



Untersuchung der Lipidnachbarschaft von Sphingolipiden in Modellmembranen und Membranen kultivierter Zellen

Dissertation

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

vorgelegt von
Jörg Hörnschemeyer
aus Osnabrück

Bonn, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1997 bis November 2001 im Arbeitskreis von Herrn Professor Konrad Sandhoff am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie angefertigt.

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

1. Referent: Prof. Dr. Konrad Sandhoff
2. Referentin: PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 19.12.2001

Dank

Herrn Professor Dr. Konrad Sandhoff danke für die Ermöglichung und die Unterstützung dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Günter Schwarzmann gilt mein besonderer Dank für die Themenstellung dieser Dissertation, für seine Betreuung im Teilprojekt B5, die fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der vergangenen Jahre und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Petra Michel danke ich sehr herzlich für die tägliche Unterstützung im Kampf gegen den Laboralltag, für Filmentwicklungen, die Hilfe bei den Ultrazentrifugationsversuchen, diverse andere Dinge und natürlich für viele hervorragende Badminton-Doppel.

Meinen Laborkollegen Herrn Alexander von Coburg, sowie den Alumnis Frau Dr. Wiebke Möbius und Frau Dr. Ute Pütz danke ich für die gute Zusammenarbeit im Teilprojekt B5 und die hilfreichen Diskussionen inner- und außerhalb der Räume 3.134 und 3.136.

Herrn PD Dr. Gottfried Pohlentz sei für die Aufnahme der FAB-Massenspektren gedankt. Herrn Dr. Rudolf Hartmann und Frau Ulrike Weinert danke ich für die Messungen der 500 MHz-NMR-Spektren; den Mitarbeitern der Zentralanalytischen Abteilung der Chemschen Institute danke ich für die weiteren NMR- und MS-Untersuchungen.

Der Fa. *Micromass* bin ich überaus dankbar für die Möglichkeit einer ausgiebigen Beschäftigung mit Reparatur und Wartung der Massenspektrometer, sowie für die Erkenntnis, dass auch in einer Firma Bürokratie und (Nicht-)Kommunikation stattfinden. (*“When I make it there, I’m gonna make it anywhere ...”*)

Frau Michaela Wendeler danke ich besonders für das Korrekturlesen und für die Unterstützung vor und während des Zusammenschreibens dieser Arbeit.

Allen weiteren Kollegen sei für die gute und freundliche Atmosphäre in der Abteilung gedankt.

In memoriam N.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl-
amu	atomic mass unit
av.	average (bei Massenspektrometrie: Durchschnittsmolmasse)
BE	back-exchange
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat
Bq	Bequerel
Bz	Benzoyl-
[³ H]	Wasserstoffisotop der Masse 3 amu (Tritium)
[¹⁴ C]	Kohlenstoffisotop der Masse 14 amu
Cer	Ceramid (<i>N</i> -Acylsphingosin)
Ci	Curie
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamid
DMPG	Dimyristoyl-L- α -phosphatidylglycerol
DOPC	Dioleoyl-L- α -phosphatidylcholin
DOPE	Dioleoyl-L- α -phosphatidylethanolamin
DPPS	Dipalmitoyl-L- α -phosphatidyl-L-serin
ESI-TOF-MS	Electrospray ionisation-time-of-flight-mass spectrometry
ex.	exact (bei Massenspektrometrie: Monoisotopenmolmasse)
FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectrometry
FKS	Fötales Kälberserum
Gal	Galaktosyl-
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galaktosaminyll-
Gal-S-GlcCer	Galaktosyl-thio-glucosylceramid
GbOse ₃ Cer	Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GbOse ₃ -S-Cer	Globotriaosyl-thio-ceramid
GD1a	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
Glc	Glucosyl-
GlcCer	Glc β 1 \rightarrow 1Cer
Glc-S-Cer	Glucosyl-thio-ceramid
Glc-SO-Cer	Glucosyl-thio-ceramid-Sulfoxid
GM1	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM2	GalNAc β 1 \rightarrow 4(NeuAc α 2 \rightarrow 3)Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GM3	NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer
GPI	Glykosyl-phosphatidyl-inositol
GSC	Glucosyl-thio-ceramid
GSL	Glykosphingolipide

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-2-piperazinethansulfonsäure
HMEM	HEPES-buffered minimal essential medium
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
Hünig-Base	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
K _p	Siedepunkt
Lac	Laktosyl-
LacCer	Galβ1→4Glcβ1→1Cer
Lac-S-Cer	Laktosyl-thio-ceramid
l _d -phase	liquid-disordered phase
l _o -phase	liquid-ordered phase
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight-mass spectrometry
MEM	Minimal essential medium
MS	Massenspektrometrie
M _w	Molekulargewicht
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NeuAc	<i>N</i> -Acetyl-neuraminsäure, Sialyl-
NMR	Nuclear magnetic resonance, Kernresonanzspektroskopie
<i>N</i> -O-SM	<i>N</i> -Oleoyl-Sphingomyelin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
Ph	Phenyl-
PI	Phosphatidylinositol
PM	Plasmamembran
PS	Phosphatidyl-L-serin
R _f	Dünnschichtchromatographischer Retentionswert
RP	Reversed Phase- (Umkehrphasen-)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (Zimmertemperatur)
SGM3	„Thio“-GM3
SM	Sphingomyelin (<i>N</i> -Acyl-D-Sphingosin-1-phosphorylcholin)
Sphingosin	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-Amino-octadec-4-en-1,3-diol
Tab.	Tabelle
TGN	Trans Golgi Netzwerk
TosOH	<i>p</i> -Toluensulfonsäure
TPD-	Trifluormethylphenyldiazininyl-
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Eukaryontische Zellmembranen.....	3
2.2	Mikrodomänen bzw. „Rafts“ und Caveolae	6
2.2.1	Methoden zur Untersuchung von „rafts“	8
2.3	Zielsetzung	11
3	Ergebnisse	13
3.1	Synthesen	13
3.1.1	Synthese der C7-TPD-Fettsäure und C7-Glucosyl-thio-ceramid-Photosonde	13
3.1.2	Synthese der Sphingomyelin-Sonden.....	19
3.2	Liposomenexperimente.....	21
3.2.1	Photoaktivierbare Glucosyl-thio-ceramide und ihre Kopplungsprodukte	21
3.2.1.1	Dünnschichtchromatographische Charakterisierung	21
3.2.1.2	Charakterisierung der Photokopplungsprodukte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie	30
3.2.1.3	Untersuchungen zur Photoinsertion in Wasser.....	31
3.2.2	Liposomenexperimente mit den Sphingomyelin-Sonden	35
3.2.2.1	Dünnschichtchromatographische Charakterisierung	35
3.3	Charakterisierung mit MALDI-/ESI-TOF-Massenspektrometrie.....	39
3.3.1	Extraktionsverfahren	39
3.3.2	Massenspektrometrisch nachgewiesene Kopplungsprodukte.....	41
3.3.2.1	Glucosyl-thio-ceramid-Sonden.....	41
3.3.2.2	Sphingomyelin-Sonden	43
3.4	Zellkulturexperimente.....	44
3.4.1	Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen Glucosyl-thio-ceramide in Membranen humaner Fibroblasten	44
3.4.1.1	Einbau in Zellmembranen	44
3.4.1.2	Stoffwechseluntersuchungen.....	45
3.4.1.3	Plasmamembran-Markierung.....	48
3.4.1.4	Photomarkierungen im Zuge der Endozytose.....	55
3.4.1.5	Untersuchungen zur Photokopplung der Glc-S-Cer-Sonden mit Wasser in Zellmembranen	64
3.4.1.6	Untersuchung der Insertionsprodukte auf inneren Membranen von Niemann-Pick Typ C- Zellen.....	66
3.4.2	Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen Sphingomyeline in Membranen humaner Fibroblasten	68
3.4.2.1	Einbau der SM-Sonden in Zellmembranen.....	68
3.4.2.2	Stoffwechseluntersuchungen der Sphingomyelin-Sonden	68

3.4.2.3	Plasmamembran-Markierung	72
3.4.2.4	Endozytose-Untersuchungen	76
3.4.2.5	Ultrazentrifugationsexperimente	79
4	Diskussion	81
4.1	Synthese der Trifluormethylphenyldiaziriny (TPD)-Sonden.....	82
4.2	Die Lipidnachbarschaft der Sonden in Modellmembranen	83
4.2.1	Glc-S-Cer-Sonden	83
4.3.2	Sphingomyelin-Sonden	84
4.3	Einbau der Sonden in Membranen kultivierter Fibroblasten und Stoffwechseluntersuchungen	86
4.3.1	Glucosyl-thio-ceramid-Sonden	86
4.3.2	Sphingomyelin-Sonden	87
4.4	Die Lipidnachbarschaft der Sonden in Zellmembranen	88
4.4.1	Glucosyl-thio-ceramid-Sonden	89
4.4.2	Spingomyelin-Photosonden.....	93
5	Material und Methoden.....	96
5.1	Material	96
5.1.1	Geräte	96
5.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	96
5.1.3	Synthesen	97
5.1.3.1	Synthese der photoaktivierbaren C ₇ -Fettsäure	97
5.1.3.2	Synthese der photoaktivierbaren Sphingolipide	106
5.1.4	Biologische Materialien.....	111
5.1.4.1	Verwendete Zellkulturen.....	111
5.1.4.2	Zellkulturmedien und Puffer.....	111
5.2	Methoden	113
5.2.1	Analytische Methoden	113
5.2.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	113
5.2.1.2	Quantifizierung der Radioaktivität.....	114
5.2.1.3	NMR-Spektroskopie (Nuclear magnetic resonance)	114
5.2.1.4	Massenspektrometrie (MS)	114
5.2.1.5	Proteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blue G-250.....	115
5.2.2	Präparative Methoden	116
5.2.2.1	Darstellung der Liposomen.....	116
5.2.2.2	Belichtung der Liposomen	116
5.2.2.3	Extraktion der Photokopplungsprodukte aus Kieselgel-Platten für die Massenspektrometrie	116
5.2.3	Einbau- und Stoffwechselstudien	117
5.2.3.1	Herstellung der Sphingolipid-Albumin-Komplexe	117

5.2.3.2	Inkubation der Zellen mit Lipid/BSA-Komplexen.....	117
5.2.3.3	Re-extraktion photoaktivierbarer Lipide aus der Plasmamembran („ <i>back-exchange</i> “) ...	117
5.2.3.4	Belichtung der Zellen	118
5.2.3.5	Zellernte	118
5.2.3.6	Lipidextraktion	118
5.2.3.7	Entsalzen von Reaktionsansätzen und Abtrennung von wasserlöslichen Komponenten	118
5.2.3.8	Alkalische Methanolyse.....	119
5.2.3.9	Trennung von anionischen und ungeladenen Lipiden mittels Anionenaustauscherchromatographie	119
5.2.3.10	Ultrazentrifugationsexperimente	119
6	Literaturverzeichnis.....	121

1 Zusammenfassung

Die Membranen von eukaryontischen Zellen und ihren Organellen sind aus einer Vielzahl von verschiedenen Lipid- und Proteinmolekülen zusammengesetzt. Dabei kann es innerhalb der Membranhälften der Lipiddoppelschicht zu einer bestimmten Anordnung bzw. einer Domänenbildung von Lipiden und Proteinen kommen. Die Untersuchung der genauen lateralen Verteilung einzelner Lipide in der Membran und der Sortierprozesse, die während des Transports innerhalb der Zelle und der Bildung solcher Membrandomänen stattfinden, ist derzeit Gegenstand der aktuellen Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich die Lipidumgebung von Sphingolipiden im Zuge ihrer Endozytose in kultivierten Zellen verändert. Es wurden dazu radioaktiv-markierte Glucosyl-thio-ceramide und Sphingomyeline synthetisiert, die in der Acylkette eine photolabile Trifluormethylphenyldiaziriny (TPD)-Gruppe tragen und nach Belichtung kovalent an eines ihrer direkt benachbarten Moleküle binden. Hiermit wurden zunächst in Modellmembranen Kopplungsprodukte hergestellt, die mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert werden konnten und die bei den anschließenden Zellversuchen als Referenzen dienten.

Die kurzkettigen Glucosyl-thio-ceramide konnten an Albumin gebunden und aus den resultierenden Komplexen in die Plasmamembran von Fibroblasten inkorporiert werden. Aufgrund der thioglykosidischen Bindung kann die [¹⁴C]-Glucose-Kopfgruppe nicht durch die lysosomale Glucocerebrosidase abgespalten werden, so dass die Markierung auch im Zuge der Endozytose erhalten blieb. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die abbauresistenten Glc-S-Cer-Sonden innerhalb der Zellen im Golgi-Apparat postendozytisch glykosyliert wurden. Dabei wurde festgestellt, dass die Einbau- und Stoffwechselraten mit zunehmender Kettenlänge der Photosonde abnehmen.

In den anschließenden Photomarkierungen konnte mit den photoaktivierbaren Glucosyl-thio-ceramiden nachgewiesen werden, dass sich diese nach Inkorporation in die Plasmamembran von kultivierten Fibroblasten bei 7°C in einer sehr Cholesterol-reichen Umgebung befinden, die als Mikrodomänen bzw. „rafts“ beschrieben wird. Hingegen wurden wenig Kopplungsprodukte mit den anderen Hauptbestandteilen der extrazellulär-orientierten Membranhälfte wie Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (SM) erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass diese bevorzugte Nachbarschaft nur in zellulären Membranen existiert, nicht aber in Modellmembranen, wo keine besondere Affinität der Glc-S-Cer-Sonden zum Cholesterol vorlag. Nach Endozytose der Sonden wurden diese innerhalb der ersten Minuten aus ihrer Lipidumgebung in der Plasmamembran entfernt und befanden sich anschließend auf intrazellulären Vesikeln und inneren Membranen, in de-

nen sie von einer gänzlich anderen Lipidnachbarschaft umgeben sind. Nach Belichtung der endozytierten Sonden konnten vermehrt Kopplungsprodukte mit Phosphoglycerolipiden wie PC und Phosphatidylethanolamin (PE) nachgewiesen werden.

Mit photolabilen Sphingomyelinen konnten ebenfalls in Liposomen Kopplungsprodukte als Referenzverbindungen dargestellt werden, die mittels Dünnschichtchromatographie und z.T. auch massenspektrometrisch charakterisiert wurden. Mit den TPD-Sphingomyelinen wurde hierbei in Modellmembranen eine Affinität zum Cholesterol gefunden, wie sie auch für endogene Sphingomyeline beschrieben wird.

Auch die SM-Sonden konnten in Form eines Lipid/BSA-1:1-Komplexes gefüttert und in die Plasmamembran von Fibroblasten inkorporiert werden. Bei den Stoffwechseluntersuchungen in kultivierten Zellen wurden die unbelichteten TPD-SM-Sonden zu den Produkten SM, Ceramid und Glucosylceramid metabolisiert.

Nach Inkorporation in die Plasmamembran befanden sich die SM-Sonden ebenfalls in einer Cholesterol-reichen Lipidumgebung, wohingegen andere Kopplungsprodukte nur in untergeordnetem Maße feststellbar waren. Eine sechsstündige Endozytose der TPD-Sphingomyeline bei 37°C änderte die Zusammensetzung ihrer Lipidnachbarschaft allerdings kaum. Dieses steht im Gegensatz zu den Experimenten mit den Glc-S-Cer-Sonden, für die nach Internalisierung und Photolyse ein gänzlich anderes Verhältnis der Photokopplungsprodukte gefunden wurde. Es kann angenommen werden, dass sich die SM-Sonden im Zuge ihrer Endozytose entweder stets in einer Nachbarschaft mit hohem Cholesterol-Gehalt befunden haben oder eine besonders hohe Affinität der Sonden zum Sterol zu den entsprechenden Kopplungsmustern geführt hat.

2 **Einleitung**

2.1 **Eukaryontische Zellmembranen**

Membranen von eukaryontischen Zellen und ihren Organellen werden aus einer Vielzahl von verschiedenen Lipid- und Proteinmolekülen gebildet. Die Grundstruktur bilden dabei die Lipide, die in Form einer zusammenhängenden Doppelschicht von ca. 5 nm Dicke angeordnet sind. Diese wird durch nicht-kovalente Bindungen, in wässrigen Medien vor allem durch die hydrophobe Wirkung des Wassers, zusammengehalten. Die Membran stellt eine mehr oder weniger undurchlässige Barriere für die meisten wasserlöslichen Moleküle dar. Dadurch kann im Falle der Plasmamembran gewährleistet werden, dass die für den Organismus lebenswichtige Unterschiedlichkeit von Zytosol und extrazellulärer Flüssigkeit erhalten bleibt. Innerhalb der Zelle sorgen Organellmembranen für die Aufrechterhaltung der Kompartimentierung.

Es wird heute angenommen, dass eine typische Säugerzellmembran aus 100 bis 200 verschiedenen Lipiden zusammengesetzt ist, wobei die Gruppe der Phospholipide den Hauptbestandteil darstellt. Je nach Zelltyp variiert das Lipidmuster erheblich, und auch die darin enthaltenen Organellen besitzen dabei unterschiedliche Lipidkompositionen. Zellmembranen sind dynamische Strukturen, die auch als zweidimensionale Flüssigkeit beschrieben werden (*Singer und Nicholson, 1972*). Innerhalb einer Membranebene können sich die meisten in ihr enthaltenen Bestandteile lateral frei bewegen, wohingegen die transversale Bewegung („flip-flop“) nur von sehr wenigen Lipidklassen spontan ausgeführt werden kann. Diese transversale Diffusion ist dann ein z.T. sehr langsamer Vorgang, der durch Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Stunden bis Tagen beschrieben werden kann (*Kornberg und McConnell, 1971*).

Ein wichtige Entdeckung zu Anfang der 1970er Jahre war die Tatsache, dass die beiden Membranhälften asymmetrisch zusammengesetzt sind (*Bretscher, 1973*). Während Cholesterin frei zwischen den beiden Membranhälften einer Lipiddoppelschicht wechseln kann und daher in beiden Seiten zu finden ist (*Bretscher und Munro, 1993*), sind Phospholipide mit einer Phosphorylcholin-Kopfgruppe (Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM)) in größerem Maße auf der extrazellulären bzw. luminalen Hälfte der Membranen lokalisiert. Hingegen sind Lipide wie Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) vorwiegend auf der zytosolischen Seite orientiert. Die Asymmetrie der Phospholipide wird bereits an ihrem Synthesort, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), erzeugt. Hier werden durch einen protein-vermittelten Transport mittels der ATP-abhängigen Aminophospholipid-Translokase spezifisch PE und PS auf die andere Membranseite befördert (Übersicht in *Devaux und Zachowski, 1994*).

Glykosphingolipide (GSL), mit Ausnahme des Glucosylceramides (GlcCer), sind auf der nicht-zytosolischen Seite angeordnet (*Gahmberg und Hakomori, 1973; Hakomori, 1975*). Die asymmetrische Verteilung der Glykosphingolipide und des Sphingomyelins in Membranen ist durch die Topologie der Synthese zu erklären, die, mit Ausnahme des GlcCers, im Lumen des Golgi-Apparates stattfindet (*Schwarzmann und Sandhoff, 1990*). Da die GSL nicht in der Lage sind, durch transversale Diffusion spontan in die jeweils andere Lipidschicht von Membranen zu gelangen, wird diese asymmetrische Ausrichtung auch bei einem vesikulären Transport zu anderen Organellen oder zur Plasmamembran beibehalten. Beim GlcCer wird davon ausgegangen, dass ein protein-vermittelter Transport ins Lumen des Golgi existiert, da die Synthese des GlcCers auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates stattfindet (*Coste et al., 1985, 1986*).

Auch innerhalb der Membranhälften muss es nicht zu einer zufälligen Anordnung der Lipide kommen. Durch FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)-, ESR (Electron spin resonance)- und Röntgenstruktur-Untersuchungen konnte in vielen Fällen eine Domänenbildung gezeigt werden (Übersicht in *Welti und Glaser, 1994*). Dabei können einerseits Phasentrennungen auftreten, die sich durch Unvermischbarkeit von gelartigen bzw. festen und flüssig-kristallinen Phasen bilden. Ebenfalls konnte für Glykosphingolipide gezeigt werden, dass es zur Bildung von Clustern kommen kann (Übersicht in *Thomson und Tillack, 1985*).

Eine Bildung von Domänen wurde auch in bestimmten Membranbereichen beobachtet, die aus mehreren Lipidkomponenten bestehen. So wurde gezeigt, dass Cholesterol sich in bestimmten Membranbereichen anreichert und diese somit für kleine Moleküle undurchlässiger macht. In anderen Abschnitten hingegen ist Cholesterol kaum enthalten, so dass sich dort integrale Membranproteine ansiedeln können, die durch den Mangel an Cholesterol für kleine Moleküle wie Chaperone zugänglich sind. Diese werden z.B. für die Insertion von Proteinen in Membranen oder zu deren Faltung benötigt (*Bretscher und Munro, 1993*).

Durch biophysikalische Messungen ist seit den frühen 1980er Jahren bekannt, dass zwischen Sphingomyelin und Cholesterol Wechselwirkungen auf molekularer Ebene bestehen müssen (Übersicht in *Brown, 1998*). Anhand von Untersuchungen an Oberflächen mit chemisch-modifizierten Sphingomyelin-Substraten und Cholesterol konnte ermittelt werden, dass zwischen der Amidogruppe des Ceramid-Ankers und der Hydroxylgruppe des Cholesterols Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden. Wird die Amid-Gruppe des Sphingomyelins durch eine Ester-Gruppe ersetzt, wie sie in einem Phosphoglycerolipid vorkommt (Abb. 1.1), so kommt es zwar erneut zur einer dichten

Anordnung der Membranen, aber nach Zugabe des Enzyms Cholesterol-Oxidase wird Cholesterol in erheblich stärkerem Maße oxidiert (*Bittman et al., 1994*). Aus der besseren Zugänglichkeit für das Enzym kann geschlossen werden, dass das Cholesterol durch das Fehlen der Wasserstoffbrücken-Bindung zum Sphingomyelin-Derivat nicht mehr so fest in der Membran verankert ist.

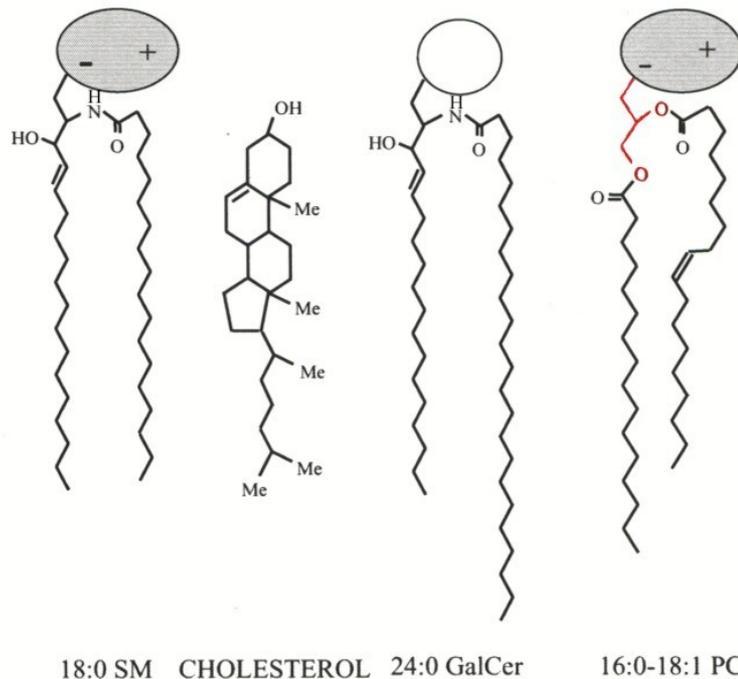


Abb. 1.1: Schematische Darstellungen von verschiedenen Lipiden aus eukaryontischen Membranen. SM: Sphingomyelin; GalCer: Galactosylceramid; PC: Phosphatidylcholin. Die Zahlen geben jeweils Kettenlänge und Grad der Sättigung der Acylkette an. Beim PC wurde das Glycerol-Rückgrat zur Verdeutlichung rot unterlegt. Modifiziert nach R.E. Brown (1998), *J. Cell Sci.*, **111**, 1-9.

Natürliche Membranen werden vom jeweiligen Organismus üblicherweise bei einer gleichbleibenden Umgebungstemperatur gehalten, um dessen Fluidität zu gewährleisten. Kommt es zu größeren Temperaturschwankungen, besteht die Gefahr, dass die Membranen brechen und es somit im Falle der Plasmamembran zum Ausströmen des Zytosols kommt. Eukaryontische Membranen werden durch ein fein aufeinander abgestimmtes Wechselspiel von Cholesterolgehalt und Fettsäurezusammensetzung der Lipide im Zustand der „flüssig-kristallinen Phase“ (oder auch „*liquid-disordered phase*“) bzw. der „*liquid-ordered phase*“ gehalten (Beschreibung siehe nachfolgender Abschnitt).

2.2 Mikrodomänen bzw. „Rafts“ und Caveolae

Dynamische Assoziante von Cholesterol und Sphingolipiden werden als Mikrodomänen oder auch „rafts“ beschrieben, die sich in der exoplasmatischen Seite von zellulären Membranen bilden (*Simons und Ikonen, 1997*). Dabei sind sie hauptsächlich in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert, werden z.T. aber auch in inneren Membranen, wie der Golgi-Membran, gefunden (*Gkantiragas et al., 2001*). Es wird angenommen, dass hier die Partitionierung der Membranbereiche entsteht. Diese Domänen können selektiv Proteine ein- oder ausschließen und somit Protein-Protein- oder Protein-Lipid-Wechselwirkungen leiten. Über die Größe der Mikrodomänen werden derzeit sehr unterschiedliche Aussagen gemacht. Dabei reichen die Angaben je nach angewandter Untersuchungsmethode von ca. 30 bis 500 nm (vgl. nachfolgender Abschnitt).

Die heterogene Lipidverteilung in funktionell spezialisierten Membranbereichen wurde zuerst in Zellen untersucht, die bereits anatomisch verschiedene Membrandomänen tragen. Polarisierte Zellen besitzen eine dem Gefäßlumen zugewandte, apikale Membran, die durch „tight junctions“ von der die Zelle umgebenden basolateralen Membran abgegrenzt wird. *Simons und van Meer* postulierten 1988 nach Untersuchung von polarisierten MDCK-Epithelzellen (*Madine-Darby canine kidney cells*), dass der hohe Gehalt an Glykosphingolipiden in der apikalen Membran durch ein „Sorting“ im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und einen unterschiedlichen Transport der apikalen und basolateralen Vesikel gesteuert werden muss. Gestützt wurde diese Theorie durch die Beobachtung, dass bestimmte Proteine, die mit einem Glykosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-Anker in der exoplasmatischen Schicht lokalisiert sind, sich in bestimmten Membranbereichen der apikalen Membran aufhalten, die durch Detergenz-unterstützte Extraktionen isoliert werden können (*Brown und Rose, 1992*).

Es wird davon ausgegangen, dass Cholesterol die Membranen durch seine Interkalation zwischen den Lipiden verdichtet. Dabei bildet es mit den Sphingolipiden besonders feste Assoziante, so dass hierbei Membranbereiche mit anderen Eigenschaften als den bereits gut untersuchten flüssig-kristallinen (bzw. „liquid-disordered, l_d “) bzw. den Gel-Phasen entstehen. Diese sogenannte „liquid-ordered (l_o) phase“ wird als Zustand für die Mikrodomänen beschrieben, in der die Acylketten der Lipide ähnlich wie in der Gel-Phase gestreckt und dichter gepackt sind, aber dennoch eine hohe laterale Mobilität besitzen (*Brown und London, 1998*).

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Beispielen beschrieben worden, an denen die „rafts“ als Plattformen beteiligt sind, z.B. beim „Sorting“ von Lipiden und Proteinen (Übersicht in *Ikonen, 2001*), in der Signaltransduktion (Übersicht in *Simons und Toomre, 2000*) und in der Internalisierung von Bakterien und Viren (Übersicht in *Shin und Abraham,*

2001). Dabei konnte besonders häufig die Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen in den Mikrodomänen nachgewiesen werden. Auch GSL werden vermehrt in diesen exoplasmatischen Membranbereichen gefunden, wohingegen auf der zytosolisch-orientierten Seite z.B. Tyrosin-Kinasen der *src*-Familie und auch die α -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen lokalisiert sind (Abb. 1.2). Die Lipidzusammensetzung dieser zytosolisch-orientierten Membranhälfte der „rafts“ ist noch nicht ausreichend gut charakterisiert worden, wenn sich auch Hinweise ergeben haben, dass hier eine Anreicherung von Phosphoglycerolipiden mit gesättigten Fettsäureresten und Cholesterol vorliegt (Fridriksson *et al.*, 1999).

Auch aus niederen Eukaryonten wie Hefen, die keine polarisierte Architektur besitzen, ist die Existenz von Sterol-Sphingolipid-reichen Domänen bekannt (Bagnat *et al.*, 2000). In diesen wird Ergosterol, ein dem Cholesterol verwandtes Molekül, in die „rafts“ eingebaut.

Anders als die ebenen Membranbereiche der „rafts“ sind *Caveolae* als 50-100 nm große Einstülpungen (Invaginationen) der Membranen im Elektronenmikroskop sichtbar (Rothberg *et al.*, 1992, Übersicht in Anderson, 1998). Die bereits in den 1950er Jahren von Palade und Yamada morphologisch nachgewiesenen *Caveolae* besitzen eine nahezu gleiche Lipid- und Proteinzusammensetzung wie die zuvor beschriebenen Mikrodomänen. Im Gegensatz zu den „rafts“, wo keine Beteiligung von Strukturproteinen gefunden wurde, konnten bei den *Caveolae* die Proteine Caveolin-1, -2 und -3 als strukturbildende Elemente identifiziert werden. Diese sind Cholesterol-bindende Proteine und werden als homo- und heterooligomere Komplexe in vielen Zelltypen exprimiert (besonders häufig in Fibroblasten, Adipozyten, Endothel- und Epithelzellen, sowie in Muskelzellen vor allem Caveolin-3). Dabei bilden die Caveolin-Oligomere Haarnadelstrukturen aus, die zur Krümmung der Membranen führen (Abb. 1.2). Ebenso wie in den „rafts“ wird in den *Caveolae* ein erhöhter Gehalt an Glykosphingolipiden gefunden. Dass ein inkorporiertes biotinyliertes Gangliosid GM1 in Form von Clustern in der Plasmamembran und innerhalb der *Caveolae* vorliegt, konnte in unserer Abteilung anhand von Immunogold-Markierungen im Elektronenmikroskop gezeigt werden (Möbius *et al.*, 1999). Durch Photoaffinitätsmarkierung wurde in einer anderen Arbeitsgruppe die direkte Nachbarschaft vom GM1 zum Caveolin-1 (VIP-21) erkannt (Fra *et al.*, 1995).

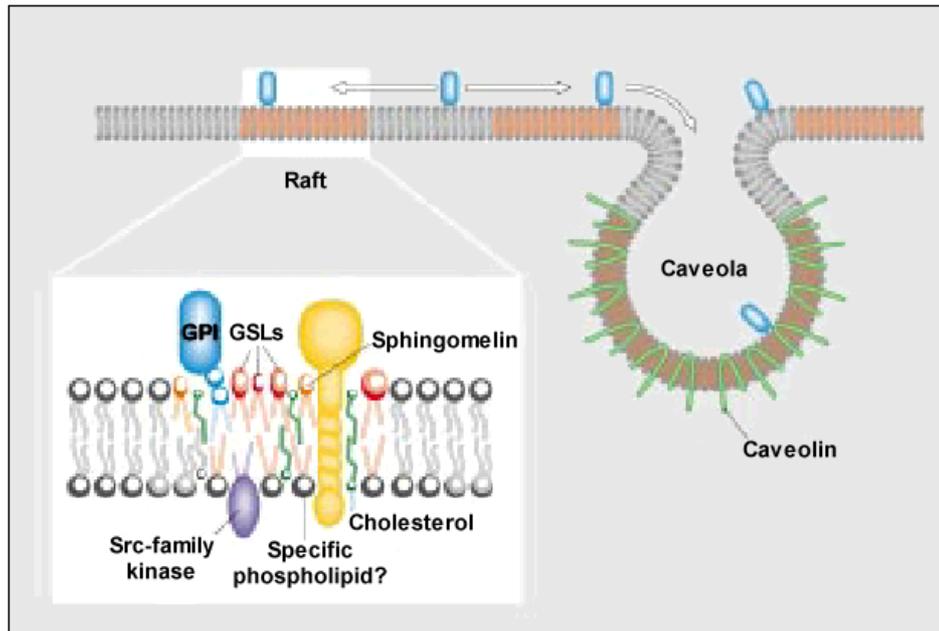


Abb. 1.2: Modell für die Anordnung der „rafts“ und Caveolae in der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen. Glykolipid-reiche Domänen (rot) sind getrennt von anderen Bereichen der Membran (grau). Im vergrößerten Ausschnitt wird auch ein Transmembranprotein (z.B. Haemagglutinin aus dem Influenza Virus) gezeigt, welches ebenfalls in den „rafts“ nachgewiesen wurde. Einzelne Lipide oder Proteine können sich zwischen den Domänen oder anderen Regionen, auch den Caveolae, der Doppelschicht lateral bewegen. Modifiziert nach: N.M. Hooper (1998), *Curr. Biol.*, **8**, R114-R116.

