 100µl einer 20%igen TCA-Lösung. Die Proben wurden für 20min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (16000g_{av}, 20min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Eppendorfgefäß zum Trocknen verkehrt herum auf ein Tuch gestellt. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß für 10min bei 37°C geschüttelt. Es folgte die Zugabe von 225µl Lowry A sowie 2,25µl einer 20%igen SDS (w/v)-Lösung. Es wurde für 10min bei 50°C unter Schütteln inkubiert, bis sich das Pellet gelöst hat. Die Proben wurden auf RT abgekühlt und 25µl Lowry B zugeben. Der Ansatz wurde erneut für 15min bei RT unter Schütteln inkubiert und schließlich 750µl Lowry C zugeben. Die Proben wurden direkt nach Zugabe von Lowry C gevortext und anschließend für 10min bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf RT (etwa 20min) erfolgte die Messung der Absorption bei 620nm.

6.17 Massenspektrometrischer Nachweis der Transmembrandomäne von rekombinantem p24

11 µg rekombinantes p24 wurde mit H₂O auf ein Volumen von 250 µl gebracht. Es wurden 500 µl MeOH sowie 250 µl CHCl₃ zugesetzt. Sofern nach Mischen keine homogene Lösung vorlag, wurde noch MeOH zugegeben. Anschließend wurde für 30 min bei 16000 g_{av} und 4 °C zentrifugiert. Es wurden 500 µl der oberen Phase abgenommen und 500 µl MeOH zugegeben. Nach Vortexen wurden ausgefallene Proteine isoliert (16000 g_{av}, 30 min, 4 °C), diese im Argon-Strom bei 37 °C getrocknet und schließlich in 49 µl 50 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl (1 µg) Trypsin (Endkonzentration 20 ng/µl) erfolgte der Verdau über Nacht bei 37 °C (Negativkontrolle: Puffer mit Trypsin). Die Proben wurden mit H₂O auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Der hydrophobe *Transmembran Span* (TMS) konnte mit 1 ml CHCl₃ extrahiert werden (Wheaton Glasröhrchen). Die organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt und das Lösungsmittel in einem sanften Argon-Strom bei 37 °C entfernt.

Der Nachweis des TMS erfolgte mittels *matrix assisted laser desorption ionization* (MALDI). Dabei wurde wie folgt verfahren: 3 Volumenteile einer gesättigte Lösung von Hydroxycyano-Zimtsäure in Aceton wurden mit einem Volumenteil einer Lösung von Nitrocellulose (10 g/l) in Aceton/Isopropanol 1:1 gemischt. 1 µl dieser Lösung diente als Matrix auf dem *Target*. In diesen Tropfen wurden sofort 0,25 µl einer 2%igen TFA-Lösung in H₂O (v/v) sowie 0,25 µl der zu vermessenden Probe gegeben. Nach Eintrocknen der Probe auf dem Target wurde dieser noch 3-mal mit einer 0,1% TFA-Lösung (4 °C) gewaschen (je 1 µl).

7 Abkürzungen

Neben den international gültigen Einheiten und chemischen Symbolen wurden folgende Abkürzungen verwendet:

APS	Ammoniumperoxodisulfat	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
ARF	adenosin ribosylation factor	h	Stunde
ARNO	ARF nucleotide-binding-site opener	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
Boc	Schutzgruppe, tert-Butyloxy-carbonyl-Rest	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
BSA	Rinderserumalbumin	IC	Intermediate Compartment
BuLi	Butyllithium	kDa	Kilodalton
Cer	Ceramid	MEM	minimal essential medium
CHO	Chinese hamster ovary	MeOH	Methanol
Chol	Cholesterin	NEF	Nukleotid-Austausch Faktor
CGN	cis-Golgi-Netzwerk	OD	optische Dichte
COP	Coat Protein	PAR	Parent Ion Scan, Vorläuferionenspektrum
DHK	Dreihalskolben	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	Dulbeccos minimal essential medium	PBS	phosphate buffered saline
DMP	Dimethylpimelidat	PC	Phosphatidylcholin
DRM	Detergent Resistant Membranes	PE	Phosphatidylethanolamin
DTT	Dithiothreitol	PI	Phosphatidylinositol
ECL	enhanced chemiluminescence	PM	Plasmamembran
E. coli	Escherichia coli	PS	Phosphatidylserin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PVDF	Polyvinylidendifluorid
ER	Endoplasmatisches Retikulum	rpm	rounds per minute
ERGIC	ER-Golgi-intermediäre Kompartiment	SDS	Natriumdodecylsulfat
ES	Gesamtionenspektrum	SM	Sphingomyelin
ESI-	Elektrospray-Ionisations-Tandem-	Sph	Sphingosin
MS/MS	Massenspektrometrie	Sph1P	Sphingosin-1 phosphat
FKS	Fötale Kälberserum	RT	Raumtemperatur
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	TGN	trans-Golgi-Netzwerk
g_{av}	Erdbeschleunigung	TCA	Trichloressigsäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat	TFA	Trifluoressigsäure
GlcCer	Glucosylceramid		

THF	Tetrahydrofuran
TMS	Transmembran Domäne
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan- 1,3-diol
TsOH	p-Toluolsulfonsäure Hydrat
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewicht/Volumen-Verhältnis

8 Literatur

Antonny, B., D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci und R. Schekman (2001a). "Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues." Nat Cell Biol **3**(6): 531-7.

Antonny, B. und R. Schekman (2001b). "ER export: public transportation by the COPII coach." Curr. Opin. Cell Biol. **13**: 438-443.

Bagnat, M., S. Keranen, A. Shevchenko, A. Shevchenko und K. Simons (2000). "Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3254-9.

Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt und R. Schekman (1994). "COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum." Cell **77**: 895-907.

Barlowe, C. und R. Schekman (1993). "SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER." Nature **365**(6444): 347-9.

Belden, W. J. und C. Barlowe (1996). "Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport." J. Biol. Chem. **271**: 26939-26946.

Bethune, J., M. Kol, J. Hoffmann, I. Reckmann, B. Brugger und F. Wieland (2006). "Coatomer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins." Mol Cell Biol **26**(21): 8011-21.

Bi, X., R. A. Corpina und J. Goldberg (2002). "Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat." Nature **419**(6904): 271-7.

Bigay, J., P. Gounon, S. Robineau und B. Antonny (2003). "Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature." Nature **426**(6966):

563-6.

Bligh, E. G. und W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can. J. Biochem. Physiol. **37**: 911-917.

Blum, R., P. Feick, M. Puype, J. Vandekerckhove, R. Klengel, W. Nastainczyk und I. Schulz (1996). "Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking." J Biol Chem **271**(29): 17183-9.

Blum, R., F. Pfeiffer, P. Feick, W. Nastainczyk, B. Kohler, K. H. Schafer und I. Schulz (1999). "Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23." J Cell Sci **112** (Pt 4): 537-48.

Bremser, M., W. Nickel, M. Schweikert, M. Ravazzola, M. Amherdt, C. A. Hughes, T. H. Sollner, J. E. Rothman und F. T. Wieland (1999). "Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors." Cell **96**(4): 495-506.

Brodsky, F. M., C. Y. Chen, C. Knuehl, M. C. Towler und D. E. Wakeham (2001). "Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **17**: 517-568.

Brown, D. A. und J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.

Brugger, B., C. Graham, I. Leibrecht, E. Mombelli, A. Jen, F. Wieland und R. Morris (2004). "The membrane domains occupied by glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein and Thy-1 differ in lipid composition." J Biol Chem **279**(9): 7530-6.

Brugger, B., R. Sandhoff, S. Wegehingel, K. Gorgas, J. Malsam, J. B. Helms, W. D. Lehmann, W. Nickel und F. T. Wieland (2000). "Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles." J Cell Biol **151**(3): 507-18.

Cheng, Z. J., R. D. Singh, D. K. Sharma, E. L. Holicky, K. Hanada, D. L. Marks und R. E.

Pagano (2006). "Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements." Mol Biol Cell **17**(7): 3197-210.