2.2.1 Methoden zur Untersuchung von „rafts“

Um Zusammensetzung und Eigenschaften der Moleküle innerhalb der „rafts“ untersuchen und charakterisieren zu können, werden verschiedene Methoden verwendet, deren Aussagekraft aufgrund der Entstehungsmöglichkeit von Artefakten z.T. kontrovers diskutiert wird.

Lichtmikroskope haben eine physikalisch-bedingte Auflösungsgrenze von ca. 200 nm. Da die Durchmesser der Mikrodomänen allerdings in den meisten Fällen vermutlich unterhalb dieses Bereiches liegen, werden hiermit voraussichtlich keine näheren Informationen bezüglich der *in vivo*-Vorgänge innerhalb solcher „rafts“ erhalten werden können. Daher wurden in den letzten Jahren neue Methoden entwickelt, die es erlauben sollen, diese Wechselwirkungen unter nativen Bedingungen zu untersuchen. Dabei wurden unter anderem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen (Varma und Mayor, 1998, Kenworthy et al., 2000), die Photonen-Kraft-Mikroskopie (Pralle et al., 2000) und die „Single fluorophore tracking“-Mikroskopie (Schutz et al., 2000) angewandt. Bei allen diesen Untersuchungen wurden Werte für die Durchmesser der Mikrodomänen ermittelt, die im Bereich von nur ca. 25-100 nm liegen.

Einige andere der zur Charakterisierung von „rafts“ angewandten Methoden basieren auf dem Quervernetzen von Molekülen, die als Bestandteile der Domänen postuliert werden. So wurde eine chemische Quervernetzung von GPI-verankerten Proteinen (*Friedrichson und Kurzchalia, 1998*), eine Kopplung von an „raft“ beteiligten Proteinen mittels Antikörpern (*Harder et al., 1998; Janes et al., 1999*) oder auch die Immuno-Elektronen-Mikroskopie (*Wilson et al., 2000*) angewandt, um Wechselwirkungen innerhalb dieser Bereiche zu untersuchen. Dass hierbei u.U. auch Artefakte durch die Anwendung solcher Verfahren entstehen können, soll die Abbildung 1.3 verdeutlichen. In der rechten unteren Grafik wird eine mögliche Quervernetzung mehrerer Mikrodomänen miteinander durch die Anbindung von bifunktionellen Antikörpern bzw. chemischen Substraten gezeigt. Obwohl bei allen o.g. Messungen stets Kontroll-Experimente durchgeführt wurden, kann nicht hinreichend ausgeschlossen werden, dass bei einigen dieser Untersuchungen eine künstliche Bildung der Mikrodomänen ausgelöst wurde.

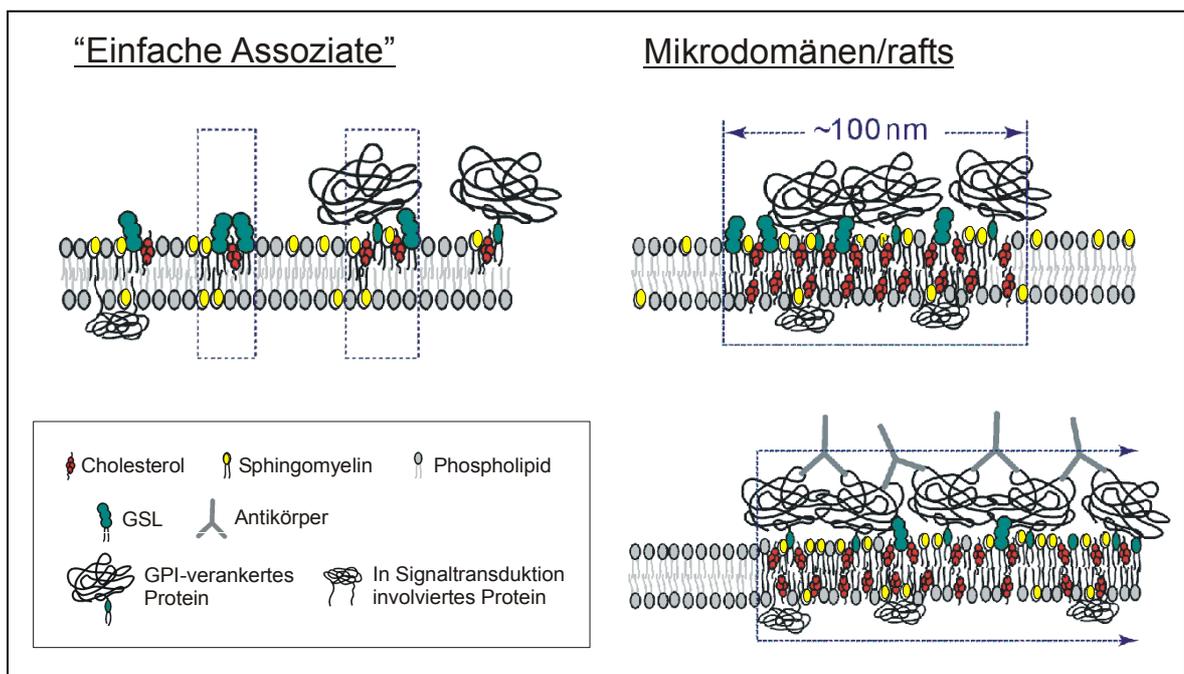


Abb. 1.3: Modelle für die Anordnung der in „rafts“ enthaltenen Moleküle in einfachen Assoziaten, sowie in Mikrodomänen vor und nach Quervernetzung. Modifiziert nach: K. Jacobsen und C. Dietrich (1999), *Trends Cell. Biol.*, **3**, 87-91.

Als eine Möglichkeit zur Isolation von „rafts“ aus Zellen wird die Detergenz-unterstützte Lyse bei 4°C mit anschließender Ultrazentrifugation angewendet. Dieses von *Brown und Rose (1992)* entwickelte Verfahren basiert auf der Verwendung eines Lysis-Puffers, welcher bis zu 1 % Triton-X-100 enthält. Dabei werden Mikrosomen und liposomale Körperchen von den in den Mikrodomänen enthaltenen Lipiden und Proteinen ausgebildet, die in 40 %-iger Saccharose eine niedrige Dichte besitzen und somit im Dichtegra-

dienten in obere Bereiche des Zentrifugenröhrchens „schweben“ (Übersicht in *London und Brown, 2000*).

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei 37°C keine „schwimmende Fraktion“ mehr erhalten wird, so dass man davon ausgehen kann, dass hierbei die Zellyse vollständig war und Mikrodomänen bzw. Liposomenbildung durch die Detergenzwirkung aufgelöst bzw. verhindert wurden. So konnte weiterhin gezeigt werden, dass die plazentale alkalische Phosphatase (PLAP), ein GPI-verankertes Protein, welches vermutlich in „rafts“ lokalisiert ist, nach Extraktion aus Liposomen bei 4°C nur Triton X-100-unlöslich war, wenn dieses sich in einer Lipidumgebung befand, in der die Lipide überwiegend gesättigte Fettsäuren trugen (33 % Sphingolipide und 33 % Cholesterol). Hingegen war das Protein Triton X-100-löslich, wenn der Sphingolipid-Anteil auf 10 % gesenkt wurde (*Schroeder et al., 1998*).

Allerdings wurde in den vergangenen Jahren auch dieses Verfahren kontrovers diskutiert, da durch das Einwirken des Detergenz auf die Zellen möglicherweise bestimmte Lipide, wie z.B. Phospholipide, solubilisiert werden könnten, wohingegen andere wie Glykosphingolipide und Cholesterol unlöslich zurückbleiben und die „rafts“-Fraktion bilden. Ein Beweis für die Existenz dieser Mikrodomänen *in vivo* konnte mit dieser Methode bislang nicht hinreichend geführt werden. Allerdings konnten mittlerweile auch durch andere unabhängige Methoden vermehrt Hinweise auf die Richtigkeit der von *Brown und Rose* erhaltenen Ergebnisse gefunden werden.

2.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die Lipidnachbarschaft von Sphingolipiden im Zuge ihrer Endozytose in kultivierten Zellen verändert. Als Methode zur Untersuchung der den Sphingolipiden direkt benachbarten Moleküle wurde die Markierung mit photoaktivierbaren Lipidanaloga gewählt, die nach Belichtung eines ihrer Nachbarmoleküle kovalent binden. Die erhaltenen Kopplungsprodukte sollten anschließend mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Es wurden dazu mehrere Glucosyl-thio-ceramide und Sphingomyeline mit unterschiedlich langen Acylkettenlängen dargestellt, die eine photolabile Trifluormethylphenyldiaziriny (TPD)-Gruppe trugen. Es standen somit mit den Glc-S-Cer-Sonden zum einen Moleküle zur Verfügung, mit denen die Nachbarschaft von Glykolipiden untersucht werden konnte. Zum anderen konnte mit den photoaktivierbaren Sphingomyelinen erforscht werden, ob auch diese an der Ausbildung der Mikrodomänen/„rafts“ beteiligt sind und wie sich deren Lipidnachbarschaft auf inneren Zellmembranen möglicherweise ändert.

Weiterhin stellte sich die Frage, inwieweit die verschiedenen Kettenlängen der photoaktivierbaren Fettsäuren einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Lipidumgebung der Sphingolipide hatten und wie sich der Anteil der Insertion in Wasser änderte. Dazu wurde eine längere photoaktivierbare TPD-Fettsäure mit C7-Acylkette synthetisiert und mit Lyso-Glc-S-Cer gekoppelt, so dass die photolabile Diazirin-Gruppe tiefer innerhalb des hydrophoben Kerns der Membran lokalisiert war und somit evtl. auch die flexiblen Bereiche der Fettsäuren bzw. die Alkylseitenkette des Cholesterol markieren konnte.

Durch Versuche in Modellmembranen sollte zuerst eine Referenzbibliothek der Kopplungsprodukte erzeugt und die in den Zellkulturversuchen erhaltenen Insertionsmuster anschließend damit verglichen werden.

Unter Temperaturblock der Endozytose der Sonden sollten dann zunächst ihre Nachbarlipide in der Plasmamembran von Fibroblasten charakterisiert werden. Weiterhin sollte zu verschiedenen Zeiten der Endozytose und z.T. auch mit anschließendem „back-exchange“ der in die Plasmamembran inkorporierten Moleküle erneut die Lipidnachbarschaft bestimmt und mit den zuvor erhaltenen Werten verglichen werden. Die Zusammensetzungen der verschiedenen Organellmembranen sowie der Plasmamembran unterscheiden sich zum Teil erheblich, so dass sich je nach Aufenthaltsort der Sonden in der Zelle auch die Zusammensetzung der Photokopplungsprodukte ändern könnte. Aus den Ergebnissen dieser Belichtungsversuche sollten somit Rückschlüsse auf mögliche Sortierphänomene in der Zelle gezogen werden.

In kultivierten Fibroblasten von Patienten mit Niemann-Pick Typ C'scher Erkrankung sollte untersucht werden, ob die Glc-S-Cer-Sonden nach ihrer Endozytose ebenfalls auf den Cholesterol-Speicherkörperchen lokalisiert sind.

Es sollte weiterhin geprüft werden, ob die photoaktivierbaren Sphingolipide an der Ausbildung von Mikrodomänen beteiligt waren. Dieses sollte durch Isolierung der „rafts“ mittels der Methode der Detergenz-unterstützten Zellyse und anschließender Ultrazentrifugation im Saccharose-Gradienten nach *Brown und Rose* nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Synthesen

3.1.1 Synthese der C7-TPD-Fettsäure und C7-Glucosyl-thio-ceramid-Photosonde

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Lipidumgebung von Glykosphingolipiden (GSL) in der Plasmamembran und im Verlauf der Endozytose untersucht werden. Durch Einführung einer photoaffinen Gruppe in den Fettsäurerest der entsprechenden GSL sollten in Belichtungsexperimenten die benachbarten Lipide markiert und anschließend charakterisiert werden.

Die von *J. Brunner, H. Senn und F.M. Richards* zu Beginn der 1980er Jahre entwickelte Substanzklasse der Aryldiazirine hat sich für Photomarkierungen in der Biochemie als sehr geeignet herausgestellt, da diese mehrere Voraussetzungen an photolabile Substanzen erfüllt. Das nach Belichtung der photoaktivierbaren Trifluormethylphenyldiaziriny-Gruppe (TPD-Gruppe) entstehende Carben hat eine hohe Reaktivität und inseriert in benachbarte Bindungen, auch C-H-Bindungen, innerhalb von Nanosekunden. Es hat sich in Versuchen gezeigt, dass eine Insertion in die reaktiveren O-H-Bindungen unter gleichen Belichtungsbedingungen deutlich schneller geschieht (*Brunner et al., 1980*). Von weiterem Vorteil sind die gute Handhabbarkeit der unbelichteten TPD-Verbindungen bei gedämpftem Tageslicht und ihre chemische Stabilität gegen mittelstarke Säuren und Basen (*Brunner et al., 1980*). Die Photolyse der Diazirine erfolgt bei einer Wellenlänge von 360 nm, bei der Amidbindungen der Proteine und der GSL intakt bleiben. Die Kuppelung des Carbens mit Nachbarmolekülen führt zu stabilen kovalenten Bindungen, die während Isolierung und Aufreinigung der entstandenen Verbindungen erhalten bleiben.

Die Ausbeute an reaktivem Carben kann durch die Belichtungsbedingungen beeinflusst werden. In der Diplomarbeit (*Hörnschemeyer, 1997*) wurden dazu Untersuchungen durchgeführt, die gezeigt haben, dass unter den gewählten Bedingungen bereits eine Belichtungszeit von 2 Sekunden ausreicht, um das Diazirin vollständig zu zerstören. Für die notwendige Belichtungsdauer spielen Faktoren wie die Schichtdicke und Konzentration der Photosonde in der zu belichtenden Lösung, sowie Leistung und Wellenlängencharakteristik der Lichtquelle eine entscheidende Rolle. Ein Teil der photolysierten Sondenmoleküle besteht nach einer Belichtungszeit von 2 Sekunden allerdings noch aus dem nicht-reaktiven Diazoisomer, welches durch einfache Öffnung des Diazirin-Dreirings entsteht. Dieses Produkt kann durch weitere Bestrahlung mit Licht im UV-Bereich (ca. 270 nm) ebenfalls in das Carben überführt werden. Daher wurden für die weiteren Versuche mit den TPD-Sonden ca. 4 Sekunden Belichtungszeit gewählt, wonach etwa 95 % der eingesetzten Sonden zu den entsprechenden reaktiven Carbenen photolysiert wurden.

Von *D. Schummer* wurde bereits 1986 in unserer Abteilung die Synthese einer C5-Fettsäure mit einer photolabilen TPD-Gruppe und dessen Kupplung an ein tritiiertes Lyso-GM1 beschrieben (Diplomarbeit *Schummer, 1986*).

In Anlehnung an die dort verwendete Synthesestrategie wurde in meiner Diplomarbeit die Synthese von zwei Fettsäuren und der damit acylierten Lyso-Glucosyl-thio-ceramide durchgeführt. Dabei wiesen die Fettsäuren eine Acylkettenlänge von 3 bzw. 5 Kohlenstoffatomen vor der TPD-Gruppe auf. Die Gesamtlänge dieser TPD-Fettsäuren dürfte denen von C₉- bzw. C₁₁-Acylketten entsprechen.

Eine längere TPD-Acylkette bedingt, dass die „off-rate“ der Sonden, d.h. ihre Diffusion aus der Membranebene heraus, sinkt (*Brown et al., 1985*) und somit auch ihre Kopplungsprodukte mit Wasser abnehmen. In Experimenten, die bereits während der Diplomarbeit durchgeführt wurden, konnte nach Belichtung der C5-Glc-S-Cer-Sonde in Cholesterolphaltigen Liposomen ein um ca. 10 %-geringerer Anteil an Wasserinsertionsprodukt gegenüber Versuchen mit der C3-Verbindung gemessen werden. Außerdem konnte hierbei die Insertionsrate in andere Lipide erhöht werden, da durch die geringere Wasserinsertion gewissermaßen eine Konkurrenzreaktion vermindert wurde.

Da endogene Lipide naturgemäß längere Fettsäurereste als die hier synthetisch hergestellten, photoaktivierbaren Fettsäuren tragen, ist vermutlich deren „off-rate“ extrem gering. Es war wünschenswert, bei den Photomarkierungen ein den endogenen Substraten entsprechendes langkettiges Lipid zu verwenden. Allerdings hat sich bei Zellkultur-Untersuchungen mit langkettigen Lipiden gezeigt, dass diese aufgrund der starken hydrophoben Wechselwirkungen mit BSA oder Liposomen nur sehr schwer oder gar nicht vom Medium in die äußere Schicht der Plasmamembran transferiert werden können.

Ganglioside mit den natürlicherweise vorkommenden langkettigen Acylresten können direkt exogen in Form ihrer Mizellen zur Inkorporation von Gangliosidmolekülen in die Plasmamembran verwendet werden. Dabei können Moleküle nach Anbindung der Mizellen an die Oberflächenproteine der Extrazellulärschicht der PM in diese inkorporiert werden, so dass die Ganglioside nach Trypsinierung der Zellen als „trypsin-stabile“ Moleküle in der Membran verbleiben. Mizellen, die nur „lose“ an der Zelle angebunden sind, können hingegen durch die Enzymbehandlung wieder von diesen entfernt werden (*Schwarzmann et al., 1983*; referiert in *Schwarzmann, 2001*). Auch mit dem Gangliosid GM3 konnte diese Art der Inkorporation nachgewiesen werden, wobei dieses sogar eine Lipiddoppelschicht ausbilden kann (*Sonnino et al., 1990*). Die Fütterung als Mizellen oder Liposomen kann allerdings mit den hier verwendeten Glucosyl-thio-ceramid-Sonden nicht gelingen, da diese in wässriger Umgebung keine definierten vesikulären Strukturen ausbilden, sondern eher als nicht-gelöste Aggregate vorliegen.

Um hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften den endogenen Membranlipiden möglichst ähnlich zu sein, wurden Photosonden benötigt, die eine entsprechend lange Acylkette tragen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine längere photoaktivierbare Fettsäure mit C7-Acylkette analog zu den C3- und C5-Verbindungen synthetisiert (Abb. 3.1). In einer konvergenten Synthese mit Lyso-Glucosyl-thio-ceramid und dem C7-TPD-Fettsäure-Succinimidylester wurde dann die C7-TPD-Glc-S-Cer-Photosonde gebildet (Abb. 3.2). Diese Verbindung sollte einem GlcCer mit C₁₃-Fettsäure entsprechen und bereits ähnliche hydrophobe Eigenschaften wie endogene Derivate besitzen. Trotzdem sollte sie in Zellkulturexperimenten noch in ausreichendem Maße von den Zellen aufgenommen werden können.

Als Ausgangsverbindung der 10-stufigen Synthese der C7-TPD-Fettsäure wurde die käuflich erhältliche 7-Phenylheptansäure gewählt. Im ersten Schritt musste deren Carboxylgruppe als Methylester für die folgende Friedel-Crafts-Acylierung mit Trifluoressigsäureanhydrid geschützt werden. Nach erfolgter Trifluoracetylierung wurde der stabile Methylester durch Erhitzen der Verbindung in Ameisensäure zerlegt, wobei der dabei entstehende Ameisensäure-methylester (K_p 32°C) durch entsprechende Kühlung aus dem Rückflußkühler entweichen konnte und so dem Gleichgewicht entzogen wurde. Anschließend wurde die Carboxylgruppe als tert. Butylester geschützt; dieser konnte in einem späteren Syntheseschritt unter milden Bedingungen entfernt werden. Die p-Trifluoracetylgruppe wurde nun mit Hydroxylamin in das entsprechende Oxim überführt. Die anschließende Tosylierung lieferte eine gute Abgangsgruppe, die eine leichte Zyklisierung zum Diaziridin ermöglichte. Diese Reaktion wurde unter Druck in flüssigem Ammoniak durchgeführt. Das Diaziridin wurde dann durch Oxidation mit frisch gefälltem Silberoxid in das lichtempfindliche Diazirin überführt. Nach Abspaltung der tert. Butyl-Schutzgruppe durch Rühren in Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur wurde zuletzt die entstandene freie TPD-Säure mit *N*-Hydroxysuccinimid für die weitere Kopplung mit Lyso-Sphingolipiden zum entsprechenden Succinimidylester aktiviert.

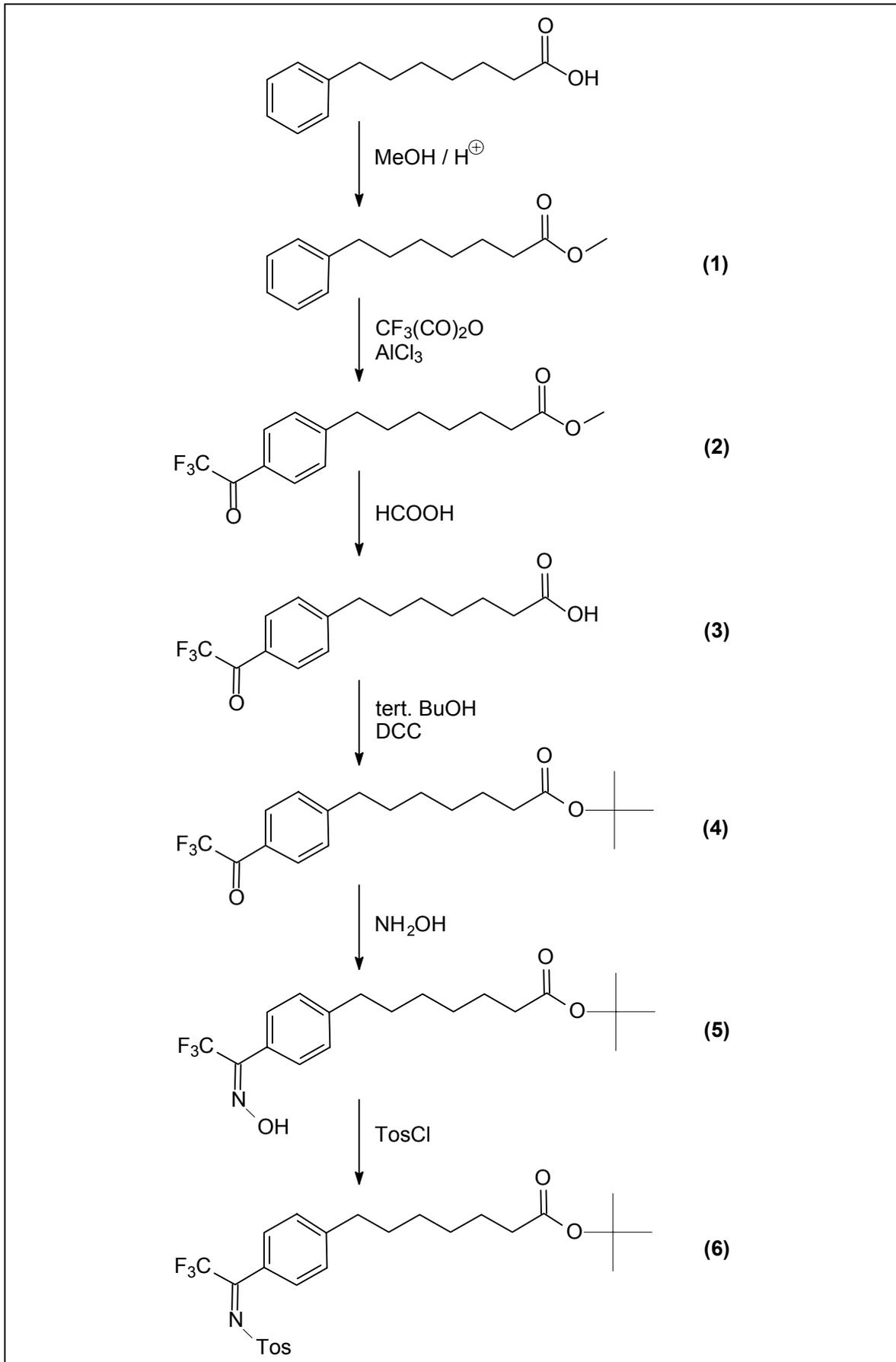


Abb. 3.1: Synthese der photoaktivierbaren C7-Fettsäure und ihres *N*-Succinimidylesters

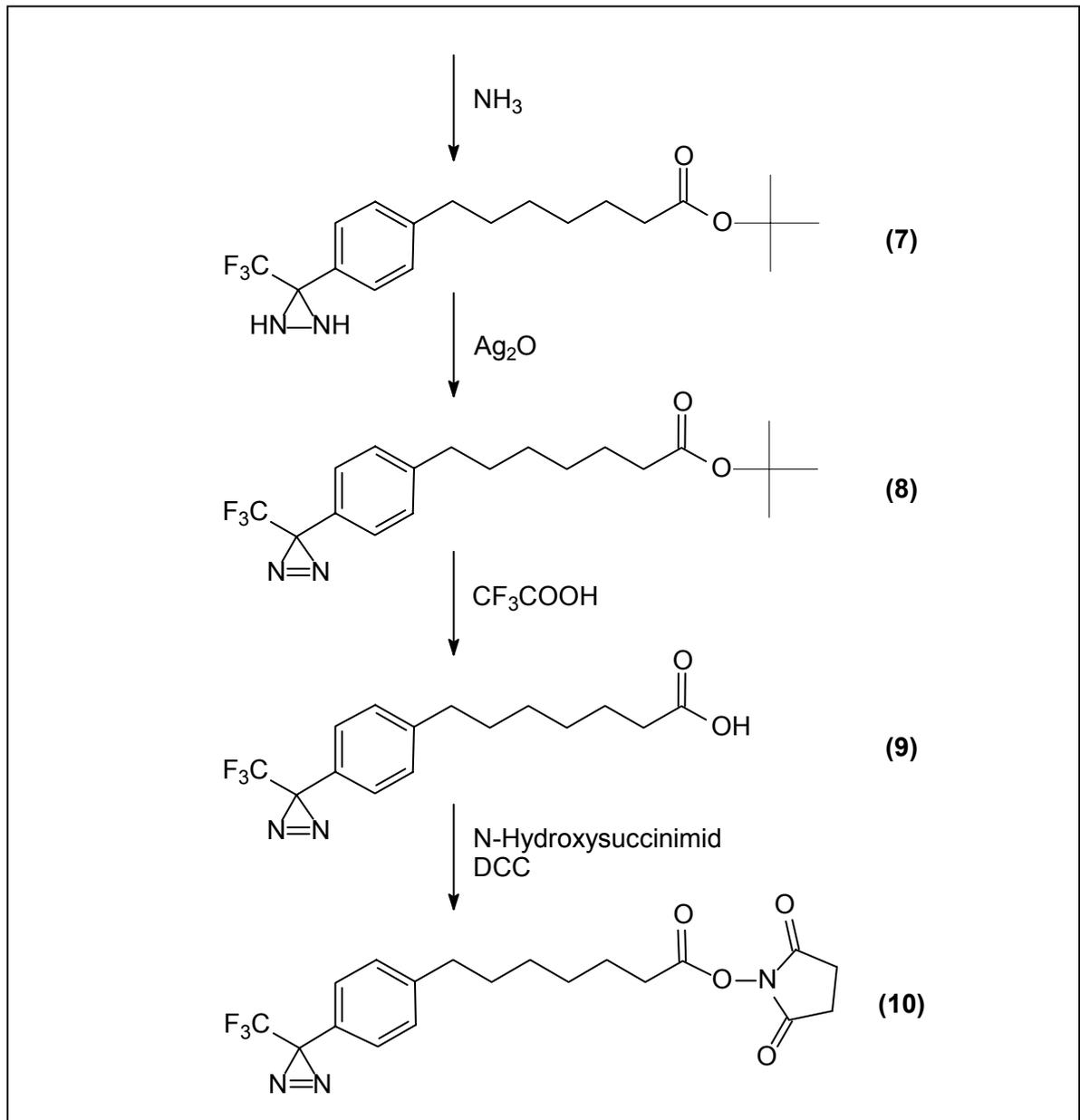


Abb. 3.1 (Fortsetzung): Synthese der photoaktivierbaren C7-Fettsäure und ihres N-Succinimidylesters

Die Synthese des nach *Albrecht et al. (1995)* und *Hörnschemeyer (1997)* hergestellten Lyso-Glc-S-Cer wurde mit käuflich erhältlicher Pentaacetylglucose oder im Falle der radioaktiv markierten Verbindung mit $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Glucose begonnen (Abb. 3.2). Hierdurch konnte bereits in der ersten Synthesestufe eine ^{14}C -Markierung mit einer für Lipiduntersuchungen ausreichenden spezifischen Aktivität von 245 Ci/mol in das Molekül eingeführt werden. Diese Markierung ist im Lyso-Glc-S-Cer aufgrund der thioglykosidischen Bindung gegen einen Abbau durch die endogene Glucocerebrosidase geschützt, so dass Kopplungsprodukte auch noch im Zuge der Endozytose untersucht werden konnten.

Nach Aktivierung der Pentaacetylglucose zur entsprechenden 1-Brom-tetraacetylverbindung erfolgte die Überführung in die 1-Acetylthio-tetraacetylglucose und die Kupplung mit zuvor hergestellten „geschütztem“ 1-Deoxy-1-Iodsphingosin zum „geschütztem“ Lyso-

Glucosyl-thio-ceramid. Im diesem ist der Zucker über eine β -thioglykosidische Bindung an das Ceramid gebunden und besitzt somit die gleiche Anomerie wie natives Glucosyl-ceramid (Hasegawa *et al.*, 1991; Albrecht *et al.*, 1995). Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde Lyso-Glc-S-Cer mit einer Gesamtausbeute von 25 % (bezogen auf Glucose) erhalten. Abschließend erfolgte die Acylierung mit dem zuvor beschriebenen Succinimidylester zum C7-TPD-Glucosyl-thio-ceramid.

Somit stehen mit der C7-Sonde und den beiden während der Diplomarbeit synthetisierten C3- und C5-Verbindungen drei Glc-S-Cer-Sonden zur Verfügung, die eine umfassende Untersuchung der Lipidnachbarschaft dieser Verbindungen ermöglichen sollten.