Chigorno, V., C. Giannotta, E. Ottico, M. Sciannamblo, J. Mikulak, A. Prinetti und S. Sonnino (2005). "Sphingolipid uptake by cultured cells: complex aggregates of cell sphingolipids with serum proteins and lipoproteins are rapidly catabolized." J Biol Chem **280**(4): 2668-75.

Chigorno, V., P. Palestini, M. Sciannamblo, V. Dolo, A. Pavan, G. Tettamanti und S. Sonnino (2000). "Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture." Eur J Biochem **267**(13): 4187-97.

Church, R. F. und M. J. Weiss (1970). "Diazirines. II. Synthesis and Properties of Small Functionalized Diazirine Molecules. Some Observations on The Reaction of a Diaziridine with the Iodine-Iodine Ion System." J. Org. Chem. **35**: 2465-2471.

Cosson, P. und F. Letourneur (1994). "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." Science **263**: 1629-1631.

Devaux, P. F. (1988). "Phospholipid flippases." FEBS Lett. **234**: 8-12.

Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J. P. Paccaud, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron und T. Nilsson (1998). "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer." J Cell Biol **140**(4): 751-65.

Donaldson, J. G., D. Cassel, R. A. Kahn und R. D. Klausner (1992a). "ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 6408-6412.

Donaldson, J. G., D. Finazzi und R. D. Klausner (1992b). "Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein." Nature **360**: 350-352.

Emery, G., R. G. Parton, M. Rojo und J. Gruenberg (2003). "The trans-membrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics." J Cell

Sci **116**(Pt 23): 4821-32.

Emery, G., M. Rojo und J. Gruenberg (1997). "The p24 family of transmembrane proteins at the interface between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus." Protoplasma **207**: 24-30.

Emery, G., M. Rojo und J. Gruenberg (2000). "Coupled transport of p24 family members." J. Cell Sci. **113**: 2507-2516.

Eroglu, C., P. Cronet, V. Panneels, P. Beaufils und I. Sinning (2002). "Functional reconstitution of purified metabotropic glutamate receptor expressed in the fly eye." EMBO Rep **3**(5): 491-6.

Fahrenholz, F., U. Klein und G. Gimpl (1995). "Conversion of the myometrial oxytocin receptor from low to high affinity state by cholesterol." Adv Exp Med Biol **395**: 311-9.

Fiedler, K., M. Veit, M. A. Stamnes und J. E. Rothman (1996). "Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors." Science **273**: 1396-1399.

Fra, A. M., M. Masserini, P. Palestini, S. Sonnino und K. Simons (1995). "A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface." FEBS Lett **375**(1-2): 11-4.

Franco, M., P. Chardin, M. Chabre und S. Paris (1993). "Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids." J. Biol. Chem. **268**: 24531-24534.

Fullekrug, J., T. Sukanuma, B. L. Tang, W. Hong, B. Storrie und T. Nilsson (1999). "Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members." Mol Biol Cell **10**(6): 1939-55.

Futerman, A. H. und Y. A. Hannun (2004). "The complex life of simple sphingolipids." EMBO Rep **5**(8): 777-82.

Futerman, A. H. und H. Riezman (2005). "The ins and outs of sphingolipid synthesis." Trends

Cell Biol **15**(6): 312-8.

Futerman, A. H., B. Stieger, A. L. Hubbard und R. E. Pagano (1990). "Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus." J Biol Chem **265**(15): 8650-7.

Gimpl, G., U. Klein, H. Reilander und F. Fahrenholz (1995). "Expression of the human oxytocin receptor in baculovirus-infected insect cells: high-affinity binding is induced by a cholesterol-cyclodextrin complex." Biochemistry **34**(42): 13794-801.

Gkantiragas, I., B. Brugger, E. Stuvén, D. Kaloyanova, X. Y. Li, K. Lohr, F. Lottspeich, F. T. Wieland und J. B. Helms (2001). "Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex." Mol Biol Cell **12**(6): 1819-33.

Goldberg, J. (1998). "Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching." Cell **95**: 237-248.