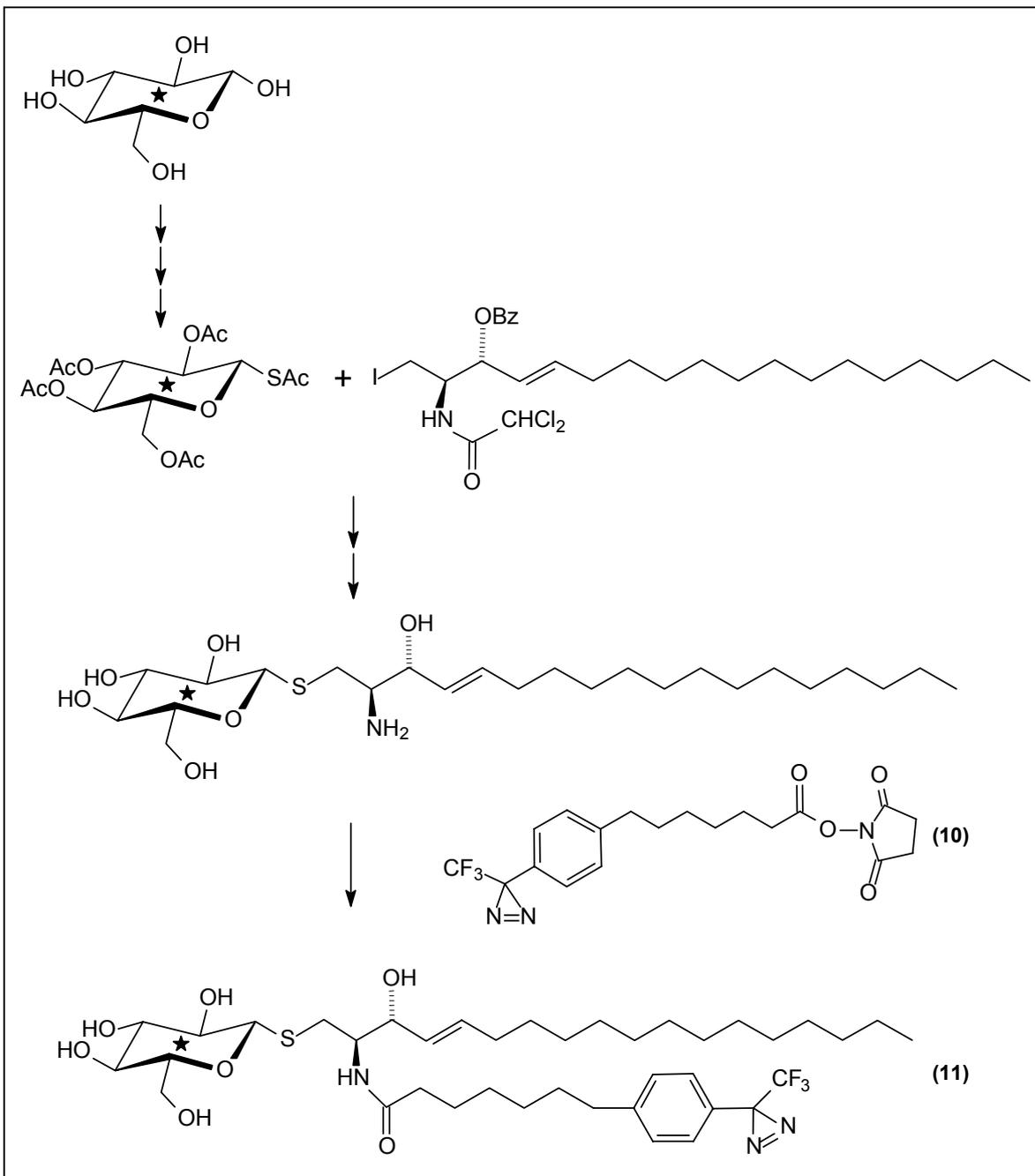


Abb. 3.2: Synthese der C7-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde; der Stern (*) inmitten des Sechsrings indiziert eine unspezifische [¹⁴C]-Markierung (bei Verwendung von [U-¹⁴C]-Glucose).

3.1.2 *Synthese der Sphingomyelin-Sonden*

In der Einleitung dieser Arbeit ist bereits auf die besondere Affinität zwischen Sphingomyelin und Cholesterol hingewiesen worden. Dieses auf den speziellen Wechselwirkungen der beiden Moleküle beruhende Phänomen ist in lebenden Zellen vermutlich eine wichtige treibende Kraft für die Bildung von Mikrodomänen bzw. „rafts“ (Übersicht in *Brown, 1998*). Um die direkte Lipidnachbarschaft der Sphingomyeline mit der hier verwendeten Methode der Photomarkierung untersuchen zu können, wurden auch zwei Sphingomyelin-Sonden synthetisiert.

Einen leichten Zugang zur Einführung einer radioaktiven Markierung versprach die Tritiiierung der trans-Doppelbindung des Lyso-Sphingomyelins. Dieses von *Schwarzmann (1978)* für Ganglioside und andere Sphingolipide beschriebene Verfahren ließ sich ebenfalls auf diese Verbindung anwenden. In einer einfachen Reaktion wurde dabei die markierte Dihydroverbindung aus Lyso-Sphingomyelin (Sphingosin-phosphorylcholin) mit [³H]-Natriumborhydrid und Palladiumacetat als Katalysator in basischem THF erzeugt. Dabei wurde eine für Lipiduntersuchungen ausreichend hohe spezifische Aktivität von 1000 Ci/mol erhalten. Die Dihydroverbindung konnte nach Reinigung durch einfache Umkehrphasenchromatographie mit dem entsprechenden Succinimidylester der photolabilen Fettsäure zum gewünschten Endprodukt acyliert werden (Abb. 3.3). Der Metabolismus dieser durch Einstufenreaktionen zugänglichen Substrate wurde in Zellkulturstudien durchgeführt und wird später beschrieben (3.4.2.2).

Bei diesen Verbindungen ergab sich keine einfache Synthese einer gegen einen Sphingomyelinase-Abbau resistenten Verbindung. Auch auf eine aufwendigere Markierung in der Phosphorylcholin-Kopfgruppe wurde hier verzichtet, da dadurch keine Stabilität gegen einen Sphingomyelinase-katalysierten Abbau erreicht würde. Die analoge Verwendung einer Schwefelbrücke zwischen Ceramid und Phosphatgruppe war nicht möglich, da eine derartige Synthese sehr aufwendig gewesen wäre und es dadurch zu einer leicht hydrolysierbaren und möglicherweise sogar toxischen Thiophosphorsäureester-Verbindung ähnlich wie beim Insektizid *Malathion* gekommen wäre.

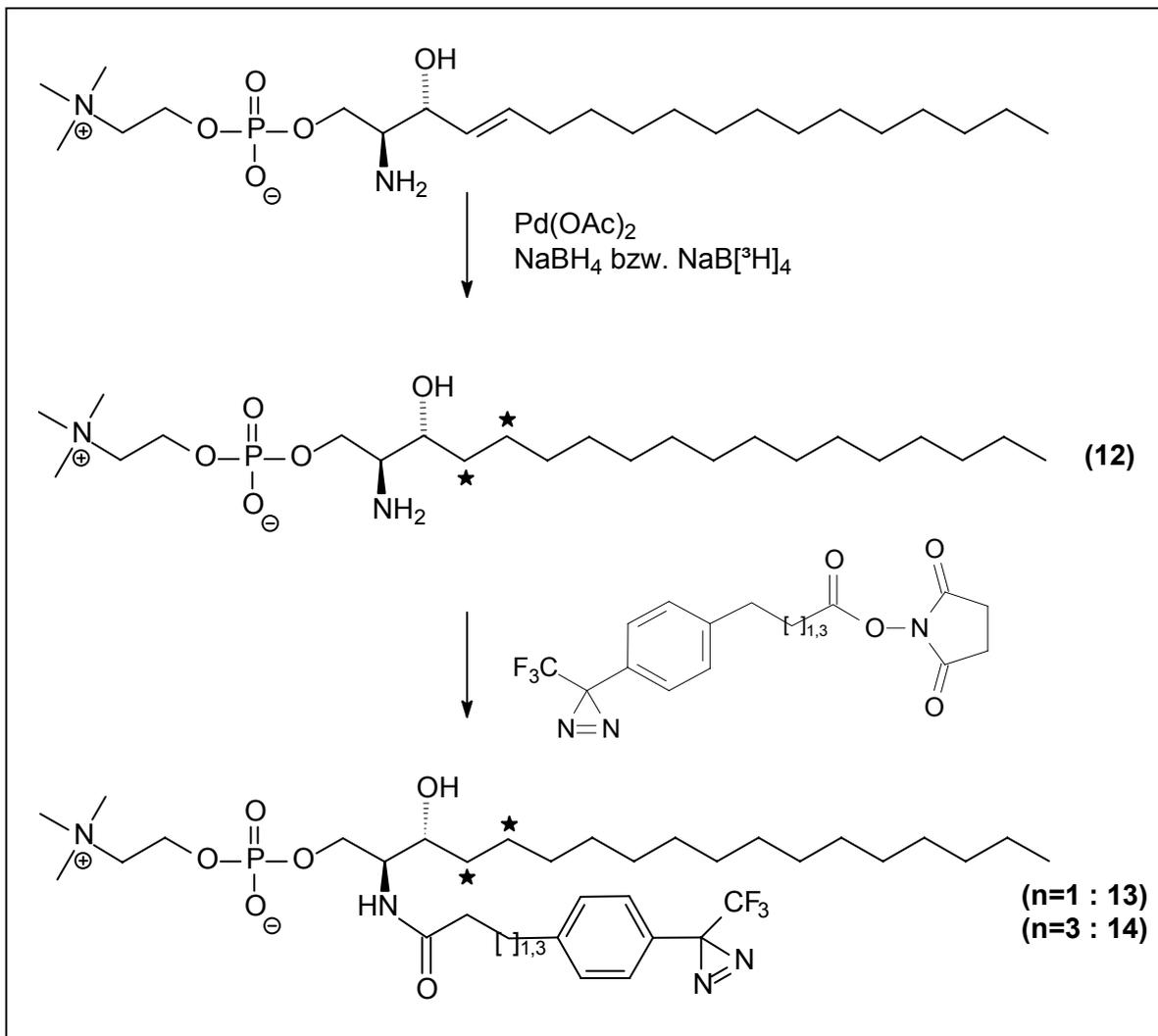


Abb. 3.3: Synthese der (Dihydro)-Sphingomyelin-Photosensitizers; die Sterne (*) zeigen die Positionen der Tritiummarkierung an (bei Verwendung von $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$).

3.2 Liposomenexperimente

Durch Belichtung der photoaktivierbaren Sonden in Modellmembranen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung wurden Insertionsprodukte hergestellt, die als Referenzsubstanzen bei den Untersuchungen in biologischen Membranen dienen sollten. Diese „Bibliothek“ der Kopplungsprodukte ermöglichte eine Analyse des z.T. recht komplexen Bandenmusters in der Dünnschichtchromatographie (DC). Da in natürlichen Zellmembranen eine Vielzahl verschiedener Lipide mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung vorkommt, wurden Liposomen mit mehreren dieser Lipide dargestellt. Die Liposomen wurden nach der von *MacDonald et al. (1991)* beschriebenen Extrusionsmethode mittels eines *LiposoFast*-Filtersystems durchgeführt (5.2.2.1). Die Präparation erfolgte hierbei in Wasser statt in Pufferlösung, um nach Belichtung der Liposomenlösungen die anschließende Gefriertrocknung und die Charakterisierung der Photokopplungsprodukte über HPTLC-Dünnschichtplatten zu erleichtern.

Die Analysen der Insertionsprodukte der Glc-S-Cer-Sonden sind bereits in der Diplomarbeit begonnen und im Rahmen dieser Dissertation fortgesetzt worden. Hierbei wurden auch seltenere Lipide verwendet, wie z.B. Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylglycerol (PG), das überwiegend lysosomal vorkommende Bis(monoacylglycerol)-phosphat (BMP), sowie das mitochondriale Cardiolipin. Für die zweifelsfreie Charakterisierung einiger Photokopplungsprodukte ist zusätzlich eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt worden (Kapitel 3.3).

Ebenso wurden mit den neusynthetisierten Sphingomyelin-Sonden Kopplungsprodukte durch Belichtungsexperimente in Liposomen als Referenzverbindungen hergestellt. Die mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie charakterisierten Banden werden in den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.3.2.2 besprochen.

3.2.1 Photoaktivierbare Glucosyl-thio-ceramide und ihre Kopplungsprodukte

3.2.1.1 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung

In der folgenden Abbildung 3.4 ist ein Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C3-Glucosyl-thio-ceramid-Photosonde mit verschiedenen Wirtslipiden in Liposomen dargestellt. In den Bahnen 2 bis 7 sind die photogekoppelten Insertionsprodukte, sowie in Bahn 1 die unbelichtete Sonde, aufgetragen. Weiterhin ist das Diazoisomer erkennbar, welches durch Ringöffnung des Diazirin-Dreirings entsteht. In der Tabelle 3.1 werden sowohl die prozentuale Lipidzusammensetzung (in Mol-%, in Klammern) dieser Vesikel, als auch der prozentuale Anteil am den Photoinsertionsprodukten der Sonden

nach Belichtung (in Fettdruck) aufgeführt. Dazu wurde die Summe der Kopplungsprodukte mit den in den Liposomen enthaltenen Lipiden auf 100 % normiert. Bei dieser Berechnung wurden das Produkt der Wasserinsertion und das Diazoisomer der Sonde nicht berücksichtigt, da diese keine Photokopplungsprodukte mit den Wirtslipiden repräsentierten. Zur Verdeutlichung der Kopplungsverhältnisse wird der Quotient (*kursiv*) der tatsächlich gefundenen Markierung zu der in den Liposomen enthaltenen Menge angegeben.

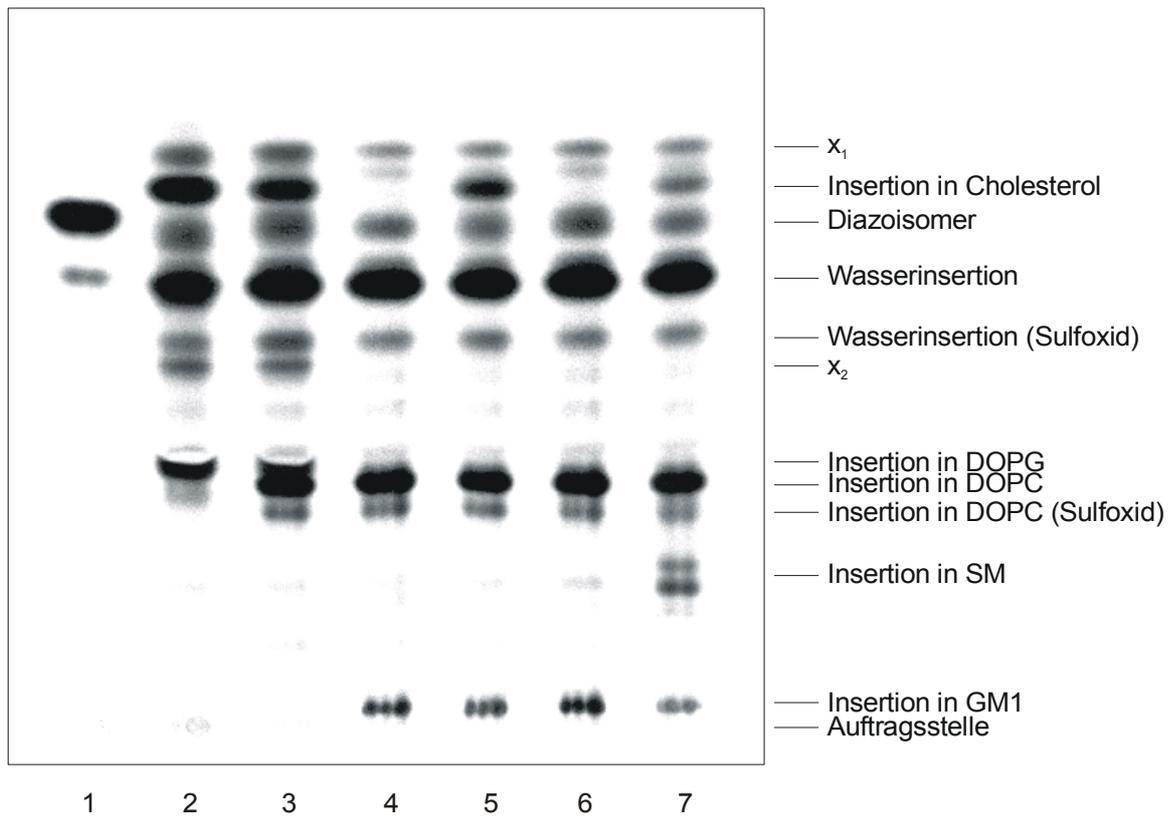


Abb. 3.4: Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C3-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde aus Liposomenexperimenten. Die Liposomen wurden gemäß 5.2.2.1 hergestellt und entsprechend 5.2.2.2 belichtet. x_1 , x_2 : Nicht identifizierte Banden. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete C3-Glc-S-Cer-Sonde mit Sulfoxidbande.

Bahnen 2-7: Kopplungsprodukte aus Liposomen. Zusammensetzungen siehe Tabelle 3.1.

Bahn Lipid	2	3	4	5	6	7
DOPC		$\frac{58,3}{(39)} \equiv 1,5$	$\frac{89,6}{(78)} \equiv 1,1$	$\frac{69,9}{(58)} \equiv 1,2$	$\frac{82,8}{(58)} \equiv 1,4$	$\frac{68,8}{(58)} \equiv 1,2$
Cholesterol	$\frac{62,6}{(30)} \equiv 2,1$	$\frac{28,5}{(20)} \equiv 1,4$		$\frac{21,4}{(20)} \equiv 1,1$		$\frac{11,3}{(10)} \equiv 1,1$
DMPG	$\frac{37,4}{(68)} \equiv 0,6$	$\frac{13,3}{(39)} \equiv 0,3$				
GM1			$\frac{10,4}{(20)} \equiv 0,5$	$\frac{8,7}{(20)} \equiv 0,4$	$\frac{13,3}{(20)} \equiv 0,7$	$\frac{4,8}{(10)} \equiv 0,5$
N-O-SM					$\frac{4,0}{(20)} \equiv 0,2$	$\frac{15,1}{(20)} \equiv 0,8$

Tabelle 3.1: Lipidzusammensetzung (in Mol-%; in Klammern) der verwendeten Liposomen und die aus der Auswertung der in Abb. 3.4 dargestellten Banden tatsächlich erhaltenen Insertionswerte (in Mol-%; **Fettdruck**). Weiterhin wird auch der Quotient (*kursiv*) der beiden Werte angegeben. Alle Mischungen enthielten 2 Mol-% C3-Glc-S-Cer-Photosonde. Für die Berechnung der Prozentanteile wurde die Summe der Kopplungsprodukte mit den in den Liposomen enthaltenen Lipiden auf 100 % normiert. Nicht berücksichtigt wurden dabei die Wasserinsertion und das Diazoprodukt, da diese keine Photokopplungsprodukte mit den Wirtslipiden repräsentierten.

Bei Gleichverteilung aller Partner sollten die Insertionsprodukte in ihrer Menge der Stöchiometrie der in den Liposomen enthaltenen Lipide entsprechen. Die Auswertung der Photokopplungsprodukte zeigt, dass es bei den verschiedenen Zusammensetzungen der Liposomen zu großen Schwankungen in den Verhältnissen der Lipidinsertion kommt. Dabei ist die Art der Wirtslipide entscheidend für die Häufigkeit der Insertion, was zum einen durch eine Phasen- oder Domänenbildung in den Liposomen, zum anderen auch durch eine besondere Attraktivität oder Abstoßung einzelner Lipidmoleküle zu erklären ist. So ist in Abb. 3.4 erkennbar, dass bei Liposomen, die nur Dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG) und Cholesterol als Wirtslipide beinhalteten, eindeutig das Sterol als Kopplungspartner bevorzugt wurde (Auswertung Tabelle 3.1). Hingegen wurde in Mischungen, wo zusätzlich Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC) zugesetzt wurde, keine besondere Präferenz mehr für das Cholesterol festgestellt.

Für die Kopplung der C3- und C5-Glc-S-Cer-Sonden mit Cholesterol wurde bereits in der Diplomarbeit (Hörnschemeyer, 1997) nachgewiesen, dass es zu einer Gleichverteilung der Kopplungsprodukte mit dem Sterol entsprechend seines molaren Anteils in Liposomen kommt. Auch mit der C7-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde konnte das im Rahmen dieser Arbeit mit den meisten Liposomenmischungen gezeigt werden. Dieses gilt vor allem für diejenigen Modellsysteme, die die üblicherweise in der extrazellulären Schicht der Plasmamembran vorkommenden Lipide (PC, SM und Cholesterol) enthielten.

Die Ergebnisse aus diesen Liposomenexperimenten bestätigen nicht die für biologische Membranen beschriebenen Beobachtungen, wonach Cholesterol offenbar starke Wechselwirkungen mit den Sphingolipiden zeigt. Im natürlichen Milieu werden, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, Mikrodomänen bzw. „rafts“ ausgebildet, die abgegrenzte Bereiche innerhalb der Membranen darstellen und einen erhöhten Anteil an Cholesterol, Sphingomyelin und Glykosphingolipiden besitzen. Diese vermutlich aufgrund ihrer physikochemischen Wechselwirkungen besonders assoziierten Lipide stellen zusammen mit bestimmten Proteinen Inseln innerhalb der Zellmembranen dar. Endogenes Glucosylceramid könnte als Vertreter der GSL auch innerhalb dieser „rafts“ lokalisiert sein. Sollten die Glc-S-Cer-Sonden ebenfalls in diesen Bereichen angereichert sein, so sollten sie nach ihrer Photolyse präferentiell in Cholesterol inserieren.

Die Abbildung 3.5 zeigt die Photokopplungsprodukte aus weiteren Experimenten in Modellmembranen, die zur Erstellung einer „Referenzbibliothek der Insertionsprodukte“ mit der C7-Glc-S-Cer-Sonde durchgeführt wurden. Die Zusammensetzung der verwendeten Liposomen sowie die Auswertung dieser Versuche sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

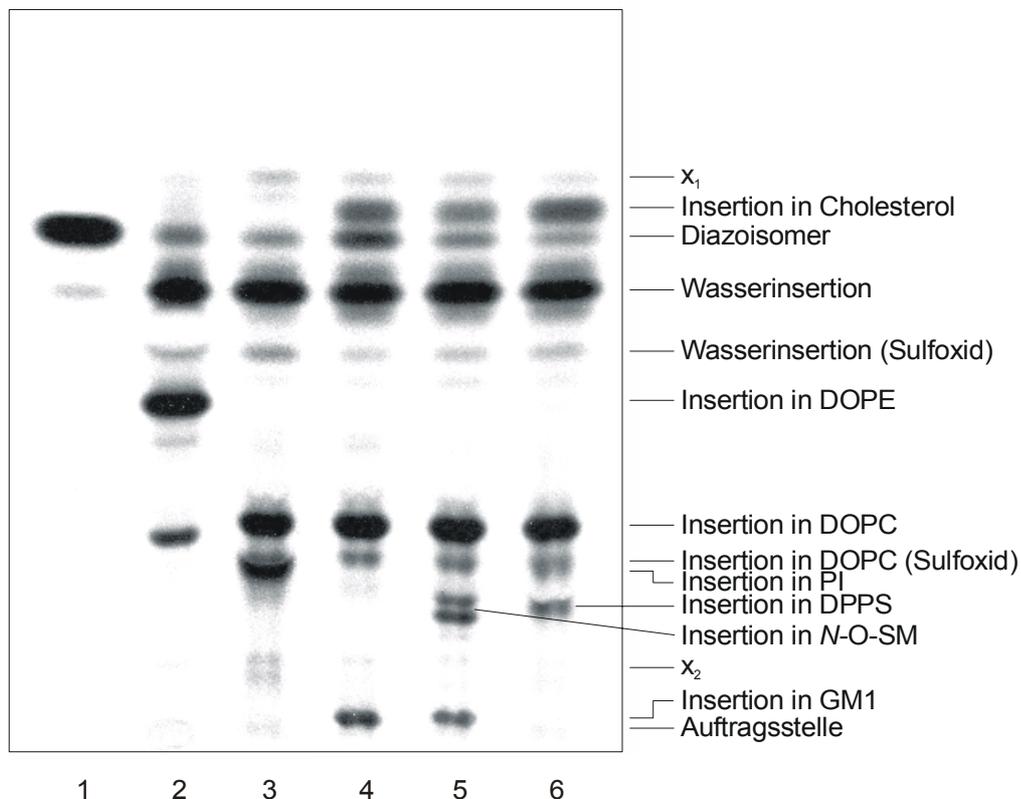


Abb. 3.5: Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C7-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde aus Liposomenexperimenten. Die Liposomen wurden gemäß 5.2.2.1 hergestellt und entsprechend 5.2.2.2 belichtetet. x_1 , x_2 : Nicht identifizierte Banden. Laufmittel : Chloroform/ Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete C7-Glc-S-Cer-Sonde mit Sulfoxidbande.

Bahnen 2-6: Kopplungsprodukte aus Liposomen. Zusammensetzungen siehe Tabelle 3.2.

Bahn	2	3	4	5	6
Lipid					
DOPC	$\frac{11,0}{(49)} \equiv 0,2$	$\frac{69,9}{(69)} \equiv 1,0$	$\frac{79,1}{(58)} \equiv 1,4$	$\frac{76,5}{(58)} \equiv 1,3$	$\frac{74,6}{(39)} \equiv 1,9$
DOPE	$\frac{89,0}{(49)} \equiv 1,8$				
PI (aus Rinderleber)		$\frac{30,1}{(29)} \equiv 1,0$			
Cholesterol			$\frac{12,9}{(20)} \equiv 0,6$	$\frac{7,9}{(10)} \equiv 0,8$	$\frac{18,6}{(20)} \equiv 0,9$
GM1			$\frac{8,0}{(20)} \equiv 0,4$	$\frac{4,5}{(10)} \equiv 0,5$	
N-O-SM				$\frac{11,1}{(20)} \equiv 0,6$	
DPPS					$\frac{6,8}{(39)} \equiv 0,2$

Tabelle 3.2: Lipidzusammensetzung (in Mol-%; in Klammern) der verwendeten Liposomen und die aus der Auswertung der in Abb. 3.4 dargestellten Banden tatsächlich erhaltenen Insertionswerte (in Mol-%; **Fettdruck**). Weiterhin wird auch der Quotient (*kursiv*) der beiden Werte angegeben. Alle Mischungen enthielten 2 Mol-% C7-Glc-S-Cer-Photosonde. Für die Berechnung der Prozentanteile wurde die Summe der Kopplungsprodukte mit den in den Liposomen enthaltenen Lipiden auf 100 % normiert. Nicht berücksichtigt wurden dabei die Wasserinsertion und das Diazoprodukt, da diese keine Photokopplungsprodukte mit den Wirtslipiden repräsentierten.

Bei diesen Experimenten war besonders die niedrige Insertionsrate in Dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS) auffällig, die weit unter dem bei Gleichverteilung der Lipide zu erwartenden Wert lag. Hier kann es zu der bereits angesprochenen Phasenbildung in den Liposomen gekommen sein, da dieses Lipid eine Schmelztemperatur T_c von 54°C besitzt und es trotz eines Cholesterol-Gehaltes von 20 Mol-% vermutlich nicht zu einer homogenen Mischung aller Wirtslipide gekommen ist. In einem weiteren Versuch mit nativen PS aus Rinderhirn wurde allerdings erneut die geringe Insertionsrate in dieses anionische Lipid bestätigt, obwohl dieses seinen Schmelzbereich unterhalb der Raumtemperatur hat.

Für die Lipidklasse der Phosphatidylethanolamine (PE) konnte allerdings eine deutliche Bevorzugung der Insertion gemessen werden. Bei gleichen Anteilen von DOPE und DOPC in binären Mischungen (und 2 Mol-% Sonde) wurde bei allen drei TPD-Glucosylthio-ceramid-Sonden ein Verhältnis der Insertionsprodukte von 5,7(±0,1) : 1 gefunden. Da bei so hohen Anteilen von DOPE in den Liposomen nicht auszuschließen ist, dass es zu

Phasenbildungen kommt, wurden mit der C5-Glc-S-Cer-Sonde weitere Versuche mit geringeren molaren Anteilen dieses Phospholipids in Liposomen gemacht. Dabei wurden nun zwar vermehrt Kopplungsprodukte mit DOPC gebildet, allerdings im Verhältnis deutlich weniger, als es bei gleichverteilter Insertion in beide Lipide zu erwarten gewesen wäre (Tabelle 3.3).

Anteil in Liposomen (DOPC : DOPE) [Mol-%]	berechnetes Verhältnis	gefundene Insertion
49 : 49	1 : 1	1 : 5,6
78 : 20	3,9 : 1	2,5 : 1
88 : 10	8,8 : 1	5,9 : 1

Tabelle 3.3: Liposomenexperimente mit DOPC und DOPE als Wirtslipide. Die Mischungen enthielten zusätzlich je 2 Mol-% C5-Glc-S-Cer-Photosonde.

Aufgrund der hohen Beweglichkeit der Photosonden mit kurzer Acylkette senkrecht zur Ebene der Lipidschicht („*hopping-rate*“) ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass nach Photolyse der Diazirinyrings das entstandene Carben in unterschiedliche Positionen benachbarter Lipidmoleküle inseriert. So kann beispielsweise die Insertion in Cholesterol in verschiedene Positionen des Steroidgerüsts und bei der C7-Verbindung auch in die Seitenkette erfolgen, was zu unterschiedlichen Polaritäten des neu entstandenen Moleküls führen kann. Diese Isomere (Positionsisomere) haben auf den Dünnschichtplatten u.U. ein unterschiedliches Laufverhalten und können somit in mehrere Banden auftrennen. Auch kann die unterschiedliche Angriffsrichtung des Carbens im Moment der Photokopplung zu Enantiomerenpaaren führen.

Vor allem die längerkettige C7-Glc-S-Cer-Sonde zeigt bei den Insertionsprodukten z.T. zwei Banden, die durch Positionsisomerie bzw. Enantiomerenbildung zu erklären sind. Ein entsprechender Befund wurde mit den Sphingomyelin-Photosonden erhalten (vergleiche Kap. 3.2.2.1).

Da diese Produkte aber nur geringe Unterschiede in ihren Laufverhalten aufweisen, können bei nicht ausreichender Trennleistung der DC-Platte diese Banden auch mal nur als eine Bande zu erkennen sein. Auch das Produkt der Wasserinsertion der C5-Glc-S-Cer-Sonde (C5-GSC-Sonde) spaltet bei einigen Dünnschichtplatten in zwei Banden auf, welche durch Diastereomerenbildung erklärt werden kann. In den meisten Fällen lässt sich aber aufgrund geringer Laufunterschiede nur eine Bande auf dem DC erkennen.

Für die Analyse der Lipidnachbarschaft ist diese Isomerenbildung aber unbedeutend, da hierfür nur die Identität des Kopplungspartners, nicht aber die genaue Position und Stereochemie der Insertion entscheidend ist.

Die nachfolgende Tabelle 3.4 zeigt eine Übersicht der mittels Liposomenexperimenten dargestellten Kopplungsprodukte und deren dünnschichtchromatographische Retentionswerte (R_f -Werte):

Kopplung mit:	C3-GSC-Sonde	C5-GSC-Sonde	C7-GSC-Sonde
Wasser	0,53	0,57	0,58
Cholesterol	0,65	0,67	0,68
Fettsäuren	0,70	0,71	0,72
N-Oleoyl-Sphingomyelin	0,13	0,14	0,15
GM1	0,02	0,02	0,02
DOPC	0,22	0,23	0,24
DOPE	0,39	0,41	0,42
DOPA	0,22	0,23	0,24
DMPG	0,24	0,25	0,25
DPPS	0,17	0,18	0,19
PI	0,17	0,19	0,20
BMP	-	0,45	-
Cardiolipin	-	0,41	-

Tabelle 3.4: R_f -Werte der Kopplungsprodukte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden ermittelt von HPTLC-Platten mit Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Aufgrund der Oxidierbarkeit der thioglykosidischen Bindung zum Sulfoxid (*Schwarzmann et al., 1995*) sind auch bei diesen Experimenten weitere Banden der Kopplungsprodukte mit geringerem R_f -Wert zu erkennen. Diese Banden können durch Luftoxidation oder auch durch Oxidation mit dem in den Lösungsmitteln gelösten Sauerstoff entstehen. Daher wurde während der Aufarbeitungen stets mit Argon-gesättigten Lösungs- und Laufmitteln gearbeitet. Obwohl der Luftkontakt der Sonden möglichst unterbunden wurde, konnte trotzdem die Bildung dieser Sulfoxide nie ganz verhindert werden. Auch durch die Entnahme der Sonden aus den Stocklösungen wurde dort stets ein kleiner Anteil der nicht verbrauchten Sonden oxidiert, so dass nach längerem Gebrauch der Lösungen eine Nachreinigung der Substanzen über Dünnschichtplatten notwendig wurde.

Die R_f -Werte einiger dieser Kopplungsprodukte, die mit den Sulfoxiden der entsprechenden Glc-S-Cer-Sonden erhalten wurden, werden in der nachfolgenden Tabelle 3.5 aufgeführt.

Kopplung mit:	C3-Ox-GSC-Sonde	C5-Ox-GSC-Sonde	C7-Ox-GSC-Sonde
Wasser	0,44	0,48	0,50
DOPC	0,18	0,19	0,21
DOPE	0,35	0,36	0,37
Cardiolipin	-	0,36	-

Tabelle 3.5: R_f -Werte der Kopplungsprodukte der Glc-S-Cer-Sulfoxid-Sonden ermittelt von HPTLC-Platten mit Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Im nachfolgend dargestellten Experiment wurde die C3-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde in Wasser mit Ultraschall suspendiert und belichtet. Da diese Sonde für sich allein keine Liposomen oder Mizellen ausbildet, kann man davon ausgehen, dass hiernach kleinere, nicht genauer definierbare Aggregate vorlagen, so dass nur Wasser und benachbarte Sonden-Moleküle als Kopplungspartner in Frage kamen.

Bei diesem Versuch konnten verschiedene Dimere der Sonden detektiert werden, die aufgrund der hohen lokalen Konzentration der Moleküle entstehen konnten. Bei den Experimenten der Photosonden in Liposomen wurde im Regelfall eine Dotierung von 2 Mol-% gewählt, ein Gehalt, welcher noch nicht zu messbaren Mengen an Photosonden-Dimeren führt.

Die Abbildung 3.6 zeigt das Dünnschichtchromatogramm des nach Gefriertrocknung erhaltenen Lipidgemisches. Die sich unter den Banden verbergenden Lipide konnten teilweise durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.2.1, Tabelle 3.8).

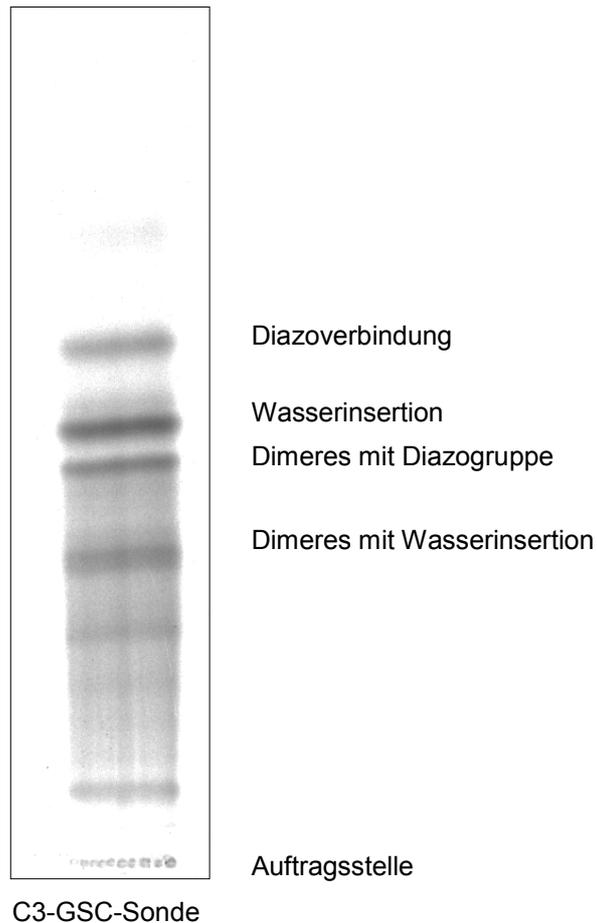


Abb. 3.6: DC von in Wasser suspendierter und anschließend belichteter C3-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde. Drei Banden (Wasserinsertion, Dimeres mit Diazogruppe, Dimeres mit Wasserinsertion) konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.8). Laufmittel : Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Von der C5- und der C7-Glc-S-Cer-Sonde konnten entsprechende Dimere mit benachbarten Sonden aus Experimenten mit Liposomen, die einen Sonden-Anteil von 30 Mol-% aufwiesen, erhalten und dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Dabei wurden vom C5-TPD-Glc-S-Cer 4 % Sonden-Dimere erhalten, die eine unreaktive Diazogruppe enthielten und ebenso 4 % Dimere bei denen eines der Moleküle in Wasser inseriert hat. Bei der C7-Verbindung hingegen wurden 9 % vom Diazo-Dimer, allerdings nur 3 % von den Dimeren mit Wasserinsertion gebildet. In Tabelle 3.6 sind die R_f -Werte der erhaltenen Photolyseprodukte dargestellt.

Produkt :	C3-GSC-Sonde	C5-GSC-Sonde	C7-GSC-Sonde
Diazoderivat	0,61	0,63	0,65
Dimeres mit Diazogruppe	0,49	0,52	0,54
Dimeres mit Wasserinsertion	0,39	0,46	0,48

Tabelle 3.6: R_f -Werte der Produkte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden ermittelt von HPTLC-Platten mit Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

3.2.1.2 Charakterisierung der Photokopplungsprodukte mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie

Bei der Aufstellung der Referenzbibliothek, d.h. bei der Photolyse der Photosonden in Liposomen in Gegenwart verschiedener Phosphoglycero- und anderer Lipide, hat sich gezeigt, dass sich die Photokopplungsprodukte häufig nur geringfügig in ihren R_f -Werten unterscheiden. Dies traf besonders für die Produkte zu, die durch Insertion der Sonden in PC, PS und PA entstanden waren. So war zu erwarten, dass viele der in biologischen Membranen generierten Kopplungsprodukte nicht mit hinreichender Sicherheit durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie zu charakterisieren sind. Deshalb wurde versucht, die Insertionsprodukte in diese Phospholipide durch eine zweidimensionale Entwicklung der Dünnschichtplatten aufzutrennen.

Für die zuvor genannten Photokopplungsprodukte mit Phospholipiden konnte diese Technik erfolgreich angewendet werden, da sich die Kopplungsprodukte mit Phosphatidylcholin von denen mit Phosphatidylserin und Phosphatidsäure in der zweidimensionalen Entwicklung gut unterscheiden ließen (mit DOPA siehe Abb. 3.7), was für die nachfolgenden Experimente mit kultivierten Zellen eine wichtige Voraussetzung war.

Die Trennung wurde dabei in einer 10x10 cm-Horizontalentwicklungskammer der Fa. *Camag* durchgeführt. Als Laufmittel diente in der ersten Dimension Methylacetat/Propan-2-ol/Chloroform/Methanol/0,25 M KCl 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v). Nach einer Zwischentrocknung über Nacht im Exsikkator wurde die Platte nach Drehung um 90° im Uhrzeigersinn mit dem zuvor bereits erwähnten Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v) in der zweiten Dimension entwickelt.

Da bei diesem aufwendigen Verfahren stets nur eine Probe pro Platte untersucht werden kann, wurde dieses nur für einige wenige Modelle durchgeführt. Ein weiterer nachteiliger Effekt ist die zusätzliche Oxidation der Thio-Photosonden in der Zwischentrocknungsphase und der zweiten Entwicklung. So kann im ungünstigsten Fall eine Bande in vier aufspalten, was die Übersichtlichkeit dieser Chromatogramme erheblich beeinflusst.

Die nachfolgende Abbildung 3.7 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm nach zweidimensionaler Auftrennung von Photokopplungsprodukten, welche aus Liposomen (DOPC 39 Mol-%, DOPA 39 Mol-%, Cholesterol 20 Mol-% und 2 Mol-% Photosonde) erhalten wurden.

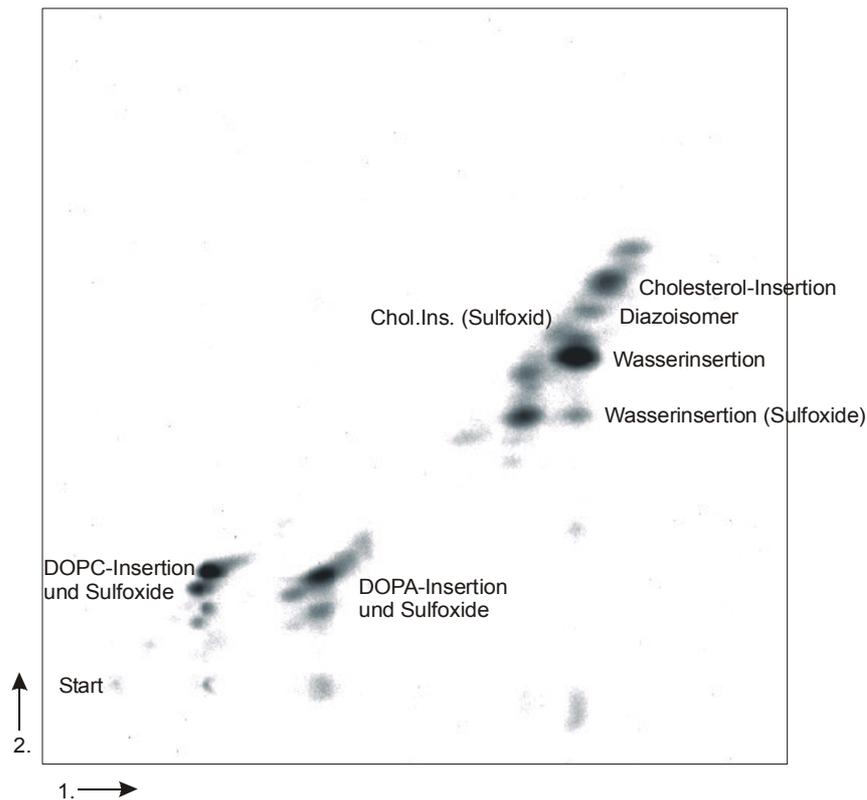


Abb. 3.7: 2D-Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C5-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde aus einem Liposomenexperiment. Die Liposomen wurden gemäß 5.2.2.1 hergestellt und entsprechend 5.2.2.2 belichtetet. Zusammensetzung: DOPC 39 Mol-%, DOPA 39 Mol-%, Cholesterol 20 Mol-% und 2 Mol-% Photosonde. Entwicklung gemäß 5.2.1.1. Laufmittel : 1.Dimension: Methylacetat/Propan-2-ol/Chloroform/Methanol/0,25 M KCl 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v); 2.Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

3.2.1.3 Untersuchungen zur Photoinsertion in Wasser

Bei den Liposomenexperimenten wurden mit den kürzerkettigen Derivaten relativ hohe Prozentwerte für die Insertion in Wasser erhalten, die in vielen Fällen sogar zur Bildung des Hauptprodukts der Photoinsertion führte. Auch in einer früheren Veröffentlichung (Meier *et al.*, 1990) wurde bereits auf das Auftreten der Wasserinsertionsprodukte in Liposomen und Mikrosomen aus Kälberhirn hingewiesen. Allerdings erscheint es nach den vorherrschenden Vorstellungen für den Aufbau biologischer Membranen unwahrscheinlich, dass in einer Liposomenmembran ein Wassergehalt von über 60 Mol-% vorliegen kann, wie es in DOPC-Liposomen mit der C3-Glc-S-Cer-Sonde gemessen wurde (Abb. 3.8). Vielmehr kann ein Teil dieser Insertionsprodukte durch die „off-rate“ der Sonden in das die Membranen umgebende Wasser (und der anschließenden Photokopplung an dieses) entstehen. Sollte dieser Effekt für das Auftreten der Wasserinsertionsprodukte überwiegend verantwortlich sein, so sollte es bei einer zunehmend festeren Verankerung in der Membran, wie es für die C7-TPD-Glc-S-Cer-Sonde im Vergleich zur kürzerkettigen C3-Verbindung der Fall ist, zu einer Verringerung dieser Kopplungsprodukte kommen.

Auch sollte bei geringer Temperatur die „off-rate“ der Sonden entsprechend geringer sein, so dass auch hier dann die Insertionsrate in Wasser sinken sollte.

So wurde im folgenden der Einfluss der Acylkettenlänge der Photosonde auf die Wasserinsertion untersucht. Dazu wurden DOPC-Liposomen mit 2 Mol-% der jeweiligen Glc-S-Cer-Photosonden bei 25°C präpariert und belichtet.

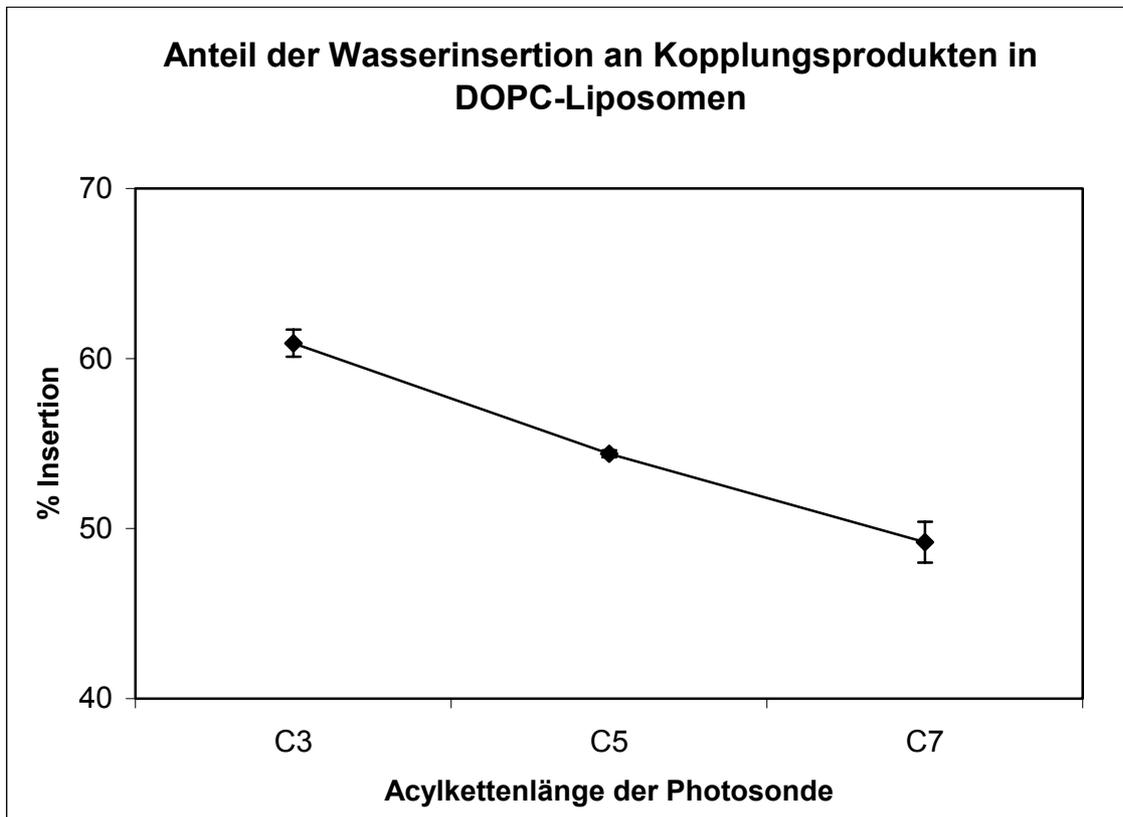


Abb. 3.8: Wasserinsertion der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden in Abhängigkeit der Acylkettenlänge. Die Liposomen bestehend aus 98 Mol-% DOPC und je 2 Mol-% Sonde wurden gemäß 5.2.2.1 bei 25°C hergestellt und nach 5.2.2.2 belichtet (Mittelwerte aus Doppelbestimmung).

Aus der Abbildung 3.8 wird ersichtlich, dass der Anteil dieser Insertion bei längerer Acylkette der Sonde abnimmt. Bei der C7-Verbindung werden im Mittel nur noch 49,4 % der Sonde in Wasser inseriert, gegenüber 54,4 % bei der C5- und 60,9 % bei der C3-Glc-S-Cer-Sonde. Dieses lässt auf eine stärkere Verankerung der längererkettigen Photosonden im hydrophoben Bereich der Membran schließen, da die längere Fettsäure mehr *van der Waals*-Wechselwirkungen mit den umgebenden Molekülen eingehen kann. Auch ist eventuell in den inneren Bereichen der Membran ein geringerer Anteil an Wasser vorhanden als in den äußeren, so dass es hier zu einer Ausbildung eines Gradienten der Wasserkonzentration in der Membran kommen könnte. In einem solchen Fall würde die C7-Sonde, dessen TPD-Gruppe im tieferliegenden Bereich und somit Wasser ärmeren Teil lokalisiert ist, ebenfalls eine geringere Insertionsrate in Wasser zeigen. Der Anteil der durch *gauche/gauche*-Konfiguration der Fettsäuren in die

wässrige Phase herausragenden Photosonde („*looping-back*“) kann nach diesen Ergebnissen als vernachlässigbar angesehen werden, müsste sich dabei doch die Wasserinsertion bei einer längeren Kette und somit größerer Anzahl von Freiheitsgraden erhöhen.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Temperatur während der Belichtung auf die Insertion in Wasser hat. Dazu wurden Liposomen mit DOPC als Wirtslipid und 2 Mol-% der jeweiligen Glc-S-Cer-Photosonden bei 25°C dargestellt und bei drei verschiedenen Temperaturen (0, 25 und 45°C) belichtet.

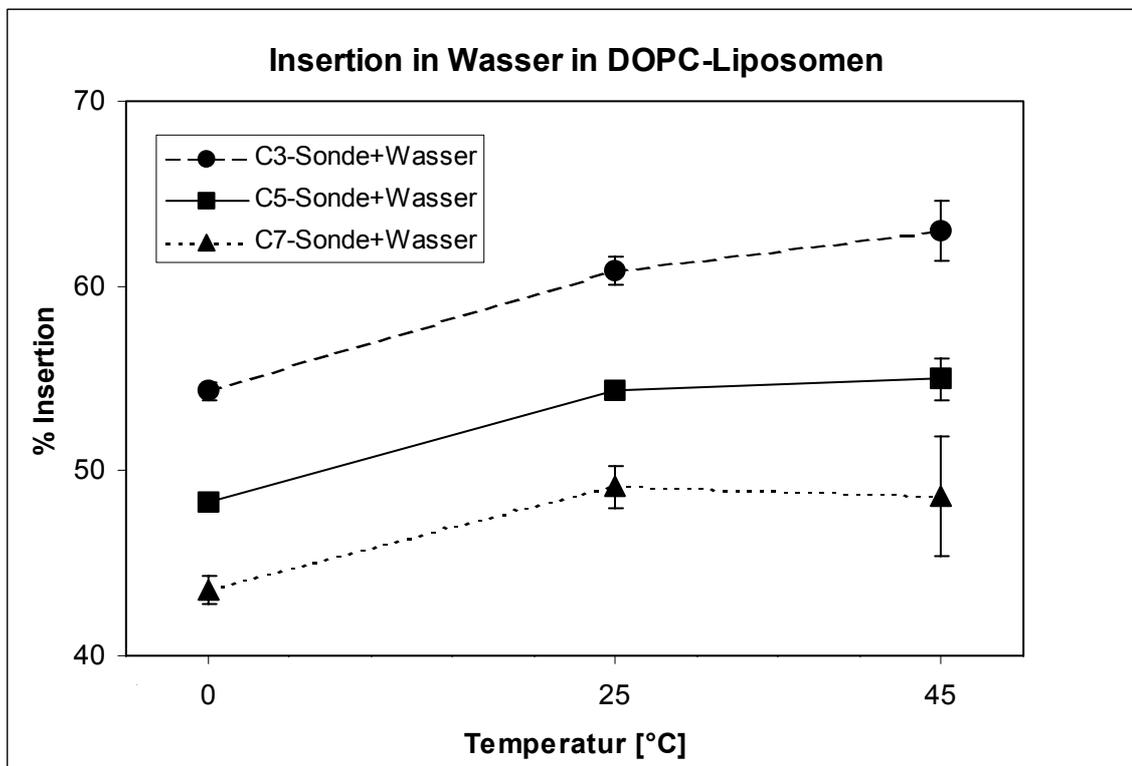


Abb. 3.9: Wasserinsertion der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden in Abhängigkeit der Acylkettenlänge und der Temperatur während der Belichtung. DOPC-Liposomen (2 Mol-% Sonde) wurden gemäß 5.2.2.1 bei 25°C hergestellt und bei den angegebenen Temperaturen belichtet (Mittelwerte aus Doppelbestimmung).

Aus der Grafik ist ersichtlich, dass unabhängig von der TPD-Fettsäurekettenlänge bei einer höheren Temperatur während der Belichtung auch eine größere Menge Wasserinsertionsprodukt entsteht (bei C7-Sonde größere Abweichungen bei den 45°C-Werten). Dieses lässt sich zum einen durch eine erhöhte „*off-rate*“ der Sonden und der anschließenden Insertion in „*exogenes*“ Wasser erklären, da sich die Moleküle bei höherer Temperatur aufgrund ihrer Brown'schen Molekularbewegung stärker bewegen und im Falle von kurzkettigen Derivaten auch die Membran in das umgebende wässrige Medium verlassen können.

Andererseits erhöht sich bei höherer Temperatur auch die Anzahl der Wassermoleküle, die pro Zeiteinheit die Membran transversal durchquert, so dass vermehrte Kontakte mit den Sonden stattfinden können. Dieses dürfte aber eher eine untergeordnete Rolle spielen, da dieser Effekt unabhängig von der untersuchten Kettenlänge ist und natürlich die Membranintegrität erhalten bleiben muss.

Weiterhin ist ebenfalls erkennbar, dass die Wasserinsertion bei höherer Temperatur nur noch eine geringere Zunahme erfährt, welches auf eine Art Sättigungseffekt der „*off-rate*“-Bewegung hindeuten könnte.

3.2.2 Liposomenexperimente mit den Sphingomyelin-Sonden

Ebenso wie bei den Glucosyl-thio-ceramid-Photosonden wurden auch Kopplungsprodukte mit den entsprechenden Sphingomyelin-Derivaten dargestellt, die als Referenzen für die anschließenden Zellversuche dienen. Analog der unter 3.2.1.1 beschriebenen Vorgehensweise wurden die Kopplungsdimere dargestellt und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Bei einigen der so erhaltenen Dimere wurde ebenfalls eine massenspektrometrische Überprüfung durchgeführt (Kapitel 3.3.2.2).

3.2.2.1 Dünnschichtchromatographische Charakterisierung

Bei der Untersuchung der Kopplungsprodukte über DC-Platten stellte sich heraus, dass in den üblicherweise bei Glykosphingolipiden verwendeten Laufmitteln der Zusammensetzung Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 oder 60:35:8 z.T. nur sehr geringe Laufhöhen erzielt wurden. Da die Insertionsprodukte der Sphingomyelin-Sonden fast ausschließlich niedrigere Laufhöhen haben als die ungekoppelten Monomere, konnten diese kaum voneinander unterschieden werden.

Deshalb wurden umfangreiche Laufmitteltests durchgeführt, die zu einem System mit Chloroform/Methanol/Wasser 50:50:10 (v/v/v) als mobiler Phase führten. In dieser Mischung ist aber aufgrund der größeren Polarität als bei den zuvor genannten Systemen die Laufzeit der DC-Entwicklung deutlich erhöht, so dass es hierbei durch eine größer werdende Diffusion zu einer erheblichen Bandenverbreiterung kommt, die den Effekt der zunehmenden Laufhöhe wieder zunichte macht. Weiterhin traten Vermischungen von Banden ein, so dass schließlich trotz der zuvor genannten Probleme der niedrigen Laufhöhen für die weiteren Untersuchungen wieder auf das Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v) zurückgegriffen wurde.

Die Abbildung 3.10 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm von Kopplungsprodukten der C3-Sphingomyelin-Sonde mit Lipiden aus Liposomen verschiedener Zusammensetzungen (Tabelle 3.7).

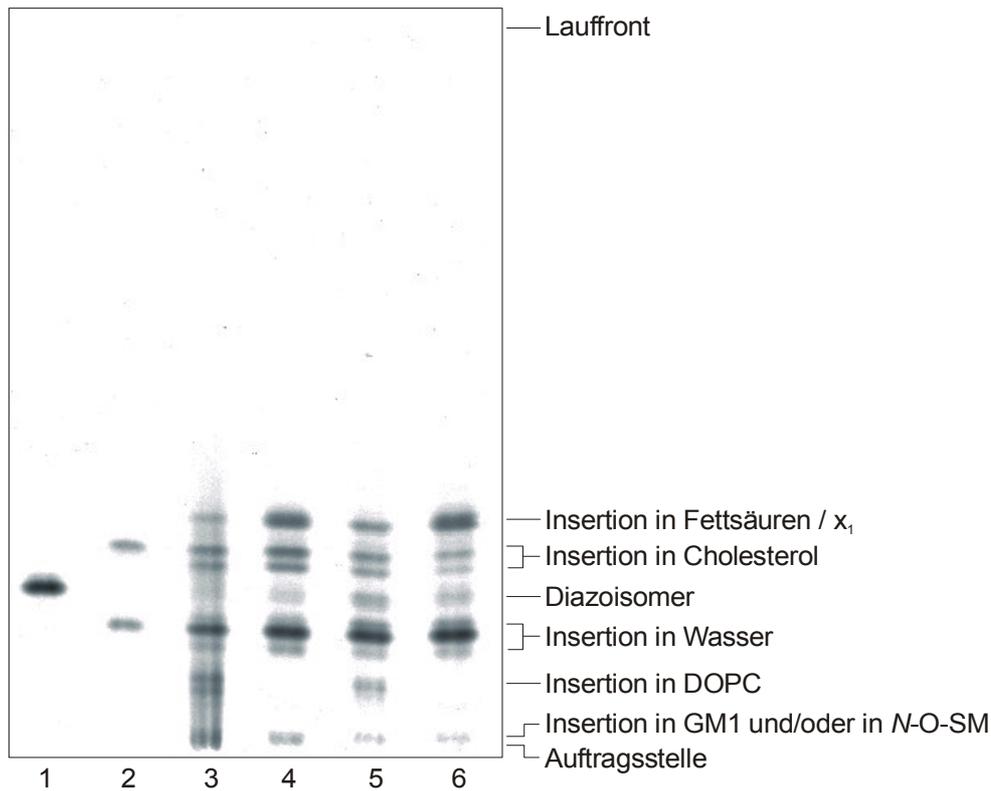


Abb. 3.10: Dünnschichtchromatogramm von Kopplungsprodukten der C3-SM-Photosonde aus Liposomen. Zusammensetzung gemäß Tabelle 3.7. x_1 : Nicht identifizierte Bande (gleiche Laufhöhe wie Fettsäure-Insertionsbande). Laufmittel : Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).
 Bahn 1: Unbelichtete C3-SM-Sonde.
 Bahn 2: Referenzen (Insertion in Cholesterol, Insertion in Wasser; jeweils nur ein Isomer).
 Bahnen 3,5: Gemäß 5.2.2.1 hergestellte und belichtete Liposomenmischungen.
 Bahnen 4,6: Liposomenmischungen der Bahnen 3,5 nach alkalischer Hydrolyse.

Da der Anteil des Wasserinsertionsproduktes hierbei sehr stark von der jeweiligen Liposomenzusammensetzung abhing, wurden bei der Auswertung die Werte der Kopplungsprodukte lediglich als Prozente an der Gesamtradioaktivität der jeweiligen Bahn angeben.

Bahn	3		5	
Lipid				
DOPC	50 (16,2)		80 (5,7)	
Cholesterol	30 (19,7)		10 (17,4)	
<i>N</i> -O-SM	10	(8,1)*	4	(1,5)*
GM1	8		4	
(Wasser-Insertionsprodukt)	(28,1)		(56,8)	

Tabelle 3.7: Lipidzusammensetzung der in Abb. 3.10 dargestellten Liposomen in Mol-% und tatsächlich gefundene Insertionswerte nach Belichtung (in Klammern). Alle Mischungen enthielten 2 Mol-% C3-SM-Photosonde. Die Prozentzahlen der Kopplungsprodukte beziehen sich auf den Anteil an der Gesamtradioaktivität der jeweiligen Bahn.

*: Die Insertionsprodukte in *N*-O-SM und in GM1 konnten auf den Dünnschichtplatten aufgrund gleicher Laufhöhen nicht voneinander getrennt werden und sind somit zusammen angegeben worden.

Aus Bahn 5 in Abbildung 3.10 und der Auswertung in Tabelle 3.7 ist gut ersichtlich, dass es zu einer vermehrten Insertion der C3-SM-Sonde in Cholesterol gegenüber den anderen in den Liposomen enthaltenen Lipiden kommt, obwohl dieses nur in einem geringen Anteil (in einem Liposomenexperiment z.B. 10 %) in den Liposomen enthalten ist. Im Gegensatz zu den Glc-S-Cer-Sonden (Ausnahme: Experiment mit DMPG, Tabelle 3.1, Spalte 2) liegt in Modellmembranen scheinbar eine Präferenz der SM-Sonde gegenüber diesem Sterol vor. Man kann also annehmen, dass es zu einer besonderen Affinität zwischen Cholesterol und den Sphingomyelin-Sonden kommt, die im Vergleich mit den anderen Wirtslipiden zu höheren Werten der Insertion führt. Außerdem wird deutlich, dass hierbei die Phosphorylcholingruppe des Sphingomyelins eine essentielle Bedeutung haben muss, da die SM-Sonden sich von den zuvor untersuchten TPD-Glc-S-Cer-Sonden nur in der Kopfgruppe unterscheiden. Hingegen ist der membrangebundene Ceramid-Teil mit der photoaktivierbaren Fettsäure bei beiden Substanzklassen identisch.

Auch machen die in der Tabelle 3.7 erhalten Insertionswerte deutlich, dass die Zusammensetzung der Liposomen eine essenzielle Bedeutung für das erhaltene Kopplungsmuster hat. So ist z.B. die Wasserinsertion im einen Fall doppelt so hoch wie bei der zweiten Liposomenzusammensetzung. Da bei der Mischung in Bahn 3 erheblich mehr Cholesterol verwendet wurde, könnte dies bedeuten, dass dieser höhere Anteil die „*off-rate*“ der Sonde in das wässrige Medium erniedrigt und somit weniger Kopplungsprodukte mit Wasser entstehen können. Außerdem wird durch den höheren Cholesterol-Anteil in den Liposomen die Membran verdichtet und es kommt somit vermutlich zu einem verminderten Eindringen des Wassers in diese. Auch mit der entsprechenden C5-SM-Photo-sonde wurden diese Schwankungen in der Häufigkeit des Wasserinsertionsproduktes erhalten (DCs hier nicht gezeigt). Dabei zeigen die beiden Sonden bei entsprechenden Liposomen die gleichen Tendenzen zu höherer oder niedrigerer Wasserinsertion.

Auf den DCs der Liposomenexperimente mit den Sphingomyelin-Sonden haben die Kopplungsprodukte mit „normalem“ Sphingomyelin (nicht photoaktivierbar, hier mit Ölsäure acyliert), scheinbar die gleiche Laufhöhe wie solche mit GM1. Deshalb kann in den Dünnschichtchromatogrammen nicht zwischen diesen beiden Produkten unterschieden werden, so dass sie zusammen in der Tabelle 3.7 angegeben werden. Dennoch lässt sich feststellen, dass, obwohl bei einigen Versuchen *N*-Oleoyl-Sphingomyelin in Dotierungsgraden von bis zu 20 Mol-% zugesetzt wurde, nur wenige Kopplungsprodukte mit diesem detektierbar waren (DCs hier nicht gezeigt). Auch Dimere der Sonden können hierbei kaum oder gar nicht entstanden sein, da sie vermutlich die gleichen Laufeigenschaften wie die Insertionsprodukte in *N*-O-SM haben. Dieses ließe sich so deuten, dass die Sphingomyeline (und evtl. auch das GM1) innerhalb der Membran nicht oder nur selten direkt benachbart sind.

Wie zuvor für die Glc-S-Cer-Sonden beschrieben, kann es auch bei den SM-Sonden durch deren „*off-rate*“ zu isomeren Kopplungsprodukten (Positionsisomeren) kommen, die je nach Struktur ein mehr oder weniger starken Unterschied in ihrem chromatographischen Laufverhalten aufweisen. Dies ist sehr deutlich für die C3-SM-Photosonde zu beobachten, mit der zwei (Abb. 3.10) bis drei unterschiedlich polare Kopplungsprodukte (Abb.3.11) erhalten werden, und weniger deutlich für die C5-SM-Sonde zu sehen (DCs nicht gezeigt).

In der Bahn 2 in Abbildung 3.10 ist von den Referenzsubstanzen nur jeweils ein Kopplungsisomer aufgetragen worden, da die hierfür verwendeten Substanzen zur massenspektrometrischen Charakterisierung (Kap. 3.3.2.2) getrennt von den Dünnschichtplatten isoliert wurden.