Gommel, D., L. Orci, E. M. Emig, M. J. Hannah, M. Ravazzola, W. Nickel, J. B. Helms, F. T. Wieland und K. Sohn (1999). "p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway." FEBS Lett **447**(2-3): 179-85.

Gommel, D. U., A. R. Memon, A. Heiss, F. Lottspeich, J. Pfannstiel, J. Lechner, C. Reinhard, J. B. Helms, W. Nickel und F. T. Wieland (2001). "Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23." Embo J **20**(23): 6751-60.

Haberkant, P. (2003). "Zur Interaktion von Transmembranproteinen mit Membranlipiden." Diplomarbeit, Universität Heidelberg.

Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa und M. Nishijima (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." Nature **426**(6968): 803-9.

Hara-Kuge, S., O. Kuge, L. Orci, M. Amherdt, M. Ravazzola, F. T. Wieland und J. E. Rothman (1994). "En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-

coated vesicles." J Cell Biol **124**(6): 883-92.

Harter, C. und C. Reinhard (2000). "The secretory pathway from history to the state of the art." Subcell. Biochem. **34**: 1-38.

Harter, C. und F. T. Wieland (1998). "A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11649-54.

Helms, J. B. und J. E. Rothman (1992). "Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF." Nature **360**: 352-354.

Huitema, K., J. van den Dikkenberg, J. F. Brouwers und J. C. Holthuis (2004). "Identification of a family of animal sphingomyelin synthases." Embo J **23**(1): 33-44.

Ichikawa, S., N. Nakajo, H. Sakiyama und Y. Hirabayashi (1994). "A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(7): 2703-7.

Jeckel, D., A. Karrenbauer, R. Birk, R. R. Schmidt und F. Wieland (1990). "Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi." FEBS Lett **261**(1): 155-7.

Jenne, N., K. Frey, B. Brugger und F. T. Wieland (2002). "Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway." J Biol Chem **277**(48): 46504-11.

Kebbewar, I. (2005). "The Biochemical, Immunological and Molecular Characterization of Human Sphingomyelin Synthase-1." Dissertation, Universität Heidelberg.

Kirchhausen, T. (2000a). "Clathrin." Annu. Rev. Biochem. **69**: 699-727.

Kirchhausen, T. (2000b). "Three ways to make a vesicle." Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **1**: 187-198.

Kuerschner, L., C. S. Ejsing, K. Ekroos, A. Shevchenko, K. I. Anderson und C. Thiele (2005). "Polyene-lipids: a new tool to image lipids." Nat Methods **2**(1): 39-45.

Kumagai, K., S. Yasuda, K. Okemoto, M. Nishijima, S. Kobayashi und K. Hanada (2005).

"CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides." J Biol Chem **280**(8): 6488-95.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(259): 680-5.

Lee, M. C., E. A. Miller, J. Goldberg, L. Orci und R. Schekman (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 87-123.

Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman und P. Cosson (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." Cell **79**: 1199-1207.

Malsam, J., D. Gommel, F. T. Wieland und W. Nickel (1999). "A role for ADP ribosylation factor in the control of cargo uptake during COPI-coated vesicle biogenesis." FEBS Lett **462**(3): 267-72.

Malsam, J., A. Satoh, L. Pelletier und G. Warren (2005). "Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles." Science **307**(5712): 1095-8.

Martin, S. und R. G. Parton (2005). "Caveolin, cholesterol, and lipid bodies." Semin Cell Dev Biol **16**(2): 163-74.

Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S. Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman und T. Yeung (1998). "COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes." Cell **93**: 263-275.

Merrill, A. H., Jr., G. van Echten, E. Wang und K. Sandhoff (1993). "Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ." J Biol Chem **268**(36): 27299-306.

Moreau, P. und C. Cassagne (1994). "Phospholipid trafficking and membrane biogenesis." Biochim. Biophys. Acta. **1197**: 257-290.

Munro, S. (1995). "An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein

retention." Embo J **14**(19): 4695-704.

Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia und K. Simons (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10339-43.

Nickel, W., B. Brügger und F. T. Wieland (2002). "Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding." J. Cell Sci. **115**: 3235-3240.