Die Abbildung 3.11 zeigt, dass die gleichen radioaktiven Banden wie in dem Experiment zuvor (Abb. 3.10) erhalten werden, wenn die Markierung nicht in der Photosonde, sondern im Wirtslipid Cholesterin ist. Somit muss es sich bei den Banden um Positionsisomere der Kopplungsprodukte der C3-SM- bzw. C5-SM-Sonde mit [^{14}C]-Cholesterin handeln. Die massenspektrometrische Analyse der aus den DC-Platten extrahierten Lipide konnte diese Annahme bestätigen.

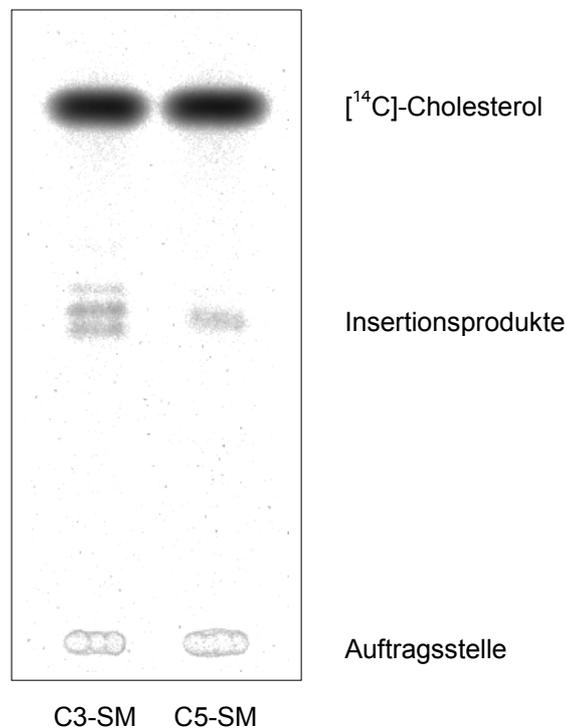


Abb. 3.11: Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der SM-Sonden aus Liposomen, zusammengesetzt aus 68 Mol-% DOPC, 30 Mol-% [^{14}C]-Cholesterin und 2 Mol-% unmarkierten SM-Sonden. Die Liposomen wurden gemäß 5.2.2.1 hergestellt und entsprechend 5.2.2.2 belichtet. Zu erkennen sind bei der C3-Verbindung drei getrennte Banden der verschiedenen Positionsisomere, bei der C5-Sonde lediglich eine Bande. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

3.3 Charakterisierung mit MALDI-/ESI-TOF-Massenspektrometrie

In den Vorarbeiten dieser Dissertation (*Hörschemeyer, 1997*) konnten bereits zwei Kopplungsprodukte durch FAB-Massenspektrometrie identifiziert werden (Insertion der C5-Glc-S-Cer-Photosonde in Wasser und in DOPC). Die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie wurde in der vorliegenden Arbeit fortgeführt. Für diese Untersuchungen stand seit Februar 1997 in unserer Abteilung ein MALDI-TOF- und ab Juli 2000 zusätzlich ein ESI-TOF-Massenspektrometer mit Nanospray-Ionenquelle zur Verfügung.

3.3.1 Extraktionsverfahren

Um ausreichende Substanzmengen für eine Charakterisierung der erhaltenen Produkte zu erhalten, wurden größere Mengen an Liposomen hergestellt und belichtet. Anschließend wurden die Lipide dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, die radioaktiv-markierten Kopplungsprodukte mittels Phosphoimager sichtbar gemacht und auf den Platten angezeichnet. Zum anderen wurden Zellversuche mit einer großen Zellzahl durchgeführt, deren Lipide nach Aufarbeitung ebenfalls über Dünnschichtplatte getrennt wurden. Nach dem Anzeichnen der entsprechenden DC-Banden wurde das Kieselgel von den Platten gekratzt und mit Lösungsmittel extrahiert. Bei den massenspektrometrischen Messungen hat sich gezeigt, dass beim Extrahieren der Lipide mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) auch Kontaminationen aus dem Kieselgel herausgelöst wurden. Dabei handelte es sich vornehmlich um Binder (u.a. Polymethacrylate) und andere Bestandteile der Platten, welche nicht durch „Waschen“ bzw. „Vorlaufenlassen“ der Platten mit Lösungsmittel entfernt werden konnten.

Daher wurde für die Extraktion das Verfahren nach *Folch et al.* in geänderter Form angewendet (5.2.2.3). Hierzu wurde die Lösungsmittel/Kieselgel-Suspension kurz zentrifugiert (10 min, 3000 rpm), wodurch sich eine Grenzschicht ausbildete, an der sich das Kieselgel sammelte. Bei dieser Methode wird eine Phasenverteilung genutzt, wobei wasserlösliche Komponenten aus dem zu extrahierenden Kieselgel im überwiegenden Maße in der Oberphase gelöst werden. Die Unterphase, welche die gewünschten lipophilen Kopplungsprodukte, die z.T. bis zu 4 aliphatische Ketten tragen, enthalten sollte, konnte vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen werden. Bei Anwendung dieses Verfahrens konnte ein Großteil der wasserlöslichen Nebenbestandteile abgetrennt werden. Allerdings hat es sich gezeigt, dass z.T. auch Polyethylenglycole (PEG) in den Kieselgel-Platten Verwendung finden, die ebenfalls in der organischen Phase verblieben. Dieses Problem trat vor allem bei Messungen auf, in denen nur sehr geringe Probenmengen der

Kopplungsprodukte vorhanden sind. In diesen Spektren wurden die Probensignale durch eine Serie der Polyethylenglycole im Bereich von 500 – 1000 amu überlagert bzw. in ihrer Intensität erheblich geschwächt.

Auch muss bei der Wahl der Lösungsmittel darauf geachtet werden, dass diese nicht aus Kunststoffgebinden, sondern aus Glasgefäßen stammen. Es konnte bei Messungen mit dem Massenspektrometer nachgewiesen werden, dass selbst in Lösungsmitteln mit p.A.-Reinheitsgrad aus Kunststoffgefäßen nicht unerhebliche PEG-Konzentrationen enthalten waren.

Die Abbildung 3.12 zeigt die MALDI-MS-Spektren des Produktes der Wasserinsertion der C5-Glc-S-Cer-Sonde, die nach Anwendung der beiden verschiedenen Extraktionsverfahren aufgenommen wurden. Der Lipidextrakt in Spektrum A weist nach einfacher Chloroform/Methanol 1:1-Extraktion noch eine Reihe von Verunreinigungen auf. Nach Anwendung des neuen Extraktionsverfahrens konnte ein Großteil der nicht den Proben zugehörigen Signale entfernt werden, so dass ein gut zuordenbares Spektrum erhalten wurde (B).

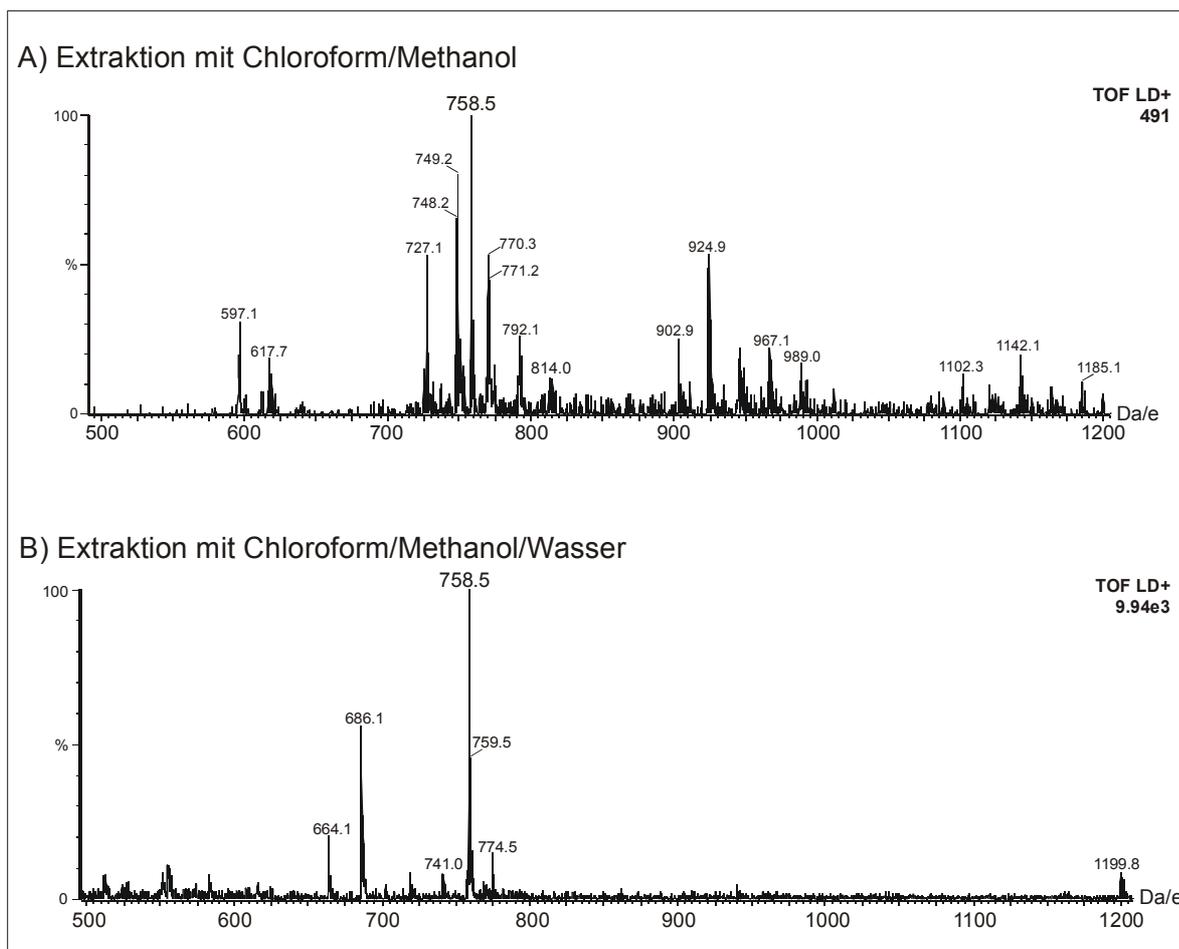


Abb. 3.12: MALDI-MS-Spektren der Insertion von C5-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde in Wasser (M_w 758.5): (A) nach Chloroform/Methanol 1:1-Extraktion, (B) nach Extraktion wie unter 5.2.2.3 beschrieben.

Für MALDI-MS genügen bei einfachen Messungen ca. 10 pmol Probensubstanz (ESI-MS u.U. auch weniger), allerdings hat sich gezeigt, dass diese Menge nach vorhergehender Kieselgel-Extraktion oft nicht ausreicht, da die Proben selbst nach gründlicher Präparation immer noch etwas kolloidal gelöstes Kieselgel enthielten. Dieses fällt beim Auftragen der Probe nach Verdunsten des Lösungsmittels auf dem Probenträger aus und stört erheblich den Desorptions- und Ionisationsvorgang während der Messung. Ebenso führen Kieselgelspuren bei der Nano-ESI-Massenspektrometrie zum Verstopfen der feinen Kapillare und somit zum Abbruch der Messung.

Von großem Vorteil erwies sich die Präparation größerer Probenmengen per DC (ca. 500 pmol pro Analyt). Diese konnten mit einer größeren Menge Lösungsmittel (20 bis 50 μ l) als zuvor (max. 10 μ l) für MALDI-MS-Messungen auf eine Konzentration von ca. 25 pmol/ μ l in Methanol oder Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) eingestellt (ESI-MS 10 pmol/ μ l in Methanol). Durch die größere Verdünnung der Probe konnte der Gehalt an kolloidal gelöstem Kieselgel in dem zu messenden Aliquot auf einen Bruchteil gesenkt werden.

3.3.2 *Massenspektrometrisch nachgewiesene Kopplungsprodukte*

3.3.2.1 Glucosyl-thio-ceramid-Sonden

MALDI und ESI stellen schonende, weiche Ionisationsverfahren dar, bei denen durch Einbettung in eine Matrixsubstanz bzw. Ionisation in Flüssigkeit wenig Fragment-Ionen entstehen. Daher konnten die meisten Kopplungsprodukte aufgrund ihrer Molekulargewichte in den Spektren gut nachgewiesen werden. In der folgenden Tabelle 3.8 sind die Kopplungsprodukte aufgeführt, die durch ihre entsprechenden Molekülpeaks und z.T. auch durch charakteristische Fragmente eindeutig identifiziert werden konnten. Es wurden, wie für die Substanzklasse der Glykolipide üblich, im überwiegenden Maße Alkalimetall-Addukte der Moleküle als Hauptpeaks gefunden. Diese sind deshalb als solche in der Tabelle angegeben.

Kopplungsprodukt	[M+Na] ⁺ berechnet	[M+Na] ⁺ gemessen	[M+K] ⁺ gemessen
C3-GSC + Wasser	730.36	730.36	746.39
C3-GSC + PC (Ei-Lecithin)	1471.92 (C34:1)	1471.84	1487.82
C3-GSC + Cholesterol	1098.70	1098.65	1114.65
C3-GSC-Dimeres+Diazoisomer	1429.71	1429.80	-
C3-GSC-Dimeres + Wasser	1419.71	1419.77	1435.83
C5-GSC + Wasser	758.39	758.47	774.49
C5-GSC + PC (Ei-Lecithin)	1499.96 (C34:1)	1499.92	1516.00
C5-GSC + DOPC	1525.97	1525.99	1542.07
C5-GSC + DOPE	1483.92	1484.29	1506.29 [M+2Na-H] ⁺
C5-GSC + Cholesterol	1126.73	1126.56	-
C5-GSC + N-O-SM	1468.96	1469.20	-
C5-GSC + Fettsäure	996.62 (C16:0)	996.65	1012.66
C7-GSC + Wasser	786.42	786.52	802.55
C7-GSC (Sulfoxid) + Wasser	802.42	802.47	-
C7-GSC + DOPC	1554.00	1553.85	1569.86
C7-GSC + Cholesterol	1154.76	1154.78	-
C7-GSC + DOPE	1511.94	1512.07	1534.12 [M+2Na-H] ⁺
C7-GSC + N-O-SM	1496.99	1497.79	-

Tabelle 3.8: Durch Massenspektrometrie nachgewiesene Kopplungsprodukte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden. Im Falle von starken [M+2Na-H]⁺-Signalen sind diese in der letzten Spalte statt der [M+K]⁺-Signale angegeben.

Die Analyse der Kopplungsprodukte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden mit Sphingomyelin war auch ohne alkalische Hydrolyse möglich, wenngleich das Spektrum der Proben auch nicht gekoppelte Phospholipide, wie z.B. PC, PS und PA, enthielt. Aufgrund der identischen Laufeigenschaften dieser Substanzen auf den DC-Platten waren die Proben nach Extraktion aus dem Kieselgel folglich mit diesen Phosphoglycerolipiden kontaminiert. Da diese in den Liposomen gegenüber der Sonde zudem noch im großen Überschuss vorla-

gen, dominierten sie auch die aufgenommenen MS-Spektren. Trotzdem konnte aber eine Zuordnung aufgrund der hohen Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Methode und der charakteristischen, hohen Massen der SM-Insertionsprodukte erfolgen.

Die Messung der unbelichteten Sonden konnte nicht mit dem MALDI-MS durchgeführt werden, da dieses einen N₂-Laser mit der Wellenlänge 337 nm verwendet und so die Diazirin-Gruppe mit ihrem Absorptionsmaximum bei 360 nm (*Brunner et al., 1980; Hörnschemeyer, 1997*) *in situ* photolysiert wird. Dadurch kommt es auf dem Probenträger zu Folgereaktionen und es wird ein komplexes Spektrum erhalten, dessen Peaks nicht zugeordnet werden können. Ebenfalls konnten mit dem Elektrospray-MS keine authentischen Spektren aufgezeichnet werden, da hier offensichtlich die zur Ionisation notwendige Kapillarspannung von 1000 V das Diazirin zerstört und es ebenfalls zu unerwünschten Reaktionen und Umlagerungen kommt.

3.3.2.2 Sphingomyelin-Sonden

Das Verfahren der Charakterisierung mittels Massenspektrometrie wurde auch bei den Sphingomyelin-Sonden durchgeführt. Auch hier wurden, wie bei den Glc-S-Cer-Sonden, in den überwiegenden Fällen Alkalimetall-Addukte detektiert. Die Tabelle 3.9 zeigt die durch die Massenspektrometrie nachgewiesenen Kopplungsprodukte:

Kopplungsprodukt	[M+Na] ⁺ berechnet	[M+Na] ⁺ gemessen	[M+K] ⁺ gemessen
C3-SM + Wasser	719.40	719.54	-
C3-SM + DOPC	1486.98	1487.01	-
C3-SM + Cholesterol	1087.74	1087.88	1103.88
C5-SM + Wasser	747.73	747.71	-
C5-SM + Cholesterol	1115.77	1116.28	1132.21

Tabelle 3.9: Durch Massenspektrometrie nachgewiesene Kopplungsprodukte der Sphingomyelin-Sonden.

3.4 Zellkulturexperimente

3.4.1 Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen Glucosyl-thio-ceramide in Membranen humaner Fibroblasten

3.4.1.1 Einbau in Zellmembranen

Für die Einbau- und Stoffwechseluntersuchungen wurden die Photosonden den kultivierten Fibroblasten exogen als stöchiometrischer 1:1-Lipid/BSA-Komplex angeboten. Bei den ersten Zellexperimenten mit den C3- und C5-TPD-Glc-S-Cer-Sonden wurde den Zellen der Komplex unter Temperaturblock der Endozytose 30 Minuten bei 7°C unter Lichtausschluss gefüttert, wonach eine für die weiteren Bearbeitungsschritte ausreichende Menge der Sonden in die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran inkorporiert wurde.

Nach Fertigstellung der C7-Glucosyl-thio-ceramid-Verbindung hat sich bei entsprechenden Zellversuchen eine längere Inkubationszeit als notwendig herausgestellt, da dieses Lipid aufgrund seiner größeren Hydrophobizität mit BSA stabilere Komplexe als die C3- und C5-Sonden ausbildet und somit langsamer vom Medium in die Plasmamembran der Zellen transferiert wird. Um für die weiteren Untersuchungen ausreichende Lipidmengen in die Zellen einzubauen, wurde bei den weiteren Experimenten bei allen Sonden eine längere Inkubationszeit von 2 Stunden bei 7°C gewählt. Im Anschluss daran wurde das Medium gewechselt und je nach Fragestellung wurden die Zellen sofort belichtet (Plasmamembran-Markierung) oder eine bestimmte Zeit bei 37°C inkubiert (Endozytose) und danach belichtet.

Die Menge der in die Plasmamembran inkorporierten Sonden ist von der Temperatur und der Dauer der Inkubation abhängig. Da zwischen der Inkorporation in die Membran und Adsorption an BSA ein Gleichgewicht besteht, kann sich dieses bei niedrigen Temperaturen während der Inkubation langsamer einstellen und somit können weniger Moleküle in die Plasmamembran inkorporiert werden. Auch nimmt bei niedrigeren Temperaturen die Stabilität des Lipid/BSA-Komplexes zu, so dass sich die Sonden schwerer vom Protein lösen und in die Membran inkorporiert werden können. Allerdings bedeutet eine tiefere Temperatur auch, dass der vesikuläre Transport innerhalb der Zelle unterbunden ist und somit kein Material endozytiert werden kann (Endozytoseblock). Dadurch kann es möglicherweise zu einer Sättigung der Aufnahmekapazität der PM kommen und der Einbau weiterer Sonden-Moleküle verhindert werden.

Von den C3- und C5-Derivaten konnten im selben Zeitraum unter gleichen Inkubationsbedingungen erheblich mehr Moleküle als von der längererkettigen C7-Verbindung in die

Plasmamembran inkorporiert werden. Insgesamt konnten Aufnahmezeiten von 3-13 % der mit dem Medium angebotenen Lipidmenge (6,4 – 21,9 nmol Lipid/mg Protein) aus dem Medium erzielt werden (Tabelle 3.10).

Sonde	Einbaurate $\left[\frac{\text{nmol Sonde}}{\text{mg Protein}} \right]$
C3-Glc-S-Cer	21,9 ± 7,6
C5-Glc-S-Cer	17,3 ± 6,2
C7-Glc-S-Cer	6,4 ± 2,2

Tabelle 3.10: Einbauraten der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden in humane Fibroblasten nach 2 h Inkubation bei 7°C (Mittelwerte aus 8 Zellschalen).

Die großen Schwankungsbreiten der auf die Proteinmenge bezogenen Einbauraten lassen sich u.U. durch die relativ ungenaue Proteinbestimmung aus Zellhomogenaten erklären. Nach der Homogenisierung mit einer Pipettenspitze liegen evtl. noch größere Zelltrümmer vor, die somit die Messung verfälschen und zu „Ausreißen“ führen können. Auch sind die Fehler bei Proteinbestimmungen generell hoch, so dass bei Experimenten an anderen Versuchstagen die Ergebnisse zu höheren oder tieferen Werten verschoben sein können. Innerhalb einer Versuchsreihe sind die Einbauraten allerdings relativ konstant, so dass davon ausgegangen wird, dass die Schwankungsbreiten eher auf einen systematischen Fehler als auf unterschiedliche Aufnahmezeiten der Zellen zurückzuführen sind.

3.4.1.2 Stoffwechseluntersuchungen

In einer früheren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Glucosyl-thio-ceramide aufgrund der thioglykosidischen Bindung durch die Glucocerebrosidase nicht gespalten werden (*Albrecht et al., 1995*). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass derartige Glucosyl-ceramide, welche einen [¹⁴C]-Oktansäure- oder einen [¹⁴C]-Dodecansäurerest tragen, auch zelltypspezifisch glykosyliert wurden (*Schwarzmann et al., 1995; Pütz, 1996*). Frühere Untersuchungen mit GM1- und GM3-Derivaten, die ebenfalls eine thioglykosidische Bindung zum Ceramid trugen, haben gezeigt, dass diese in Fibroblasten bis zum Glucosyl-thio-ceramid abgebaut wurden (referiert in *Schwarzmann, 2001*). Es wurde weiterhin beobachtet, dass nur die kurzkettigen Verbindungen (z.B. mit C₈-Acyllketten) das Lysosom verlassen und im Golgi-Apparat glykosyliert wurden, während die länger-kettigen Derivate im Lysosom verblieben und somit in den Zellen gespeichert wurden. Ebenso können auch kurzkettige Sphingomyeline und Ceramide aus den Lysosomen entweichen.

Um zu untersuchen, ob die hier verwendeten Photosonden unter den gewählten Zellkulturbedingungen stabil sind, wurde auch der Metabolismus dieser Sonden untersucht. Im Falle einer starken Verstoffwechslung könnten auch die Stoffwechselprodukte Kopplungsmuster erzeugen, die die komplexen DC-Muster weiter komplizierten, so dass diese u.U. nicht mehr auswertbar wären.

Die Sonden wurden für die Metabolismusstudien 6 Stunden unter Lichtausschluss bei 37°C in Fibroblasten inkorporiert. Anschließend wurden die Zellen unter Lichtausschluss geerntet. Diese Zeitdauer wurde gewählt, da sie der längsten Inkubationszeit bei den folgenden Photokopplungsexperimenten entspricht.

Obwohl in meinen Studien mit 6 Stunden Inkubation bei 37°C erheblich kürzere Zeiten verwendet wurden als in den zuvor genannten Arbeiten (20 Stunden), wurden auch die Photosonden in den Golgi transportiert und dort als Substrate von den entsprechenden Glykosyltransferasen erkannt (Abb. 3.13, Tabelle 3.11).

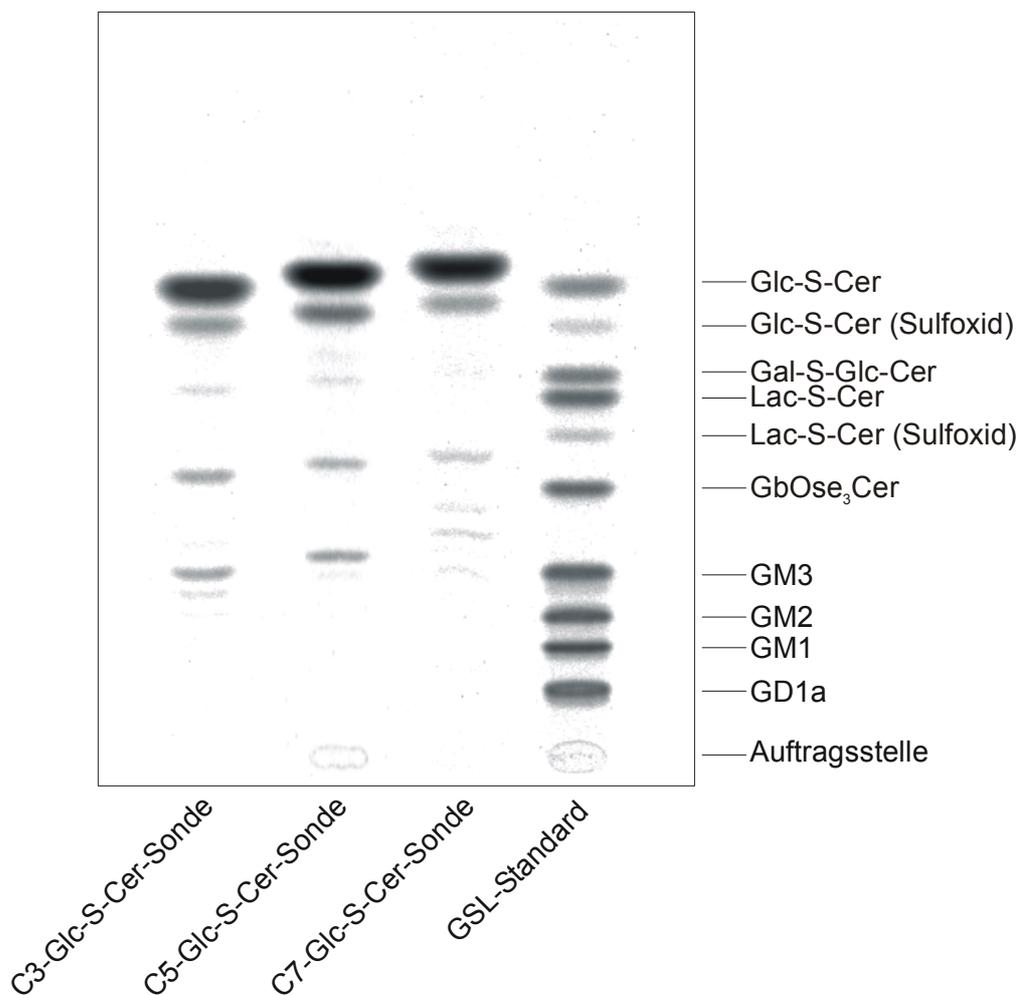


Abb. 3.13: Stoffwechseluntersuchungen in humanen Fibroblasten mit den Glucosyl-thio-ceramid-Sonden. 6 Stunden Inkubation von Fibroblasten bei 37°C mit 10 µM Sonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM ohne Belichtung. Auswertung siehe Tabelle 3.11. Laufmittel: Chloroform/Methanol/15 mM CaCl₂ 60:35:8 (v/v/v).

Die Abbildung 3.13 zeigt das Lipidmuster, das nach 6 Stunden Inkubation von humanen Fibroblasten mit den Glc-S-Cer-Photosonden (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) erhalten wurde. Zu erkennen ist, dass nach dieser Inkubationszeit überwiegend das noch nicht-verstoffwechselte Lipid vorhanden war. Insgesamt wurden hier nur geringe Mengen der TPD-Sonden glykosyliert. Bei den detektierbaren Glykosylierungsprodukten (Abb. 3.13) handelt es sich aufgrund des Laufverhaltens und des Vergleichs mit analogen Referenzen mit großer Sicherheit um die Analoga des Globotriaosylceramids (GbOse₃Cer) und des GM3, welche die in diesen Zellen hauptsächlich vorkommenden Glykolipide sind (*Chatterjee et al., 1976; van Echten und Sandhoff, 1989*). Neben diesen Hauptglykolipiden kommen, wenn auch in geringerer Menge, Globotetraosylceramid und die Ganglioside GM1, GM2, GD3 und GD1a vor. Die entsprechenden radioaktiven Analoga konnten wohl aufgrund der kurzen Inkubationszeit von 6 Stunden hier nicht detektiert werden. Gleichwohl wurden sie bei längerer Inkubationszeit von mehr als 20 Stunden als Analoga von einem C₈-Glucosyl-thio-ceramid gebildet (*Schwarzmann et al., 1995*).

Die pro Zeiteinheit gebildete Menge dieser Glykosylierungsprodukte war abhängig von der Kettenlänge der TPD-Fettsäure (bei C7 1,3 % gegenüber 3,6 % bei der C5- bzw. 4,3 % bei der C3-Verbindung, Tabelle 3.11). Dies kann bei den längerkettigen Verbindungen durch deren niedrigere „off-rate“ von den intraendosomal/lysosomalen Vesikeln und damit durch ein längeres Verbleiben in den endozytotischen Kompartimenten erklärt werden.

	C3-TPD-GSC	C5-TPD-GSC	C7-TPD-GSC
Glc-S-Cer	95,7 ± 0,1	96,5 ± 0,1	98,8 ± 0,1
Lac-S-Cer	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,1
GbOse ₃ -S-Cer	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2
SGM3	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1

Tabelle 3.11: Prozentuale Anteile der Stoffwechselprodukte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden nach 6 Stunden Inkubationsdauer (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

3.4.1.3 Plasmamembran-Markierung

Die Plasmamembran einer eukaryontischen Zelle grenzt den Zellinhalt gegenüber deren Umgebung nach außen hin ab. Diese ca. 4-5 nm dicke Doppelschicht aus amphiphilen Lipidmolekülen und verschiedenen Proteinen besitzt eine fluide Struktur, die auch als „zweidimensionale Flüssigkeit“ beschrieben wird (*Singer und Nicholson, 1972*). Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt wurde, ist die Lipiddoppelschicht asymmetrisch aufgebaut und hat somit in der zytosolisch orientierten Lipidschicht eine andere Zusammensetzung als in der dem Extrazellulärraum zugewandten Seite. So finden sich auf der letzteren im überwiegenden Maße Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM), während die zytosolische Seite Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidsäure (PA) trägt. Die Gruppe der Glykosphingolipide ist bis auf das Glucosylceramid hingegen streng extrazellulär orientiert. GlcCer wird auf der zytosolischen Seite des Golgi-Apparates gebildet (*Coste et al., 1985; Coste et al., 1986*) und könnte sich somit evtl. zusätzlich auch auf der zytosolischen Membranseite der Plasmamembran befinden. Ebenso kommt Cholesterol in beiden Membranhälften vor und kann auch frei durch den hydrophoben Bereich wechseln.

In dieser Arbeit sollte die Lipidnachbarschaft der (Glyko-)Sphingolipide in der Plasmamembran von humanen Fibroblasten untersucht werden, wozu sich die photolabilen Sonden anbieten. Dazu wurden die Zellen mit den Sonden (wie unter 3.4.1.1 beschrieben) 2 Stunden bei 7°C unter Endozytoseblock inkubiert, wobei die Lipidmoleküle in die extrazelluläre Seite der PM inkorporiert wurden. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen belichtet. Versuche mit Temperaturen von 0°C und 20°C während der Belichtung (Abb. 3.14) haben gezeigt, dass zwar bei der höheren Temperatur die Insertion in Wasser begünstigt wurde (siehe auch Kapitel 3.2.1.4), das Verhältnis der Kopplungsprodukte mit Lipiden untereinander sich aber nicht änderte. Um nicht durch eine niedrige Temperatur eine eventuell geänderte Lipidumgebung ähnlich einer Phasensegregation zu erzeugen, wurde bei allen weiteren Experimenten eine Temperatur von 20°C während der Belichtung gewählt. Die Abbildung 3.14 auf der folgenden Seite zeigt das nach Belichtung der Sonden erhaltene Kopplungsmuster.