Nickel, W., J. Malsam, K. Gorgas, M. Ravazzola, N. Jenne, J. B. Helms und F. T. Wieland (1998). "Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro." J Cell Sci **111 (Pt 20)**: 3081-90.

Olayioye, M. A., S. Vehring, P. Muller, A. Herrmann, J. Schiller, C. Thiele, G. J. Lindeman, J. E. Visvader und T. Pomorski (2005). "StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein." J Biol Chem **280**(29): 27436-42.

Orci, L., M. S. Brown, J. L. Goldstein, L. M. Garcia-Segura und R. G. Anderson (1984). "Increase in membrane cholesterol: a possible trigger for degradation of HMG CoA reductase and crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells." Cell **36**: 835-845.

Orci, L., M. Starnes, M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, T. H. Söllner und J. E. Rothman (1997). "Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles." Cell **90**: 335-349.

Palade, G. (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." Science **189**: 347-358.

Parat, M. O. und P. L. Fox (2001). "Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible." J Biol Chem **276**(19): 15776-82.

Paris, S., S. Beraud-Dufour, S. Robineau, J. Bigay, B. Antonny, M. Chabre und P. Chardin (1997). "Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno." J Biol Chem **272**(35): 22221-6.

Pepperkok, R., J. A. Whitney, M. Gomez und T. E. Kreis (2000). "COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo." J. Cell Sci. **113**: 135-144.

Reinhard, C., C. Harter, M. Bremser, B. Brugger, K. Sohn, J. B. Helms und F. Wieland (1999). "Receptor-induced polymerization of coatamer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1224-8.

Rexach, M. F., M. Latterich und R. W. Schekman (1994). "Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles." J. Cell Biol. **126**: 1133-1148.

Robinson, M. S. und J. S. Bonifacino (2001). "Adaptor-related proteins." Curr. Opin. Cell Biol. **13**: 444-453.

Rojo, M., R. Pepperkok, G. Emery, R. Kellner, E. Stang, R. G. Parton und J. Gruenberg (1997). "Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport." J. Cell Biol. **139**: 1119-1135.

Rosenwald, A. G., C. E. Machamer und R. E. Pagano (1992). "Effects of a sphingolipid synthesis inhibitor on membrane transport through the secretory pathway." Biochemistry **31**(14): 3581-90.

Rothman, J. E. und F. T. Wieland (1996). "Protein sorting by transport vesicles." Science **272**(5259): 227-34.

Simons, K. und E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**: 569-572.

Simons, K. und D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-9.

Singer, S. J. und G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**: 720-731.

Snoek, G. T., C. M. Van Tiel und M. R. Egmond (2004). "Structure-function relationships of phosphatidylinositol transfer proteins: involvement of phosphorylation sites." Biochimie

86(11): 857-64.

Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J. B. Helms und F. T. Wieland (1996). "A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding." J Cell Biol **135**(5): 1239-48.

Sönnichsen, B., R. Watson, H. Clausen, T. Misteli und G. Warren (1996). "Sorting by COP I-coated vesicles under interphase and mitotic conditions." J. Cell Biol. **134**: 1411-1425.

Sprong, H., S. Degroote, T. Claessens, J. van Drunen, V. Oorschot, B. H. Westerink, Y. Hirabayashi, J. Klumperman, P. van der Sluijs und G. van Meer (2001). "Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex." J Cell Biol **155**(3): 369-80.

Stamnes, M. A., M. W. Craighead, M. H. Hoe, N. Lampen, S. Geromanos, P. Tempst und J. E. Rothman (1995). "An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 8011-8015.

Thiele, C., M. J. Hannah, F. Fahrenholz und W. B. Huttner (2000). "Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles." Nat Cell Biol **2**(1): 42-9.