Die Glc-S-Cer-Sonden sind aufgrund ihrer hydrophilen Glucose-Kopfgruppe nicht fähig, spontan eine *flip-flop*-Bewegung auszuführen (*Sillence et al., 2000*), so dass man davon ausgehen kann, dass sie sich nur in der extrazellulären Seite der PM aufhalten. Wie bereits zuvor beschrieben wurde, enthält diese Membranhälfte im überwiegenden Maße Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und Cholesterol. Messungen mit mehreren unabhängigen Methoden zeigen einen Phospholipidanteil der PM von ca. 50 % an den Gesamtlipiden. Die Berechnung erfolgte durch eine Bestimmung des Phosphatgehaltes der ein-

zelen Phospholipide, so dass in diesen Angaben ebenfalls Sphingomyelin erhalten ist. Der Anteil des PC an diesen „Phospholipiden“ beträgt dabei ca. 40 %, der des PE etwa 24 %. und SM 16 % (Übersicht in *van Meer und van Genderen, 1994*). Bei den Messungen wurden aber nicht die jeweiligen Membranseiten unterschieden, so dass hier noch gewisse Ungenauigkeiten bei der Betrachtung der exoplasmatischen Seite der PM vorliegen.

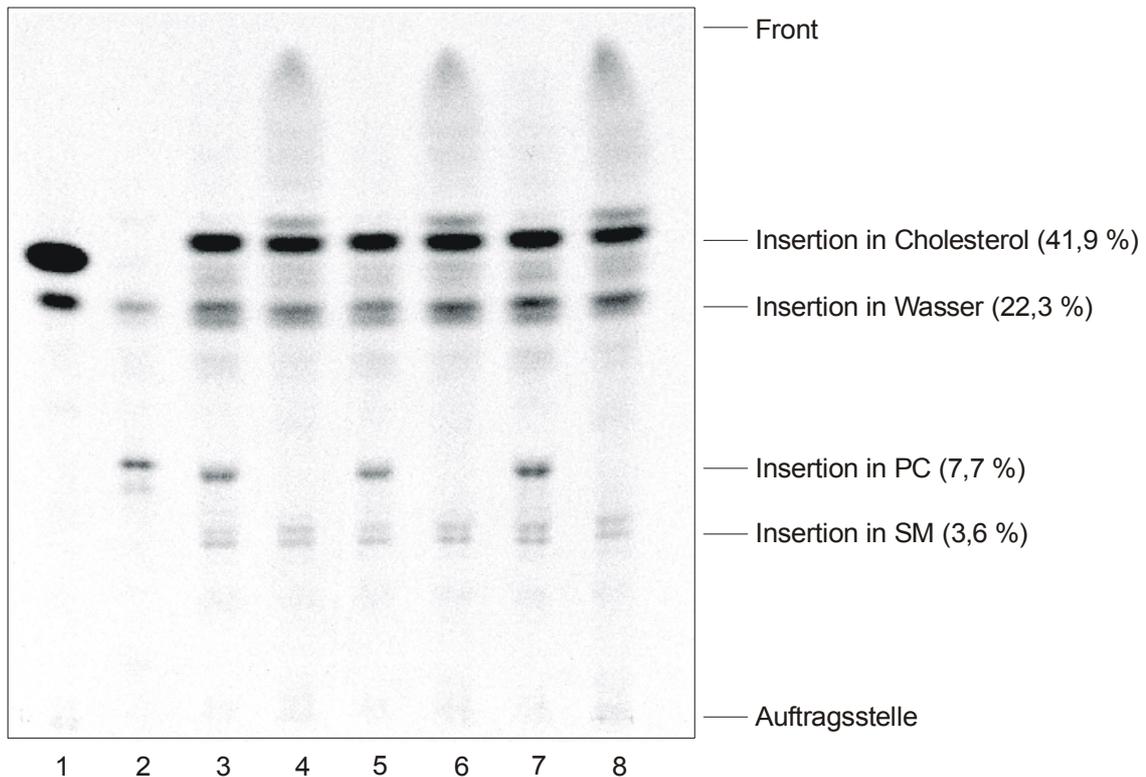


Abb. 3.14: Plasmamembran-Markierung von humanen Fibroblasten mit C5-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde. 30 Minuten Fütterung von 10 μM C5-Glc-S-Cer-Photosonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM an humane Fibroblasten bei 7°C unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 0°C (Bahnen 1-6) bzw. 20°C (Bahnen 7,8). Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf den Anteil an der Gesamtradioaktivität gemittelt über die Bahnen 3 und 5. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).
 Bahn 1: Unbelichtete C5-Glc-S-Cer-Sonde und Sulfoxid.
 Bahn 2: Referenzen (Wasserinsertionsprodukt, Insertion in DOPC).
 Bahnen 3,5: Zellextrakte I,II nach Belichtung bei 4°C.
 Bahnen 4,6: Alkalische Hydrolyse der Zellextrakte I,II.
 Bahn 7: Zellextrakt nach Belichtung bei 20°C.
 Bahn 8: Alkalische Hydrolyse des Zellextraktes III.

Die in der Literatur angegebenen Werte für den Gehalt an Cholesterol differieren sehr stark je nach angewandeter Bestimmungsmethode. Er dürfte allerdings Werte von 30-40 Mol-% nicht übersteigen, da es sonst vermutlich zur Ausbildung von hexagonalen Phasen und zur Instabilität der Membran kommen würde (*D.Marsh*, persönliche Mitteilung). *Y. Lange (1991)* berichtete, dass nach Cholesterol-Oxidase-Messungen 90 % des freien Sterols der Zelle in der PM lokalisiert sind.

Somit sollte es bei einer Gleichverteilung der Lipide in der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu einem Verhältnis der Kopplungsprodukte der Photosonde mit Cholesterol:PC:SM von etwa 2:1:1 kommen.

Wie die Abbildung 3.14 und die Auswertung in Tabelle 3.12 zeigen, wurde bei der Photolyse der C5-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde in der PM ein gänzlich anderes Verhältnis der Kopplungsprodukte erhalten. Als Hauptprodukt wurde mit 41,9 % Anteil an der Gesamtradioaktivität der Bahn die Insertion in Cholesterol gefunden, während PC und SM als Hauptlipide dieser Membranhälfte nur mit 7,7 % bzw. 3,6 % einen geringen Anteil an den Insertionsprodukten ausmachen. Berücksichtigt man nur diese drei Kopplungsprodukte, die mit Lipiden der äußeren Membranschicht entstehen, so ergibt sich ein Verhältnis von 11,6 : 2,1 : 1 (Cholesterol:PC:SM) dieser Insertionsprodukte zueinander. Da bei Gleichverteilung der Lipide innerhalb der Membran eine solche molare Zusammensetzung nicht gegeben sein kann, und da die Sonden in Liposomenversuchen keine präferenzielle Insertion in Cholesterol zeigen (Kapitel 3.2.1.1), lässt dieses Ergebnis nur den Schluss zu, dass sich die Sonde während der Kopplung in einer Cholesterol-reichen Domäne befunden haben muss. Da die Photokopplung sehr schnell geschieht, muss diese Domäne schon vor der Belichtung existiert haben. Die als Mikrodomänen oder „rafts“ (vgl. Einleitung) bekannten Lipidphasen haben außer ihrem höheren Cholesterolgehalt ebenfalls einen erhöhten Anteil an Sphingomyelin und an Glykosphingolipiden. Die Kopplungsprodukte mit diesen sind allerdings mit 3,6 % als relativ gering einzustufen bzw. sind gar nicht detektierbar.

Sonde	C3-TPD-GSC	C5-TPD-GSC	C7-TPD-GSC
Kopplung in			
Cholesterol	27,3 ± 1,6	41,9 ± 3,3	x ₁
Phosphatidylcholin (PC)	7,4 ± 0,5	7,7 ± 0,4	
Sphingomyelin (SM)	2,7 ± 0,1	3,6 ± 0,2	
Wasser	24,7 ± 1,0	22,3 ± 0,3	
Verhältnis der markierten Lipide (Chol:PC:SM)	10,1 : 2,7 : 1	11,6 : 2,1 : 1	

Tabelle 3.12: Prozentuale Anteile der Insertionsprodukte der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden bei Markierung der Plasmamembran (30 Minuten Inkubation von humanen Fibroblasten mit 10 µM Glc-S-Cer-Photosonden in HMEM bei 7°C unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 0°C bzw. 20°C; Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

x₁: Aufgrund der ungenügenden Trennschärfe der DCs der C7-Verbindung, konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche keine ausreichend genaue Auswertung der DCs durchgeführt werden (s. Abb. 3.15 und Text). Daher wurde hier auf die Angabe der Prozentzahlen verzichtet.

Bei der C7-Sonde konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente keine ausreichend gute Trennschärfe der Banden in den eindimensionalen Dünnschichtchromatogrammen herbeigeführt werden (Abb. 3.15). Somit konnte keine quantitative Auswertung der erhaltenen Kopplungsprodukte durchgeführt werden; es musste hier auf die genauen Werte verzichtet werden. Qualitativ lässt sich allerdings der Befund einer bevorzugten Insertion der Glc-S-Cer-Sonden in Cholesterin im Vergleich zu den Kopplungsprodukten mit PC und SM auch mit der C7-Verbindung bestätigen, wenngleich auch die Intensität der Cholesterin-Insertionsbanden nicht so deutlich stärker ist, wie bei den zuvor genannten Experimenten mit den C3- und C5-Sonden.

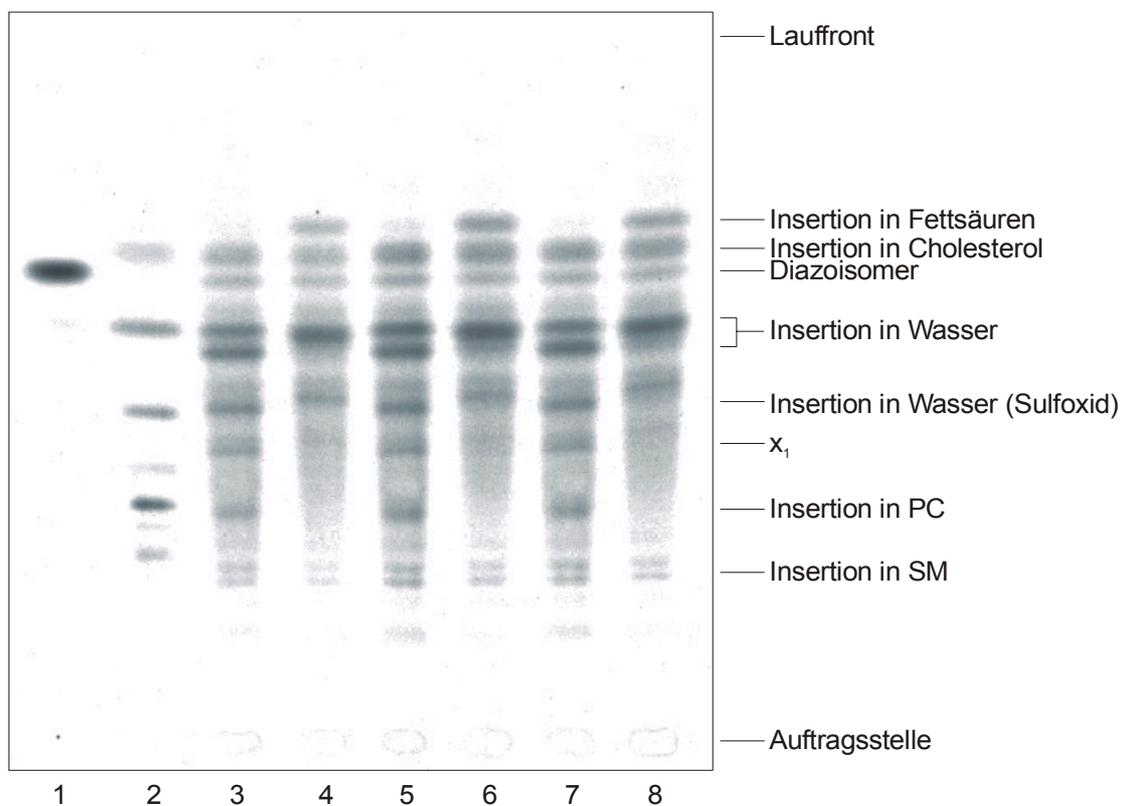


Abb. 3.15: Plasmamembran-Markierung von humanen Fibroblasten mit C7-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde. 2 Stunden Inkubation von humane Fibroblasten mit 10 μM C7-Glc-S-Cer-Photosonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM bei 7°C unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 20°C. x_1 : Nicht identifizierte Bande. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete C7-Glc-S-Cer-Sonde.

Bahn 2: Referenzen (von oben: Insertion in Cholesterin, Wasserinsertionsprodukt (ein Isomer), Insertion in DOPE und Sulfoxid, Insertion in DOPC und Sulfoxid).

Bahnen 3,5,7: Zellextrakte I,II,III nach Belichtung.

Bahnen 4,6,8: Alkalische Hydrolyse der Zellextrakte I,II,III.

Ein Grund für die schlechtere Auflösung könnte sein, dass durch die längere photoaktivierbare Acylkette nach Kopplung eine Vielzahl von Positionsisomeren entstanden sind. Diese können sich u.U. geringfügig in ihrem Laufverhalten voneinander unterscheiden und somit eine Bandenverbreiterung auf den DCs erzeugen. Die längere Kette könnte ebenfalls bewirken, dass die photolabile TPD-Gruppe bereits in den tieferen, fluideren Bereichen der Membran positioniert ist, so dass das nach Photolyse erhaltene Carben dort mehr Möglichkeiten der Insertion in die flexiblen Bereiche der Fettsäuren des Phosphatidylcholin und des Sphingomyelins besitzt. Auch kann dort die Insertion in Cholesterol in dessen Kern oder auch in die Seitenkette am C-17 des Sterols erfolgen. Dabei ist vermutlich die Seitenkette schwerer erreichbar als der Kern, so dass hierdurch auch die scheinbar niedrigere Insertionsrate der C7-Sonde in Cholesterol erklärt werden könnte.

Das sich eine entsprechend positionierte Sonde bereits unterhalb des Sterolkerns in dem flexibleren Bereichen der Lipiddoppelschicht befinden könnte, wurde in unserer Abteilung (*Schwarzmann et al., 1983*) durch Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen (ESR) mit verschiedenen Gangliosiden, die eine Nitroxylradikal-markierte Gruppe an jeweils unterschiedlichen Positionen innerhalb einer C₁₈-Acylkette tragen, gezeigt. Mit diesen Gangliosid-Derivaten konnte dann im ESR-Spektrometer die Eindringtiefe der jeweiligen Nitroxylradikal-Sonde in die Membran gemessen werden. Es konnte belegt werden, dass die Sonden, die sich an der Position C-9 der Fettsäure befanden, noch im starren Membranbereich lokalisiert waren, während Sonden an Position C-13 sich schon im fluideren, flexibleren Bereich der Acylketten befanden. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels (3.1.1) erwähnt, entspricht die C7-TPD-Photosonde in etwa einer C₁₃-Acylkette, so dass hierbei die photolabile Diazirinylgruppe, im Gegensatz zu den kürzerkettigen Derivaten mit C3- und C5-Kette, schon den tieferen Membranbereich mit flexibleren Ketten erreichen kann.

Wie schon bei den Liposomenexperimenten gezeigt, koppelt auch bei den Zellexperimenten ein Teil der Photosonden mit Wasser. Diese Kopplung erfolgt vermutlich wie zuvor beschrieben zu einem großen Teil durch die Möglichkeit der kurz-kettigen Sonden, sich aus der Ebene der Membran in die wässrige Umgebung zu lösen („*off-rate/hopping-Bewegung*“). Ein weiterer Teil der Insertionsprodukte entsteht vermutlich durch Kopplung an das in der Membran enthaltene Wasser. Durch die Wasserinsertion sind die entstandenen Verbindungen gegenüber den unbelichteten Sonden polarer und dadurch in ihrer Verankerung in der Membran geschwächt. Auch das durch unvollständige Photolyse umgelagerte Diazoderivat hat gegenüber der unbelichteten Sonde nur eine geringfügig veränderte Struktur. Daher sollten diese beiden nach Belichtung erhaltenen Produkte ebenso mit BSA aus der Plasmamembran re-extrahierbar sein („*back-exchange*“), wie die zuvor in die Membran inkorporierte, unbelichtete Sonde. Um diese Annahmen zu bestäti-

gen, wurden bei weiteren Plasmamembran-Experimenten die Zellen nach Belichtung dreimal mit 100 μM BSA in HMEM bei 7°C behandelt und anschließend die Zellen und das „back-exchange“-Medium weiter aufgearbeitet und über DC charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass wie erwartet, nur die kurzkettigen Produkte (Wasserinsertion und Diazoisomer) aus der Plasmamembran extrahiert werden konnten (Abb. 3.16). Die an Membranlipide durch Photokopplung kovalent gebundenen Moleküle konnten naturgemäß nicht mit BSA extrahiert, sondern nur durch Extraktion mittels organischer Lösungsmittel isoliert werden.

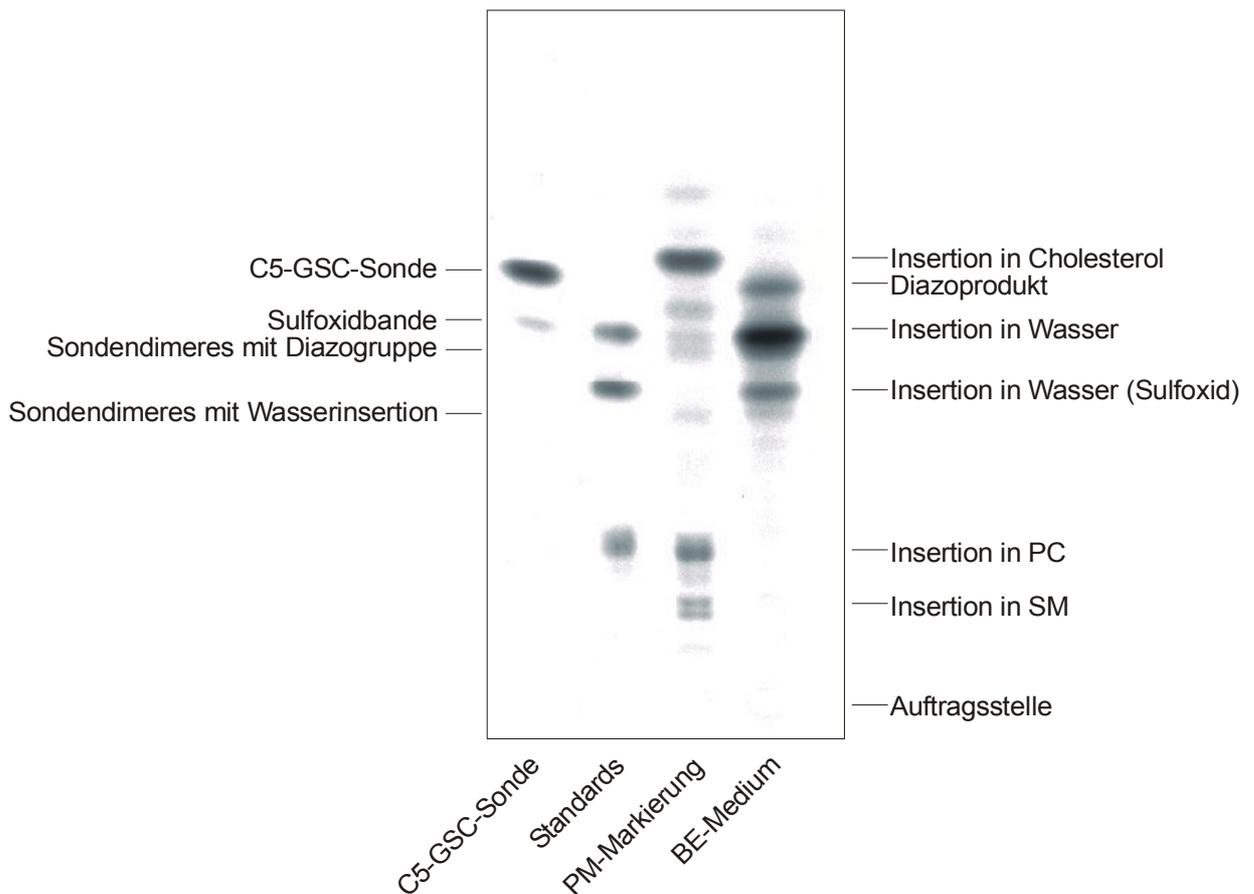


Abb. 3.16: Plasmamembran-Markierung von humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden 2 h bei 7°C mit einer 10 μM -Lösung der C5-GSC-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) inkubiert; anschließend erfolgten ein Medienwechsel und die Belichtung bei 20°C. Danach wurde ein „back-exchange“ (BE) der kurzkettigen Verbindungen (dreimal für je 10 min mit 2 ml 100 μM BSA in HMEM bei 7°C) durchgeführt. Laufmittel : Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete Sonde und entsprechendes Sulfoxid.

Bahn 2: Referenzverbindungen aus Liposomen (von oben : Wasserinsertion, Wasserinsertion-Sulfoxid, Insertion in DOPC).

Bahn 3: Zellextrakt.

Bahn 4: „back-exchange“ (BE)-Medium.

Wird durch die Inkorporation der Sonden in die Membranen eine Domänenbildung ausgelöst ?

Um zu untersuchen, ob durch die Inkorporation der Sonden in die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran evtl. erst die Bildung von Cholesterol-reichen Domänen induziert wird, wurden die Zellen mit 1/20 der üblichen Lipidkonzentration (0,5 μM statt 10 μM der C3- und C5-Sonde) inkubiert, so dass auch nur etwa 1/20 der bei 10 μM Inkubationsmedium erzielten Menge in die Plasmamembran der Fibroblasten inkorporiert wurde.

Das Ergebnis mit den C3- und C5-Glc-S-Cer-Sonden zeigte, dass nach Photolyse die gleiche prozentuale Verteilung der Kopplungsprodukte erhalten wurde, wie bei den zuvor beschriebenen Experimenten, so dass eine durch die Sonde induzierte Domänenbildung wohl ausgeschlossen werden kann.

PM-Markierungen mit den Sulfoxiden der Glc-S-Cer-Sonden

Unter 3.2.1.1 wurde bereits die Oxidierbarkeit des Schwefelatoms in der thioglykosidischen Bindung der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden zu den entsprechenden Sulfoxiden beschrieben. Da diese eine andere chemische Struktur und eventuell auch einen geänderten Winkel der aus der Membran herausragenden Glucose-Kopfgruppe aufweisen als die ursprünglichen Derivate, sollte nun untersucht werden, ob es hier auch zu Änderungen in der Assoziation mit Lipiden der Membran oder deren lateralen Verteilung kommt.

Dazu wurden die Sulfoxide der Glc-S-Cer-Photosonden aus Aufreinigungen isoliert und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, humanen Fibroblasten als 1:1-Lipid/BSA-Komplex exogen angeboten. Nach zweistündiger Inkubation bei 7°C wurde das Medium gewechselt und die Zellen belichtet bei 20°C. Die weitere Aufarbeitung und DC-Analyse erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte die gleiche Tendenz zu einer Lokalisation in Cholesterol-reichen Domänen wie schon bei den vorherigen PM-Versuchen mit den Glucosyl-thio-ceramid-Sonden (Tab. 3.13). Die relativ niedrigen Werte der Insertion in PC und SM unterliegen aber gewissen analytischen Schwankungsbreiten, so dass die Werte für die Insertionsverhältnisse von den zuvor erhaltenen Werten (Tab. 3.12) abweichen. Aufgrund der bereits beschriebenen ungenügenden Trennschärfe der Banden bei DCs der C7-Verbindung konnte auch hier keine genaue Auswertung durchgeführt werden. Allerdings kann bei dieser Sonde qualitativ ebenfalls eine Bevorzugung der Insertion in Cholesterol festgestellt werden.

Sonde	C3-TPD-Ox-GSC	C5-TPD-Ox-GSC	C7-TPD-Ox-GSC
Kopplung in Cholesterol	31,8 ± 1,1	41,6 ± 0,7	x ₁
Phosphatidylcholin (PC)	4,7 ± 0,5	5,5 ± 0,4	
Sphingomyelin (SM)	4,6 ± 0,1	5,2 ± 0,2	
Wasser	39,0 ± 1,2	22,0 ± 1,1	
Verhältnis der markierten Lipide (Chol:PC:SM)	6,9 : 1 : 1	8 : 1,1 : 1	

Tabelle 3.13: Prozentuale Anteile der Insertionsprodukte der Sulfoxide der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden bei Markierung der Plasmamembran (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung). x₁: Wie zuvor bereits beschrieben, konnte aufgrund der ungenügenden Trennschärfe der DCs der C7-Sonde keine ausreichend genaue Auswertung durchgeführt werden. Daher wurde hier erneut auf die Angabe der Prozentzahlen verzichtet.

3.4.1.4 Photomarkierungen im Zuge der Endozytose

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Frage, ob und wie sich die Lipidumgebung der Sonden im Zuge der Endozytose verändert. Dazu wurden die Photosonden als 1:1-Lipid/BSA-Komplex an humane Fibroblasten gefüttert und die Zellen bei verschiedenen Zeitfenstern der Endozytose belichtet und geerntet.

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der markierten Membranen bieten Experimente mit und ohne „back-exchange“ der sich in der Plasmamembran befindenden Sonden. Durch diese Extraktion konnten bereits nach einstündiger Endozytose nur noch ca. 20–30 % der eingebauten Sonden mit dem BE-Medium entfernt werden. Wie aus der zuvor gezeigten Abbildung 3.16 ersichtlich wurde, konnten durch das hier angewendete Verfahren des „back-exchange“ quantitativ die kurzketigen und somit extrahierbaren Moleküle entfernt werden, so dass sich ein Großteil der inkorporierten Moleküle tatsächlich bereits auf intrazellulären Membranen befunden haben musste. Durch die niedrige Temperatur von 7°C während des BE wird ein vesikulärer Transport innerhalb der Zelle unterbunden, und somit können die auf den inneren Membranen der Zelle verbleibenden Photosonden nur Lipide in diesen Membranen markieren. Die Abb. 3.17 auf der folgenden Seite zeigt die Ergebnisse eines solchen Experimentes mit der C5-Glc-S-Cer-Photosonde.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 3.14 und 3.17 (PM-Markierung vs. 6 h-Endozytose) wird deutlich, dass es bei Markierung der Lipide innerer Membranen nach sechsständiger Inkubationsdauer zu einer starken Änderung im Muster der Photokopplungsprodukte kommt. So nimmt die Insertion in Cholesterol drastisch ab, während die Kopplungsprodukte in Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) stark zunehmen. Der

Anteil der Wasserinsertion bleibt hingegen konstant.

Erklärt werden können diese Ergebnisse beim Cholesterin durch dessen zelluläre Verteilung, wonach es sich im überwiegenden Maße in der PM befindet (siehe Kapitel 3.4.1.3). Das in Abbildung 3.17 dargestellte Ergebnis zeigt auch, dass nach 6-stündiger Endozytose vermehrt Kopplungsprodukte mit Phosphatidylethanolamin entstehen, welche in den PM-Versuchen noch nicht zu detektieren waren. Dieses Lipid ist in der Plasmamembran überwiegend nur auf dessen zytosolischer Seite vorhanden, wohingegen die genaue Topologie auf den inneren Membranen bisher nicht bekannt ist. Eventuell verliert PE auf intrazellulären Membranen seine asymmetrische Verteilung auf den Membranhälften und wird somit für die Photosonden zugänglich. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass es bei den Photosonden während der Endozytose zum Verlust der asymmetrischen Anordnung kommt. Dieses würde aber nur durch eine Flippase möglich, da Glucosylceramide aufgrund ihrer hydrophilen Kopfgruppe unter den hier gewählten Bedingungen der Endozytose nicht fähig sind, spontan einen *flip-flop* zu vollziehen (Sillence et al., 2000).

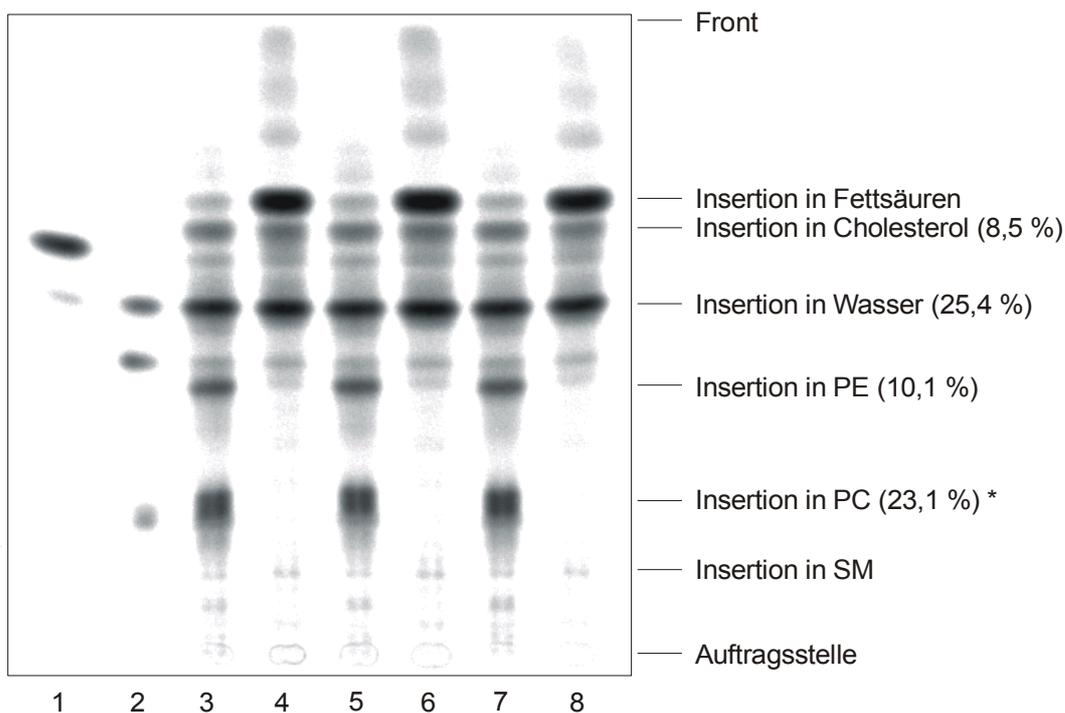


Abb. 3.17: Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte mit Lipiden der inneren Membranen von humanen Fibroblasten. 2 Stunden Inkubation von 10 μM C5-Glc-S-Cer-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 7°C, Medienwechsel und 6 Stunden-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss. Anschließend „back-exchange“ der in die PM inserierten Moleküle und Belichtung bei 20°C. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

*: In der Quantifizierung der Insertionsprodukte in PC sind in geringem Maße vermutlich auch Kopplungsprodukte mit PS und/oder PA enthalten. Diese liegen aber nur in sehr geringen Anteilen vor (vgl hierzu S.56) und werden deshalb zusammen mit dem PC-Insertionsprodukt angeben.

Bahn 1: Unbelichtete Sonde und Sulfoxid.

Bahn 2: Referenzen aus Liposomen (von oben: Wasserinsertion, Wasserinsertion-Sulfoxid, Insertion in DOPC).

Bahnen 3,5,7: Zellextrakte I,II,III nach Belichtung.

Bahnen 4,6,8: Alkalische Hydrolyse der Zellextrakte I,II,III.

Bei den Liposomenexperimenten (3.2.1.2) ist bereits beschrieben worden, dass es mit der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie nicht möglich war, Kopplungsprodukte mit PC von denen mit PA oder PS sicher zu unterscheiden, da diese ein sehr ähnliches Laufverhalten auf den DC-Platten aufweisen. Daher wurden mit einigen Zellextrakten auch 2D-Dünnschichtchromatogramme hergestellt, um die Kopplungsprodukte, die aus den Zellexperimenten herrühren, eindeutig bestimmen zu können. Da hierbei allerdings nur jeweils eine Probe pro DC-Platte untersucht werden kann, wurde auf eine Untersuchung aller Experimente mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie wegen des hohen zeitlichen Aufwandes verzichtet.

Das 2D-DC (Abb. 3.18) zeigt die radioaktiven Verbindungen aus einem Lipidextrakt von Fibroblasten, die unter Endozytoseblock die C5-Glc-S-Cer-Photosonde in Plasmamembran inkorporiert und teilweise endozytiert (4 Minuten bei 37°C) hatten. Bei diesen radioaktiven Verbindungen handelt es sich um Photokopplungsprodukte sowie um das Diazoprodukt der Sonde.