Toth, B., A. Balla, H. Ma, Z. A. Knight, K. M. Shokat und T. Balla (2006). "Phosphatidylinositol 4-kinase IIIbeta regulates the transport of ceramide between the endoplasmic reticulum and Golgi." J Biol Chem.

van Meer, G. (1989). "Lipid traffic in animal cells." Annu. Rev. Cell Biol. **5**: 247-275.

van Meer, G. (1993). "Transport and sorting of membrane lipids." Curr. Opin. Cell Biol. **5**: 661-673.

van Meer, G. und J. C. Holthuis (2000). "Sphingolipid transport in eukaryotic cells." Biochim. Biophys. Acta **1486**: 145-170.

van Meer, G. und K. Simons (1988). "Lipid polarity and sorting in epithelial cells." J Cell

Biochem **36**(1): 51-8.

van Meer, G. und H. Sprong (2004). "Membrane lipids and vesicular traffic." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 373-8.

van Meer, G. und I. L. van Genderen (1994). "Intracellular lipid distribution, transport, and sorting. A cell biologist's need for physicochemical information." Subcell Biochem **23**: 1-24.

Van Tiel, C. M., C. Luberto, G. T. Snoek, Y. A. Hannun und K. W. Wirtz (2000). "Rapid replenishment of sphingomyelin in the plasma membrane upon degradation by sphingomyelinase in NIH3T3 cells overexpressing the phosphatidylinositol transfer protein beta." Biochem J **346 Pt 2**: 537-43.

Venkataraman, K. und A. H. Futerman (2001). "Comparison of the metabolism of L-erythro- and L-threo-sphingamines and ceramides in cultured cells and in subcellular fractions." Biochim Biophys Acta **1530**(2-3): 219-26.

Westerman, J., K. J. de Vries, P. Somerharju, J. L. Timmermans-Hereijgers, G. T. Snoek und K. W. Wirtz (1995). "A sphingomyelin-transferring protein from chicken liver. Use of pyrene-labeled phospholipid." J Biol Chem **270**(24): 14263-6.

Wirtz, K. W. (1997). "Phospholipid transfer proteins revisited." Biochem. J. **324**: 353-360.

Yoshihisa, T., C. Barlowe und R. Schekman (1993). "Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum." Science **259**(5100): 1466-8.

Zhao, L., J. B. Helms, B. Brugger, C. Harter, B. Martoglio, R. Graf, J. Brunner und F. T. Wieland (1997). "Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4418-23.

Zhao, L., J. B. Helms, J. Brunner und F. T. Wieland (1999). "GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23." J Biol Chem **274**(20): 14198-203.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Felix Wieland und Frau Dr. Britta Brügger für die Überlassung des interessanten Projektes, für die Möglichkeit in der freien Gestaltung meiner Arbeit und für die optimale Unterstützung während meiner Zeit am BZH. Für die Unterstützung und das Vertrauen bei der Anschaffung des β Imagers - welcher für meine Arbeit von unschätzbarem Wert war - möchte ich Felix, Britta und all denjenigen danken, die sich dafür eingesetzt haben.

Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt Dr. Christoph Thiele, der mich nicht nur bei der Synthese des photoaktivierbaren Sphingosins unterstützte, sondern mir darüber hinaus mit Tipps während meiner Arbeit zur Seite stand!

Ich danke Dr. Kentaro Hanada für die Bereitstellung des CERT-FLAG-Konstrukts und Dr. Hein Sprong für die Überlassung der PI-TP α/β -Konstrukte. Darüber hinaus möchte ich mich für die Anregungen und Diskussionen bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt Petra Ihrig für die hervorragende Einführung und Betreuung am MALDI.

Ich möchte dem gesamten Arbeitskreis für die nette Atmosphäre im Labor, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung - durch jeden auf seine Weise - danken. Ein herzliches Dankeschön gilt Iris Leibrecht und Ingeborg Reckmann für die praktische Unterstützung sowie für den reibungslosen Betrieb des 312er Labors. Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Oliver Schmitt und Sandra Zitzler für den alltäglichen Schabernack, das gemeinsame Lachen und die vielen schönen Momente.

Ich danke Frau Dr. Britta Brügger, Carolin Weimer, Julian Langer und Emily Stoops für das "turbo"-Korrekturlesen meiner Arbeit.

Es ist schön, wenn man zurückblicken und behaupten kann, dass man Freude an seiner Arbeit hatte!

Dafür danke ich all denen, die hierzu beigetragen haben, recht herzlich.