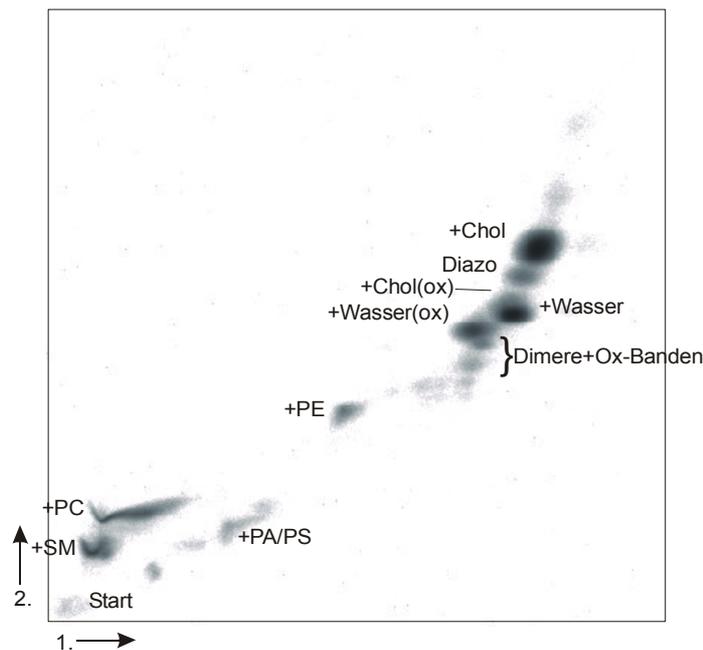


Abb. 3.18: Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm von Photokopplungsprodukten der C5-Glc-S-Cer-Sonde nach 4 Minuten Endozytose bei 37°C in humanen Fibroblasten. 2 Stunden Inkubation der Zellen mit 10 µM C5-Glc-S-Cer-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 7°C, Medienwechsel, 4 Minuten-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss und Belichtung bei 20°C. Mit „ox“ bezeichnete Banden stellen die Sulfoxide der entsprechenden Insertionsprodukte dar. Entwicklung gemäß 5.2.1.1. Laufmittel: 1.Dimension: Methylacetat/Propan-2-ol/Chloroform/Methanol/0,25 M KCl 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v); 2.Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Das DC in Abbildung 3.18 zeigt, dass im Gegensatz zum Kopplungsmuster der Plasmamembran schon bereits in einer frühen Phase der Endozytose zytosolisch orientierte Lipide wie PA und PS markiert wurden, die in der zweidimensionalen Auftrennung gut von den Kopplungsprodukten mit PC zu unterscheiden sind. Die quantitative Auswertung dieser Banden zeigt, dass diese negativ geladenen Insertionsprodukte aber nur in geringen Anteilen (1,3 %) vorkommen, während der Wert für die Insertion in PC 10 % beträgt.

Die Insertion in Cholesterol ist trotz relativ kurzer Endozytosedauer im Vergleich zu den zuvor beschriebenen PM-Experimenten verhältnismäßig stark reduziert, wohingegen andere Banden, die durch Insertion in PC herrühren, verstärkt zu detektieren sind oder wie die Insertion in PE neu hinzukommen (Auswertung siehe Abb. 3.21 und 3.22). Dieses zeigt eine deutliche Änderung der Nachbarschaft der Photosonde bereits im frühen Verlauf der Endozytose und spricht für ein Herauslösen der Sonden aus den Cholesterolreichen Domänen. Diese neue Verteilung könnte möglicherweise noch bei der Vesikelknospung aus der Plasmamembran oder in den frühen Endosomen stattfinden.

Wird die C5-Glc-S-Cer-Photosonde nach Inkorporation in die PM und einer nachfolgenden zweistündigen Endozytose bei 37°C photolysiert, ergeben sich wieder Insertionsprodukte, nun aber mit einem bezüglich des 4-minütigen Endozytose-Experimentes stärker verändertem Kopplungsmuster (Abb. 3.19). Das linke DC zeigt die radioaktiven Lipide des Zellextraktes, das rechte Bild die nach alkalischer Hydrolyse verbleibenden radioaktiven Lipide. Durch das Auftreten der Fettsäure-Insertionsbande wird ersichtlich, dass die photogekoppelten Phospholipide hydrolysiert wurden. Aus der Abbildung in der linken Bildhälfte wird deutlich, dass erneut eine starke Abnahme der Cholesterol-Insertion nach längerer Inkubationsdauer stattgefunden hat, wohingegen andere Insertionsprodukte, wie z.B. in PE, vermehrt entstanden sind.

Die MALDI-MS-Untersuchung der Fettsäure-Insertionsbande eines Experimentes, bei dem die Sonden nach Inkorporation in die PM einer sechsständigen Endozytose unterworfen wurden, hat ergeben, dass hierbei hauptsächlich Ölsäure (C18:1) markiert wurde, die bei nativen Phospholipiden überwiegend in der *sn2*-Position am Glycerolrückgrat verestert ist, während sich in *sn1*-Stellung meistens gesättigte Fettsäuren befinden. Das könnte bedeuten, dass die Photosonde räumlich dem Fettsäurerest benachbart ist, der aufgrund der *cis*-Doppelbindung in der 9,10-Position zusätzlich über einen Knick (engl. *kink*) verfügt. Möglicherweise können hierdurch besser die Zwischenräume ausgefüllt werden, die eventuell durch die kürzere TPD-Acykette der Photosonden entstehen, so dass dieser Fettsäurerest von dem nach Belichtung entstehenden Carben offensichtlich besser erreicht wird.

Die Abbildung 3.19 weist ebenfalls nur geringe Anteile an Kopplungsprodukten mit den beiden sauren Phospholipiden PS und PA auf, so dass hier davon ausgegangen wird, dass sich dieser niedrige Wert (ca. 1-2 %) für diese Insertionsprodukte im Zuge der verschiedenen Zeiten der Endozytose kaum verändert.

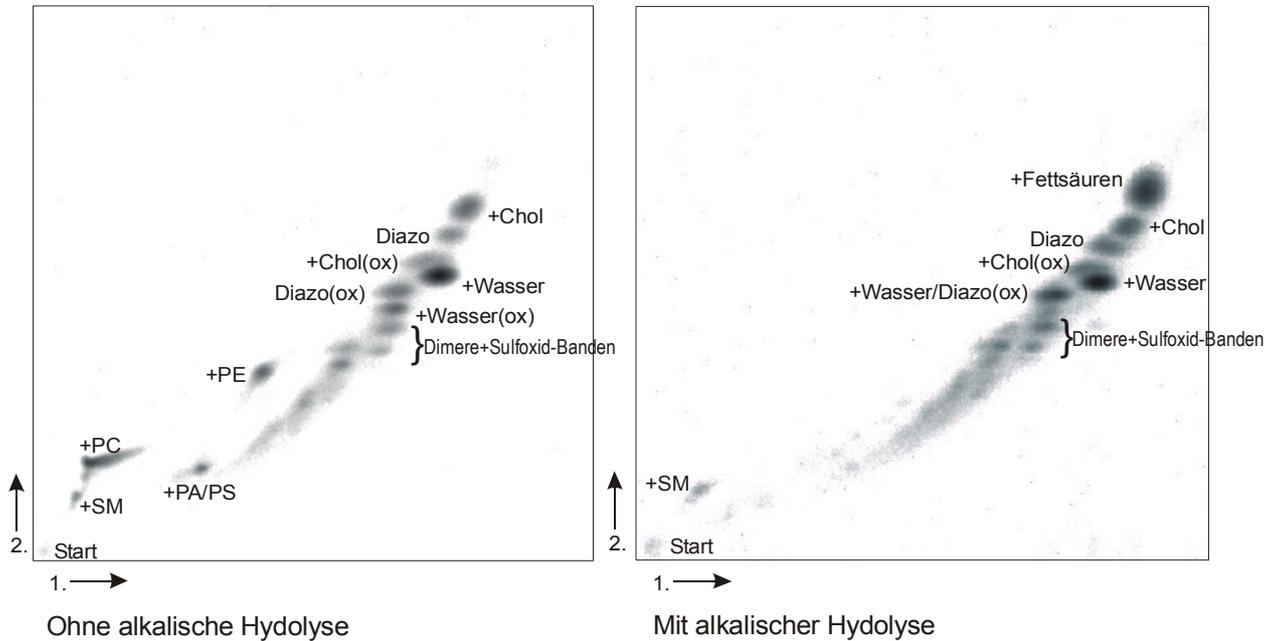


Abb. 3.19: Zweidimensionale Dünnschichtchromatogramme von Photokopplungsprodukten der C5-Glc-S-Cer-Sonde nach 2 Stunden Endozytose bei 37°C in humanen Fibroblasten. 2 Stunden Inkubation von 10 µM C5-Glc-S-Cer-Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 7°C, Medienwechsel; anschließend 2 Stunden-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss und Belichtung bei 20°C.

Linkes DC: Zellextrakt ohne alkalische Hydrolyse; rechtes DC: Gleicher Zellextrakt mit alkalischer Hydrolyse gemäß 5.2.3.8. Mit „ox“ bezeichnete Banden stellen die Sulfoxide der entsprechenden Insertionsprodukte dar. Entwicklung der DC-Platten nach 5.2.1.1. Laufmittel: 1.Dimension: Methylacetat/Propan-2-ol/Chloroform/Methanol/0,25 M KCl 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v); 2.Dimension: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v)

Aus subzellulären Fraktionierungen von eukaryontischen Zellen ist bekannt, dass in späten Endosomen und Lysosomen das Lipid Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) vorkommt, welches im Vergleich zu anderen Phospholipiden eine ungewöhnlich Konstitution aufweist (Wherrett und Huterer, 1972). Es wird beschrieben, dass diesem Lipid auf intraendosomalen und intralysosomalen eine wichtige Rolle beim Abbau der Glykosphingolipide zukommt (Wilkening et al., 1998).

Sollten sich die Photosonden im Zuge ihrer Endozytose auf diesen Membranen befinden, so wäre es möglich, dass ein Kopplungsprodukt der Photosonden mit BMP nach Photolyse entsteht.

In Liposomen wurde bereits ein derartiges Insertionsprodukt mit der C5-Glc-S-Cer-Sonde dargestellt, welches bei eindimensionaler Trennung mit dem Kopplungsprodukt mit Phosphatidylethanolamin (PE) ko-migriert. Obwohl die zweidimensionale Trennung der

Kopplungsprodukte mit PA und PS von dem mit PC bereits erfolgreich war (Kapitel 3.2.1.2), konnte dieses Verfahren bei dieser Problemstellung nicht angewendet werden, da auch auf 2D-DCs ein nahezu identisches Laufverhalten der Insertionsprodukte in PE und in BMP gefunden wurde.

Da sich die beiden Produkte allerdings in ihrer Ladung unterscheiden, wurde für die weitere Auftrennung eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, um das negativ geladene Kopplungsprodukt der Glc-S-Cer-Sonde mit BMP von dem ungeladenen PE-Insertionsprodukt zu isolieren. Für die Trennung der beiden Substanzen wurde DEAE-(Diethylaminoethyl-)Sephadex-Material (Acetat-Form) verwendet. Dabei wurden die Photokopplungsprodukte aus einem 6 h-Endozytoseexperiment im Vergleich zu Insertionsprodukten aus Liposomenversuchen über die Säulen aufgetrennt.

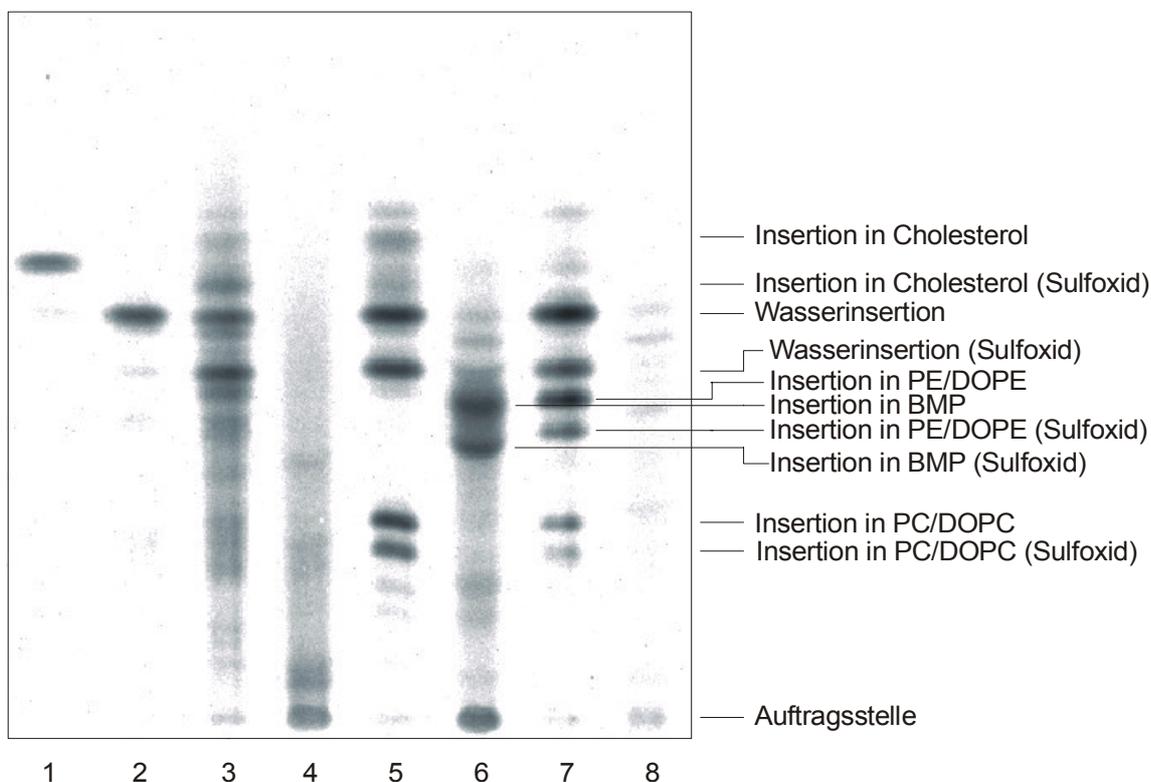


Abb. 3.20: Dünnschichtchromatogramm nach DEAE-Trennung von Kopplungsprodukten der C5-Glc-S-Cer-Sonde mit Lipiden aus Liposomen sowie mit Lipiden aus humanen Fibroblasten (2 Stunden Inkubation von 10 μ M Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) bei 7°C, Medienwechsel und 6 Stunden-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss und anschließende Belichtung). Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete Sonde.

Bahn 2: Referenzen aus Liposomen (von oben: Wasserinsertion, Wasserinsertion-Sulfoxid, sehr schwach: Insertion in DOPE und Insertion in DOPC).

Bahn 3: Zellextrakt (6 h Endozytose) - neutrale Fraktion.

Bahn 4: Zellextrakt (6 h Endozytose) - anionische Fraktion.

Bahn 5: Liposomen mit 39 % DOPC, 39 % BMP, 20 % Cholesterol, 2 % Sonde - neutrale Fraktion.

Bahn 6: Liposomen (siehe Bahn 5) - anionische Fraktion.

Bahn 7: Liposomen mit je 49 % DOPC und DOPE, 2 % Sonde - neutrale Fraktion.

Bahn 8: Liposomen (entsprechend Bahn 7) - anionische Fraktion.

Wie aus dem Dünnschichtchromatogramm in Abbildung 3.20 erkennbar wird, ist die Auftrennung der aus Liposomen erhaltenen Kopplungsprodukte nahezu quantitativ erfolgt. Dabei konnten in den jeweiligen neutralen Fraktionen die Photoinsertionsprodukte in PC und PE (Bahn 7) und in der anionischen Fraktion (Bahn 6) das BMP-Kopplungsprodukt gesammelt werden.

Bei der Auftrennung der Photokopplungsprodukte der C5-Glc-S-Cer-Sonde aus Fibroblasten, die nach sechsständiger Endozytose bei 37°C und anschließender Belichtung der Sonden erhalten wurden, konnte in der anionischen Fraktion keine Insertionsprodukte in BMP nachgewiesen werden (Bahn 4). Es kann also bei der weiteren Auswertung der Dünnschichtplatten aus Endozytose-Experimenten davon ausgegangen werden, dass sich unter den auszuwertenden Banden in eindimensionaler Entwicklung nur Kopplungsprodukte mit PE befinden.

In dem zuvor gezeigten Dünnschichtchromatogramm (Abb. 3.20) wurden jeweils gleiche Radioaktivitätsmengen der Proben aufgetragen, damit auch geringe Lipidmengen zu erkennen sind. In den Eluaten der DEAE-Säulen wurden allerdings gänzlich verschiedene Mengen ermittelt, so dass der optische Eindruck nicht die tatsächlichen Verhältnisse in den einzelnen Fraktionen widerspiegelt. Bei den Liposomen mit 39 Mol-%-BMP-Anteil (Bahnen 5+6) betrug die Menge der radioaktiven Produkte in der anionischen Fraktion nur 5,3 %. Dies deutet auf eine geringe Insertionsrate in dieses saure Lipid hin, wie sie bereits schon beim Phosphatidylserin gefunden wurde (Abb. 3.5, Tabelle 3.2). Der Anteil der radioaktiv-markierten anionischen Lipide am Gesamtextrakt des 6 h-Endozytose-Experimentes betrug ebenfalls nur 12 %, so dass auch hier der optische Eindruck etwas täuscht. Die schwachen Banden in Bahn 8 (saure Fraktion der PC-/PE-Liposomen) sind vermutlich auf eine unvollständige Elution der neutralen Lipide zurückzuführen, da in dieser Fraktion lediglich Spuren an Radioaktivität gemessen wurden.

In den folgenden Abbildungen 3.21. und 3.22 wird der zeitliche Verlauf der Photokopplung der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden in vier Membranlipide dargestellt. Bei den vier Lipiden handelt es sich um die diejenigen, die im überwiegenden Maße am Aufbau der Membranen beteiligt sind (PC, PE, SM und Cholesterol). Andere Lipidbestandteile sind hingegen nur in geringen Mengen dort vorhanden. Die Insertion der Photosonden in Wasser wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt, da diese hauptsächlich durch die „*off-rate*“ der Sonden und durch Kopplung an das in der Membran enthaltene Wasser bestimmt wird. Die Berechnung der angegebenen Prozentzahlen der jeweiligen Insertionen erfolgte durch Normierung auf die jeweilige Gesamtsumme der vier Kopplungsprodukte zu 100 %.

Die Werte repräsentieren die Kopplungen mit den gesamten Zelllipiden ohne „back-exchange“. Der Beginn der Abszisse (t=0 h) entspricht dem Plasmamembran-Experiment. Die Chromatographie wurde auf Dünnschichtplatten mit eindimensionaler Auftrennung durchgeführt. Wie zuvor beschrieben, sind die Photokopplungsprodukte der Sonden mit PA und PS bei eindimensionaler Entwicklung der Dünnschichtplatten nicht hinreichend von den Insertionsprodukten in PC getrennt. Da sie aber nur in geringer Quantität (ca. 1-2 %, siehe Seite 56) auftraten, wurden sie in den Kopplungsprodukten mit PC subsumiert.

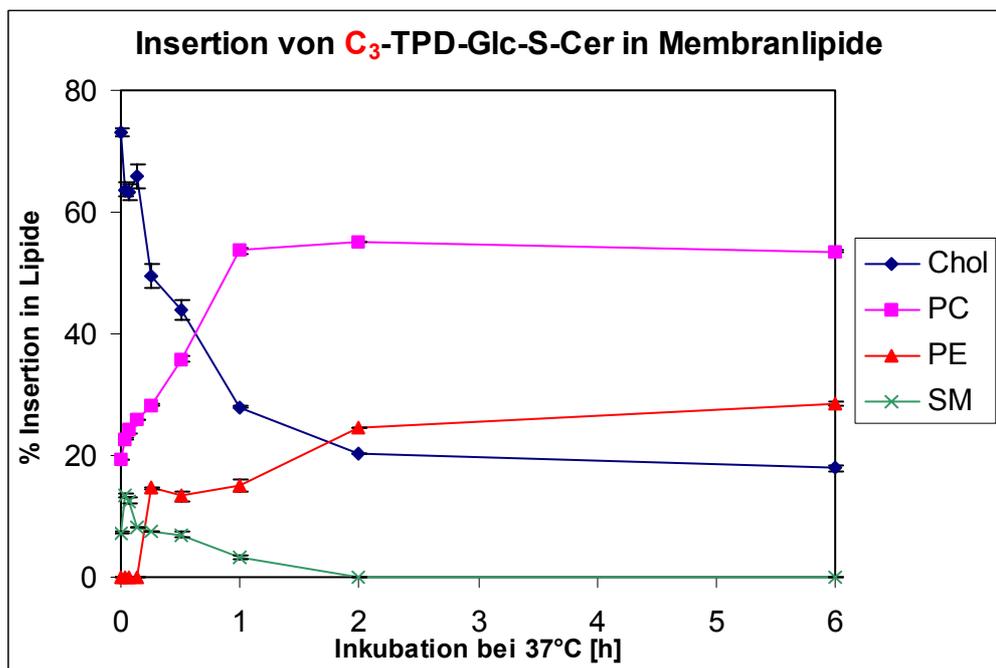


Abb. 3.21: Verteilung der Lipidinsertion der C₃-Glc-S-Cer-Photosonden zu verschiedenen Zeiten der Endozytose in humanen Fibroblasten. Bei allen Versuchen wurden 10 µM Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in humanen Fibroblasten 2 Stunden bei 7°C inkubiert, Medienwechsel und anschließende Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss und Belichtung. Die Berechnung erfolgte durch Normierung der vier Insertionsprodukte auf 100 %. Die Werte für die Insertion in PC können u.U. geringe Anteile (ca. 1-2 %) von Kopplungsprodukten mit PS bzw. PA enthalten.

Die oben gezeigte Graphik zeigt, dass sich bereits nach kurzer Endozytose die Zusammensetzung der Lipidnachbarschaft der C₃-Sonde ändert. So nimmt die Insertion in Cholesterin innerhalb von 15 Minuten schon um ein Drittel ab und erreicht nach zwei Stunden schon den Gleichgewichtszustand bei 20 % der Gesamtkopplungsprodukte. Nach dieser Zeit ist das Insertionsprodukt in Sphingomyelin schon nicht mehr detektierbar, während es in der Plasmamembran und der frühen Phase der Endozytose noch ca. 10 % betragen hat. Hingegen nehmen die Kopplungsprodukte mit den Phosphoglycerolipiden PC und PE stark zu, wobei die PC-Insertion von einem Wert von 20 % in der PM innerhalb von einer Stunde bereits auf eine konstante Insertionsrate von ca. 55 % der

Gesamtprodukte angestiegen ist. Die Insertion in PE steigt innerhalb der untersuchten Endozytosedauer von 6 Stunden auf einen Wert von 30 % an, wobei die Zunahme hauptsächlich im Zeitraum von 15 Minuten bis 2 Stunden geschah und danach nur noch wenig anstieg.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit der C5-Glc-S-Cer-Sonde durchgeführt und ergab ein ähnliches Ergebnis, welches in der Abbildung 3.22 dargestellt ist.

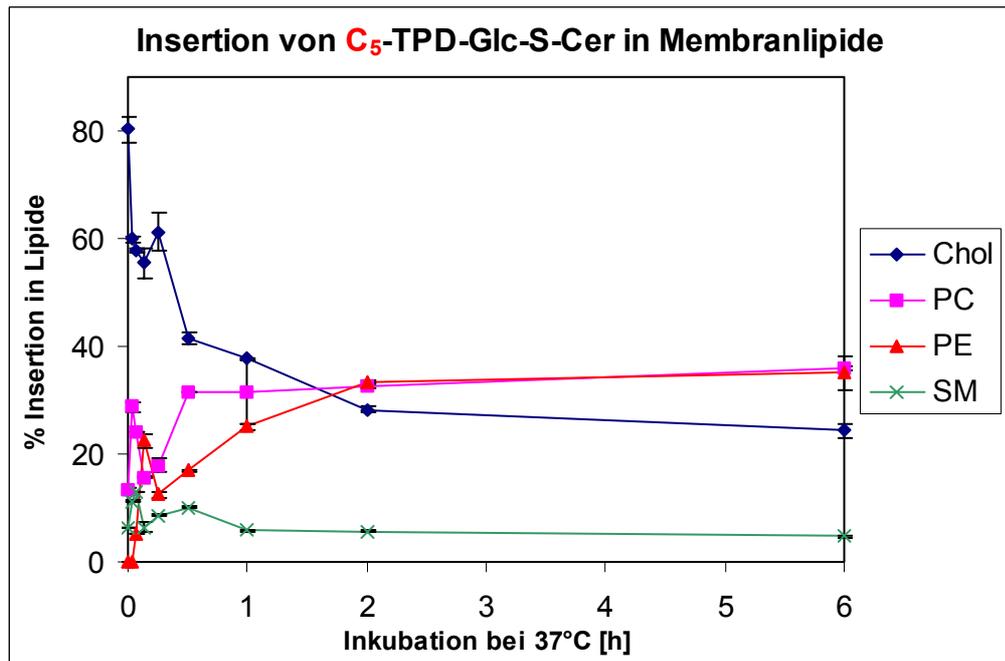


Abb. 3.22: Verteilung der Lipidinsertion der C5-Glc-S-Cer-Photosonden zu verschiedenen Zeiten der Endozytose in humanen Fibroblasten. Durchführung der Experimente und Berechnungsgrundlage siehe Legende zu Abb. 3.21.

Auch hieraus wird ersichtlich, dass das Cholesterol-Insertionsprodukt innerhalb weniger Minuten unter Endozytosebedingungen von dem bereits bei den Plasmamembran-Untersuchungen (3.4.1.3) beschriebenen Wert von 80 % stark abnimmt und nach ca. 2 Stunden schon fast den Gleichgewichtszustand bei 25 % erreicht. Hingegen nimmt im Gegensatz zur C3-Sonde die Kopplung mit Sphingomyelin kaum ab, bzw. schwankt um einen konstanten Wert von 5 % der Gesamtprodukte. Das Produkt mit PC erscheint bereits nach 30 Minuten mit einem konstanten Wert von ca. 35 % und erreicht damit eine ähnliche Insertionsrate wie das PE-Produkte, wobei dieses allerdings erst 4 Minuten nach Beginn der Endozytose der Sonden detektierbar wurde, wohingegen die PC-Insertion beim Plasmamembran-Experiment (Kap. 3.4.1.3) schon 14 % der Kopplungsprodukte mit den vier untersuchten Lipiden ausmachte.

Die Abbildung 3.22 zeigt ebenfalls, dass es bei den Untersuchungen zu Beginn der Endozytose (2, 4 und 8 Minuten-Werte) noch gewisse Schwankungen in den erhaltenen Messergebnissen gab, welche evtl. durch die schnellen Aufwärm- und Abkühlphasen der Zellschalen zurückzuführen sind, die nötig waren, um so kurze Endozytosezeiträume darzustellen. Bei den kurzen Zeiten waren die schnellen Temperatursprünge z.T. schwierig zu erzielen, so dass es hierbei doch zu leichten Ungenauigkeiten in der Einhaltung der genauen Endozytosezeiten gekommen sein kein. Allerdings zeigt die Gesamtauswertung auch, dass diese Schwankungen für den allgemeinen Trend der Steigung bzw. Erniedrigung der Insertionswerte kaum von Belang waren, da auch mit der C5-Sonde der Trend der C3-Verbindung bestätigt werden konnte.

Die Dünnschichtchromatogramme der C7-Glc-S-Cer-Photosonde konnten, wie bereits zuvor beschrieben, nicht sicher ausgewertet werden, da die Banden auf den Platten eventuell durch eine Vielzahl von Positionsisomeren so verbreitert wurden, dass eine hinreichend genaue Auswertung nicht möglich war. Daher wurde hier auf die graphische Darstellung in der wie für C3- und C5-Sonde gezeigten Form, verzichtet. Allerdings lässt sich sagen, dass auch hier qualitativ die gleiche Tendenz in der Zu- und Abnahme der hier untersuchten Kopplungsprodukte wie bei den übrigen Glc-S-Cer-Photosonden vorlag.

3.4.1.5 Untersuchungen zur Photokopplung der Glc-S-Cer-Sonden mit Wasser in Zellmembranen

Wie in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, können Zellen mehr als 200 verschiedene Lipide enthalten. Diese große Varianz und die Interkalation des Cholesterols ermöglichen vermutlich eine dichtere Packung der Moleküle in den nativen Membranen als man es in einfachen Liposomenmischungen mit wenigen Lipidbestandteilen nachempfinden kann. Bei einer größeren Dichte der Zellmembranen wäre auch die Mobilität des Wassers und u.U. die individuelle Beweglichkeit der einzelnen Lipide stärker eingeschränkt als es in Liposomen der Fall ist. Dieses sollte sich dann im Ausmaß der Wasserinsertion in den Zellkulturexperimenten widerspiegeln.

Um dieses zu untersuchen wurde der Gehalt an Wasserinsertionsprodukt nach Belichtung der Sonden in der Plasmamembran kultivierter Fibroblasten aus den Dünnschichtchromatogrammen bestimmt und graphisch aufgetragen. Wie Abb. 3.23 zeigt, sind die Anteile des Wasserinsertionsproduktes der Sonden nach Belichtung in zellulären Membranen deutlich geringer, als es zuvor für die Experimente in reinen DOPC-Liposomen bestimmt wurde. Diese bereits in der Abb. 3.8 dargestellten Werte sind zum Vergleich in der nach-

folgenden Abb. 3.23 nochmals mit aufgeführt. Auch nimmt bei den in Zellmembranen inserierten Glucosyl-thio-ceramid-Sonden der Anteil der Wasserinsertion mit ansteigender Acylkettenlänge ab (C3 27,4 %; C5 22,4 %; C7 17,2 %), wie es schon bei den Experimenten in Liposomen gezeigt wurde.

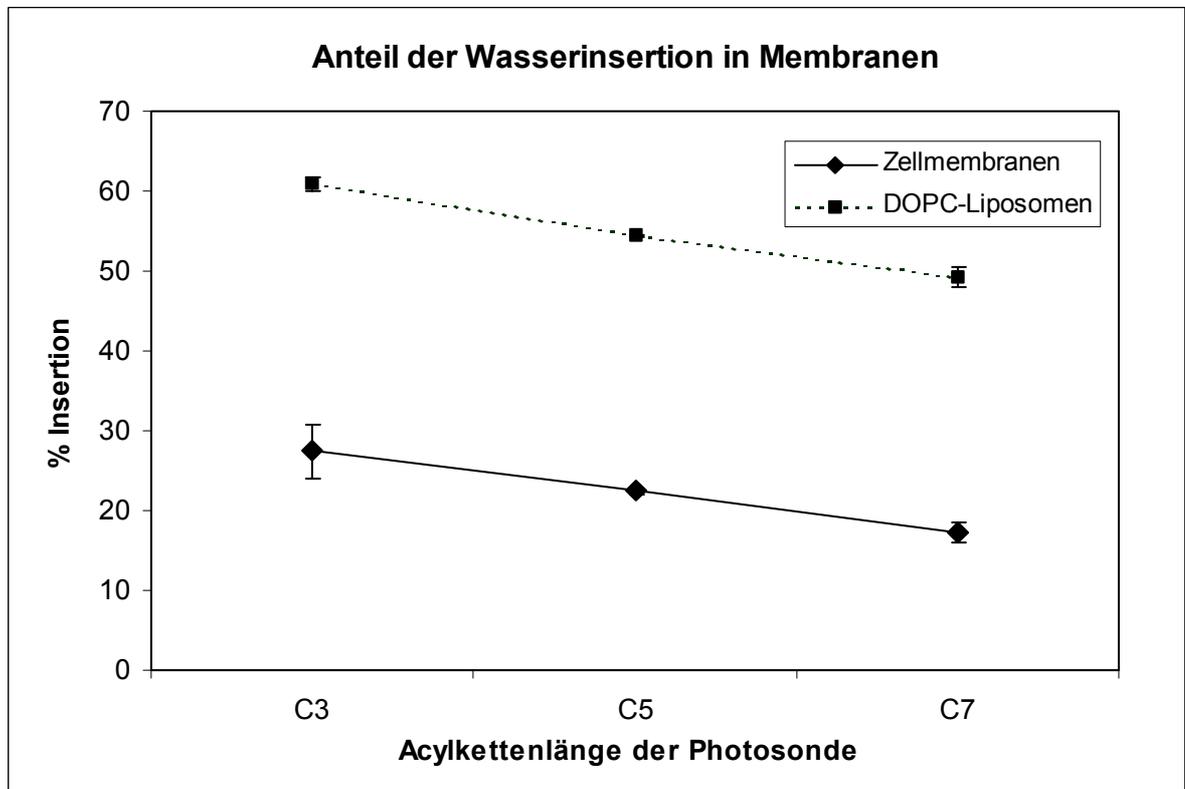


Abb. 3.23: Wasserinsertion der Glucosyl-thio-ceramid-Sonden in Abhängigkeit der Acylkettenlänge. Der untere Graph zeigt die Wasserinsertion bei Inkorporation in die Plasmamembran von Fibroblasten. Die Zellen wurden dafür 2 h bei 7°C mit 10 µM Glc-S-Cer-Sonde inkubiert; anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 20°C. (Mittelwerte aus 5 Messwerten). Zum Vergleich wird der Graph der Wasserinsertion in DOPC-Liposomen (aus Abb. 3.8) mit angegeben.

Ein Erklärungsansatz für den oben gezeigten Befund wäre, dass sich die Sonde in den Fibroblasten stets in einer besonders geordneten Lipidumgebung, wie z.B. der „*liquid-ordered* (l_o)-phase“, wie sie für die „*rafts*“ postuliert wird, befunden haben, so dass dort eine geringe „*off-rate*“ der Moleküle und somit weniger Möglichkeiten zur Insertion in das die Membran umgebende Wasser gegeben war. In reinen DOPC-Liposomen (mit 2 Mol-% Sonde) hingegen würde das Glc-S-Cer eher als Störstelle wirken, so dass hier die Bindung in der Membran weniger fest wäre und eine höhere Wasserinsertion durch ein Herauslösen der Sonde aus der Membran heraus wahrscheinlich würde. Zudem fehlte in den Liposomen das Cholesterol, welches eine dichtere Packung der Membranen erlaubt und somit einen geringeren Wassergehalt in der Membran zur Folge haben kann. Auch ist die Oberflächenkrümmung der Plasmamembran wesentlich geringer als die der Liposomen, welches in den zellulären Membranen zu einer geringeren „*off-rate*“ der Sonden führen kann.

3.4.1.6 Untersuchung der Insertionsprodukte auf inneren Membranen von Niemann-Pick Typ C-Zellen

Bei der Niemann-Pick Typ C'schen (NP-C) Erkrankung führt ein Defekt des *NPC1*-Gen zur massiven Speicherung von Cholesterin in zytosolischen Vakuolen, die lysosomale Marker enthalten (späte Endosomen, Lysosomen und/oder lamellare Körperchen, die aus solchen Organellen entstehen) (*Lange et al., 2000*). Das Gen kodiert für ein integrales Membranprotein, welches evtl. am Transport des Cholesterins aus diesen endozytotischen Kompartimenten heraus und an dessen weiterem Transport zur Plasmamembran beteiligt ist (*Liscum und Munn, 1999*; Übersicht in *Patterson et al., 2001*).

Die Krankheit wurde ursprünglich phänotypisch charakterisiert, wobei sie der A- und B-Variante der Niemann-Pick'schen Erkrankung ähnelt, die auf einen Defekt der sauren Sphingomyelinase zurückgehen; hier kommt es zur Speicherung von Sphingomyelin (Übersicht in *Schuchman und Desnick, 2001*).

Aus den Experimenten in Normal-Fibroblasten ist hervorgegangen, dass die Glc-S-Cer-Sonden in der Plasmamembran in Cholesterin-reichen Domänen lokalisiert waren. Nach Cholesterin-Oxidase-Messungen von *Lange (1991)* beinhaltet die Plasmamembran den Hauptanteil des zellulären, freien Cholesterins, so dass es in den inneren Membranen kaum zu einer solchen Häufung dieses Sterols kommen kann; speziell in Lysosomen wurden nur etwa 6 % der Gesamtmenge in Zellen gemessen (*Lange et al., 1998*). Bei Zellen der Niemann-Pick Typ C-Krankheit wird allerdings, wie bereits erwähnt, Cholesterin in den zytosolischen Vakuolen gespeichert, so dass es dort zu einer Anreicherung auf den intravesikulären Membranen kommt. Es sollte nun untersucht werden, ob die C5-Glc-S-Cer-Sonde im Zuge ihrer Endozytose in NP-C-Zellen ebenfalls auf diesen Membranen lokalisiert ist. Im Vergleich zum Endozytose-Experiment mit 6 h-Inkubation bei 37°C und „back-exchange“ der in der Plasmamembran inkorporierten Sonden (Abb. 3.17) sollte in einem solchen Fall eine deutlich erhöhte Insertionsrate in Cholesterin messbar sein.

Vom Uniklinikum Heidelberg wurden Haut-Fibroblasten von verschiedenen NP-C-Patienten erhalten. Diese Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 Stunden mit der C5-Glc-S-Cer-Sonde inkubiert, nach „back-exchange“ belichtet und anschließend geerntet. In Abb. 3.24 (Bahnen 5-8) sind die erhaltenen Bandenmuster der Kopplungsprodukte mit Lipiden der inneren Membranen dargestellt. Als Kontrollexperiment wurden parallel auch Versuche mit humanen Fibroblasten ohne Befund durchgeführt (Bahnen 3,4).

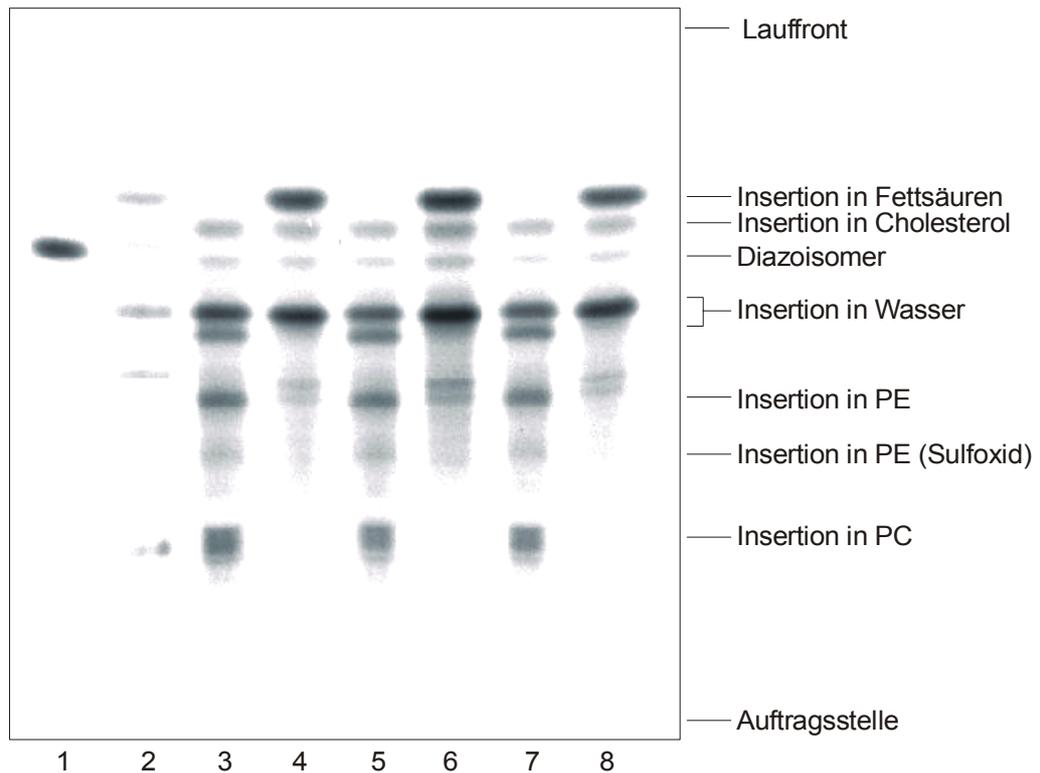


Abb. 3.24: Dünnschichtchromatogramm der Kopplungsprodukte der C5-Glc-S-Cer-Sonde mit Lipiden aus den inneren Membranen von humanen Fibroblasten ohne Befund und solchen mit Niemann-Pick Typ C'scher Erkrankung. 2 Stunden Inkubation von 10 μM Sonde in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in humanen Fibroblasten bei 7°C, Medienwechsel und 6 Stunden-Inkubation bei 37°C unter Lichtausschluss. Anschließend „back-exchange“ (dreimal für je 10 min mit 2 ml 100 μM BSA in HMEM bei 7°C) und Belichtung bei 20°C. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

Bahn 1: Unbelichtete Sonde.

Bahn 2: Referenzen aus Liposomen (von oben: Insertion in Fettsäuren, Wasserinsertion (ein Isomer), Wasserinsertion-Sulfoxid, Insertion in DOPC).

Bahn 3: Zellextrakt aus Fibroblasten (Normalzellen) nach Belichtung.

Bahn 4: Alkalische Hydrolyse des Zellextraktes aus Bahn 3.

Bahn 5,7: Zellextrakt aus Fibroblasten von 2 Patienten mit Niemann-Pick Typ C'scher Erkrankung nach Belichtung.

Bahn 6,8: Alkalische Hydrolysen der Zellextrakte der Bahnen 5 bzw.7.

Die Auswertung der radioaktiv-markierten Kopplungsprodukte hat ergeben, dass hierbei im Vergleich zu den Experimenten mit Normal-Fibroblasten (Bahn 3,4 und andere hier nicht gezeigte Versuche) keine Unterschiede im Markierungsmuster erhalten wurden. Das könnte bedeuten, dass der Anteil der Sonde, der die lysosomalen Kompartimente erreicht hat, dort nicht in die Cholesterol-reichen Speicherkörperchen integriert wurde, sondern in anderen Membranbereichen innerhalb des Lysosoms lokalisiert war.

3.4.2 Untersuchungen von Photokopplungsprodukten der photolabilen Sphingomyeline in Membranen humaner Fibroblasten

3.4.2.1 Einbau der SM-Sonden in Zellmembranen

Wie bereits bei den Glc-S-Cer-Sonden beschrieben (3.4.1.1) wurden für die Einbau- und Stoffwechseluntersuchungen auch die photosensitiven Sphingomyeline als 1:1-Komplex mit BSA den Fibroblasten 2 Stunden bei 7°C angeboten, wobei sie in die äußere Schicht der Plasmamembran inkorporiert wurden. Im Anschluss daran wurde das Medium gewechselt und die Zellen entweder sofort (Plasmamembran-Markierung) oder erst 6 Stunden bei 37°C inkubiert (Endozytose) und anschließend belichtet. Im Falle der Stoffwechseluntersuchungen wurde keine Belichtung der Sonden durchgeführt.

Die Tabelle 3.14 zeigt die bei den Experimenten mit humanen Fibroblasten ermittelten Einbauraten.

Sonde	Einbaurate $\left[\frac{\text{nmol Sonde}}{\text{mg Protein}} \right]$
C3-SM	7,1 ± 1,4
C5-SM	10,6 ± 0,6

Tabelle 3.14: Einbauraten der Sphingomyelin-Sonden in humane Fibroblasten nach 2 h Inkubation bei 7°C (Mittelwerte aus 6 Zellschalen)

Im Vergleich zu den Glc-S-Cer-Derivaten sind die Einbauraten der Sphingomyelin-Sonden deutlich geringer. Außerdem ist ersichtlich, dass die längerkettige C5-SM-Verbindung besser aufgenommen wird als die C3-Sonde, was im Gegensatz zu den bei den Glucosylceramiden erhaltenen Ergebnissen steht. Eine Erklärung für den ungewöhnlichen Befund kann hier nicht gegeben werden, zumal hier nur wenige Messwerte für die Bestimmung der Einbauraten vorlagen. Eine abschließende Bewertung der Messergebnisse kann mit den wenigen zur Verfügung stehenden Daten nicht vorgenommen werden.

3.4.2.2 Stoffwechseluntersuchungen der Sphingomyelin-Sonden

Endogenes Sphingomyelin stellt beim Katabolismus der Zelle zum einen ein Substrat für die lysosomal vorkommende saure Sphingomyelinase als auch für die auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisierte neutrale Sphingomyelinase dar. Diese spalten die Phosphorylcholin-Kopfgruppe ab, und es wird Ceramid erhalten. Im Anschluss an die Spaltung durch die saure Sphingomyelinase im Lysosom kommt es dort zum weiteren Abbau durch die saure Ceramidase und zur Freisetzung von Sphingosin und

Fettsäuren. Wie bereits bei den Glucosyl-Derivaten im vorherigen Abschnitt erwähnt, können kurzkettige Verbindungen das Lysosom verlassen, so dass eine vollständige Degradierung der SM-Photosonde und der resultierenden Cer-Photosonde in der relativ kurzen Zeit der Endozytose nicht zu erwarten war.

Bei den Sphingomyelin-Derivaten wurde die radioaktive Markierung mittels Tritiumierung der 4,5-trans-Doppelbindung eingeführt, so dass hier alle Metaboliten des Sphinganins und des weiteren Abbauproduktes Palmitaldehyd sichtbar geworden wären. Sollte das Ceramid weiter in seine Bausteine zerlegt worden sein, so wären nach deren anschließendem Recycling im „salvage pathway“ der Zelle ähnliche Produkte (SM, Cer, GlcCer) mit anderen Acylketten im Vergleich zu den photoaktivierbaren Sonden entstanden. Diese hätten dann im Dünnschichtchromatogramm zusammen mit den Photosonden in verschiedene Banden aufspalten müssen. Auch wären dann zusätzlich Phosphoglycerolipide und insbesondere das Phosphatidylcholin (PC) aus [³H]-markiertem Palmitoyl-CoA entstanden (Schwarzmann et al., 1986).

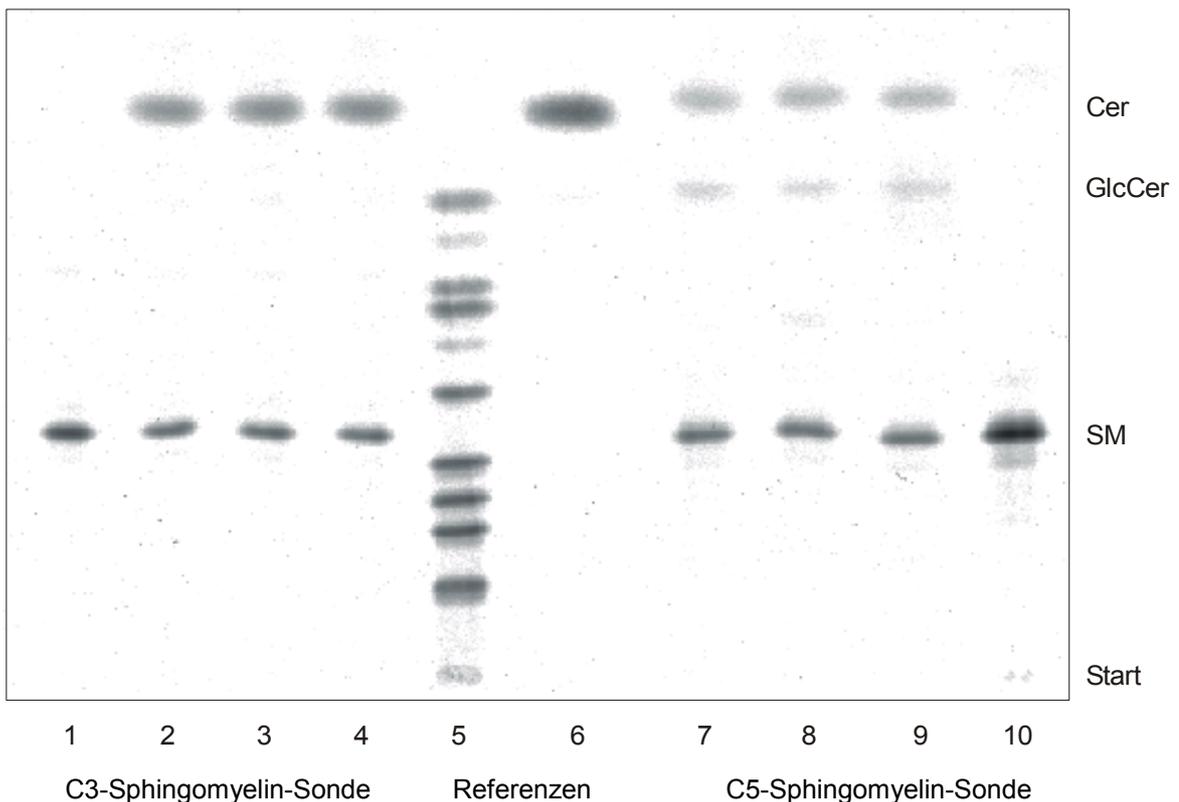


Abb. 3.25: Stoffwechseluntersuchungen in humanen Fibroblasten mit den Sphingomyelin-Sonden. 2 Stunden Inkubation von 10 μM Sonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM in humanen Fibroblasten bei 7°C, Medienwechsel und anschließende 6 Stunden Inkubation bei 37°C ohne Belichtung. Laufmittel: Chloroform/Methanol/15 mM CaCl_2 60:35:8 (v/v/v).
 Bahnen 1,10: Unbelichtete C3- bzw. C5-SM-Sonde (als Referenzen).
 Bahnen 2-4: Stoffwechselprodukte der C3-SM-Sonde.
 Bahn 5: GSL-Referenzlipide entsprechend Abb. 3.13.
 Bahn 6: C₈-Ceramid.
 Bahnen 7-9: Stoffwechselprodukte der C5-SM-Sonde.

Die Abbildung 3.25 zeigt allerdings, dass nur sehr wenige Stoffwechselprodukte entstanden sind, die alle aus dem TPD-Ceramid abgeleitet werden können. Daher kann vermutet werden, dass nach sechsständiger Endozytose der SM-Sonden nur ein Abbau bis zum entsprechenden Ceramid stattgefunden hat.

Für die Stoffwechseluntersuchungen wurden die SM-Sonden zunächst 2 Stunden unter Endozytoseblock bei 7°C in die Plasmamembran von humanen Fibroblasten inkorporiert. Nach erfolgtem Medienwechsel wurden die TPD-Sonden dann 6 Stunden bei 37°C inkubiert und unter Lichtausschluss geerntet.

Als Hauptbande erkennt man nach der Endozytosephase der C5-SM-Sonde die Sphingomyelin-Verbindung, welche zum einen die unveränderte, ursprünglich gefütterte sein kann. Andererseits könnte es sich dabei auch um ein aus dem Metaboliten Ceramid neugebildetes Sphingomyelin handeln. Auch das C5-TPD-Ceramid ist hierbei in nennenswerten Anteilen gebildet worden (Tab. 3.15). Zusätzlich wurde in geringerem Maße eine weitere Bande detektiert, bei der es sich mit großer Sicherheit um ein photolabiles C5-Glucosylceramid handelt, welches aus Photo-Ceramid und UDP-Glucose wohl an der zytosolisch-orientierten Membran des cis-Golgi-Netzwerks gebildet wurde (Coste *et al.*, 1985, 1986). Die Bildung des Anaboliten GlcCer lässt hierbei auch auf eine starke Re-Synthese des Sphingomyelins aus dem entstandenen Ceramid schließen. Durch Untersuchungen in kultivierten Fibroblasten konnte mit radioaktiv-markierten, kurzkettigen Ceramiden gezeigt werden, dass größere Anteile der Substrate in SM umgewandelt wurden und nur geringere Mengen in die GlcCer-Synthese einfließen (Schwarzmann, persönliche Mitteilung). Bei den TPD-Glc-S-Cer-Sonden wurden in den Stoffwechseluntersuchungen die gleichen typischen Lipidmuster der Fibroblasten erhalten (3.4.1.2), die auch nach Inkubation der Zellen mit kurzkettigen Acylderivaten des GlcCer entstehen. Die Sphingomyelin-Sonden tragen ebenfalls den identischen TPD-Ceramid-Anker, so dass hier davon ausgegangen wird, dass sich auch das aus diesem entstandene Photo-Ceramid wie ein Ceramid mit mittellangen Fettsäuren verhält.

Sonde	C3-TPD-SM	C5-TPD-SM
Stoffwechselprodukt		
Sphingomyelin*	52,9 ± 1,3	75,1 ± 2,1
Ceramid	46,1 ± 1,3	18,2 ± 0,7
Glucosylceramid	1,0 ± 0,2	6,7 ± 1,6

Tabelle 3.15: Prozentuale Anteile der Stoffwechselprodukte der Sphingomyelin-Sonden nach 6 Stunden Inkubationsdauer. 2 Stunden Inkubation von 10 µM Sonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM in humanen Fibroblasten bei 7°C, Medienwechsel und anschließende 6 Stunden Inkubation bei 37°C ohne Belichtung. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

*: Hierbei kann es sich zum einen um das unveränderte, ursprünglich gefütterte SM, andererseits aber auch um ein durch Re-Synthese aus dem Metaboliten Ceramid gebildetes SM handeln

Auch bei der C3-SM-Verbindung wird als Hauptprodukt das Sphingomyelin detektiert, wobei auch hier nicht bekannt ist, in welchem Maße sich unter der Bande ein re-synthetisiertes SM verbirgt. Das Abbauprodukt C3-TPD-Ceramid wird hierbei allerdings in stärkerem Maße gebildet als bei der C5-Verbindung. Ein Glucosylceramid-Analogon der C3-Sonde ist auf der Dünnschichtplatte hingegen nur in einer sehr geringen Menge messbar.

Es wird beschrieben, dass die SM-Synthase auf der luminalen und die GlcCer-Synthase auf der zytosolischen Seite der Golgi-Membran lokalisiert sind (*Futerman et al., 1990*). Von kurzkettigen Ceramiden, soweit untersucht, ist bekannt, dass sie einen spontanen *flip-flop* durch Modell- und biologische Membranen vollziehen können und somit für beide genannten Synthesen zur Verfügung stehen können. Ob für ihren Transport und ihre topologische Anordnung zusätzlich ABC-Transporter involviert werden (*van Helvoort et al., 1996*) und für die Unterschiede von C3- und C5-SM-Sonden verantwortlich sein könnten, kann hiermit nicht abschließend geklärt werden.

Bei diesen Befunden stellt sich die Frage, inwiefern die Kettenlänge der SM-Sonden für den Metabolismus dieser Moleküle eine Rolle spielt, da die Sonden ansonsten homolog zueinander sind. Von den nach Abbau der Phosphorylcholin-Kopfgruppe entstehenden Ceramiden hat der längerkettige Metabolit C5-TPD-Ceramid aufgrund der stärkeren Verankerung in den Membranen eine geringere „*off-rate*“ als die entsprechende C3-Verbindung. Dadurch könnte es länger auf Vesikeln verbleiben und so gezielter zu den anabolen Enzymen SM-Synthase (PC:Ceramid-Phosphocholin-Transferase) bzw. GlcCer-Synthase transportiert werden.

Dahingegen hat das C3-Ceramid-Derivat eine höhere „*off-rate*“ und evtl. auch eine größere Tendenz zur transversalen Diffusion (*flip-flop*) als dessen längerkettiges Pendant, so dass es sich dadurch mehr in Membranen innerhalb der Zelle aufhalten könnte, an der keine Synthese zum GlcCer und zum Sphingomyelin stattfindet und es sich somit dem weiteren Stoffwechsel entziehen würden. Auch kann es sein, dass das C3-TPD-Ceramid als Substrat für die entsprechenden Synthesen ungeeigneter ist als die entsprechende C5-Verbindung und es somit weniger häufig von den Enzymen zu den jeweiligen Produkten umgesetzt wird.

3.4.2.3 Plasmamembran-Markierung

Sphingomyelin stellt in den Plasmamembranen von Fibroblasten einen der Hauptbestandteile der Lipiddoppelschicht dar. Dabei kommt es wie schon zuvor beschrieben (3.4.1.3) im überwiegenden Maße in der dem Extrazellularraum zugewandten Seite vor. Auch ist es eines der wichtigen Lipide, die sowohl in den „rafts“ als auch in den Membraninvaginationen, den *Caveolae*, vorkommen. Behandelt man Zellen exogen mit bakterieller Sphingomyelinase, so konnte beobachtet werden, dass es zum schnellen Austritt des Cholesterols aus der Plasmamembran und der anschließenden Veresterung im Zytosol durch die Acyl-CoA:Cholesterol-Acyl-Transferase (ACAT) kommt. Außerdem wird zusätzlich die *de novo*-Synthese durch eine verminderte β -Hydroxy- β -methyl-glutaryl (HMG)-CoA-Reduktase-Aktivität herunterreguliert (Slotte und Bierman, 1988, Gupta und Rudney, 1991). Daraus lässt sich folgern, dass in der PM eine enge Vergesellschaftung von Sphingomyelin und Cholesterol vorliegt. Da nach exogener Gabe der Sphingomyelinase eine Internalisierung des Cholesterols der PM in die Zelle hinein einsetzt, existieren diese starken Wechselwirkungen aber offensichtlich nicht zwischen Cholesterol und Ceramid.

Um in kultivierten Fibroblasten auch die Lipidnachbarschaft des Sphingomyelins mit der Technik der Photomarkierung zu untersuchen, wurden die Zellen mit jeweils 10 μ M der Sphingomyelin-Photosonden in HMEM (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) 2 Stunden bei 7°C unter Endozytoseblock inkubiert. Dabei wurden die Moleküle der Photosonden in die äußere Schicht der Plasmamembran inkorporiert. Nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen belichtet und anschließend geerntet. In der nachfolgenden Abbildung 3.26 ist das Dünnschichtchromatogramm des Lipidextraktes dargestellt. Es zeigt die radioaktiv-markierten Kopplungsprodukte der C5-SM-Sonde.

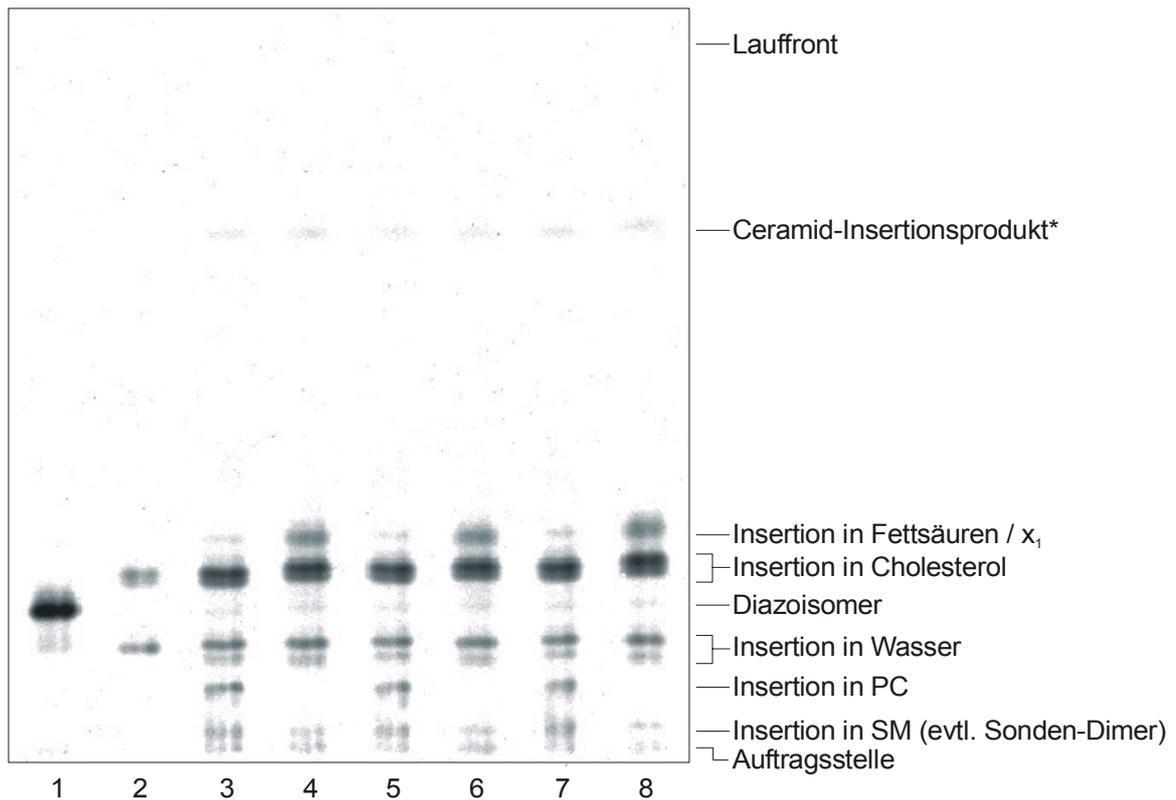


Abb. 3.26: Plasmamembran-Markierung von humanen Fibroblasten mit C5-Sphingomyelin-Photosonde. 2 Stunden Inkubation mit 10 μM Sonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM bei 7°C unter Lichtausschluss. Anschließend Medienwechsel und Belichtung bei 20°C. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

x_1 : Nicht identifizierte Bande, die mit Fettsäure-Insertionsbande ko-migriert.

*: Es wird angenommen, dass es sich bei dieser Bande um ein Kopplungsprodukt des TPD-Ceramids handelt, welches nach Abbau der Phosphorylcholin-Kopfgruppe durch die neutrale bzw. saure Sphingomyelinasen an/in der Plasmamembran entstanden ist.

Bahn 1: Unbelichtete C5-Sphingomyelin-Photosonde.

Bahn 2: Referenzlipide (Insertion in Cholesterol, Wasserinsertionsprodukt, jeweils ein Isomer).

Bahnen 3,5,7: Zellextrakte I,II,III nach Belichtung.

Bahnen 4,6,8: Alkalische Hydrolyse der Zellextrakte I,II,III.

Hierbei ist auffällig, dass nach Belichtung der C5-SM-Sonde im überwiegenden Maße das Cholesterol-Insertionsprodukt entstanden ist (Tabelle 3.16). Anders als bei den Plasmamembran-Untersuchungen mit den Glucosyl-thio-ceramid-Photosonden ist die Insertionsrate hier noch höher, da bei den hier gezeigten Versuchen weniger Kopplungsprodukte mit Wasser entstanden sind. Dass das Muster der Kopplungsprodukte und insbesondere die Häufigkeit der Wasserinsertion sehr stark von der Zusammensetzung der Wirtslipide abhängt, wurde bereits bei den Untersuchungen in Modellmembranen beschrieben (Kap. 3.2.2.1).

Auch die in Zellmembranen erhaltenen Kopplungsmuster der Sonden zeigen erneut, dass die Sphingomyeline offenbar eine bestimmte Lipidumgebung bevorzugen. So ist in Zellen die Affinität der Sonden zum Cholesterol offenbar höher, welches zu einer dichteren Packung der beiden Molekülspezies in Zellmembranen führt. Dieses spiegelt sich in der niedrigeren Wasserinsertionsrate im Vergleich zu den Liposomenexperimenten ursächlich

zum einen durch die geringere „*off-rate*“ der Sonden und andererseits eventuell auch durch einen niedrigeren Gehalt an Wasser in der Zellmembran wider. Auch die anderen in der Plasmamembran enthaltenen Lipidspezies werden nur in untergeordnetem Maße markiert, so dass die Vermutung nahe liegt, dass sich entweder auch die SM-Sonden in den „*rafts*“ der PM befinden oder die schon zuvor beschriebene besondere Affinität zum Cholesterol generell dazu führt, dass diese in der Membran eng vergesellschaftet sind. Trotzdem wurde in Liposomen, die auch Cholesterol enthielten, nicht ein derartiges Verhältnis der Kopplungsprodukte erhalten, so dass vermutlich noch andere Membranbestandteile bei der Assoziation der Mikrodomänen eine Rolle spielen und zur Ausbildung der „*liquid-ordered (l_o)-phase*“ in den „*rafts*“ führen.

Sonde	C3-TPD-SM	C5-TPD-SM
Kopplung in		
Cholesterol	45,3 ± 1,5	63,5 ± 1,2
Phosphatidylcholin (PC)	3,3 ± 0,9	6,8 ± 0,5
Sphingomyelin (SM) / Sonden-Dimer	4,8 ± 1,1	4,5 ± 0,7
Wasser	22,9 ± 0,7	14,2 ± 0,8
Verhältnis der markierten Lipide (Chol:PC:SM)	9,4 : 0,7 : 1	14,1 : 1,5 : 1
Ceramid-Kopplungsprodukte*	9,5 ± 2,8	1,5 ± 0,1

Tabelle 3.16: Prozentuale Anteile der Insertionsprodukte der Sphingomyelin-Sonden bei Markierung der Plasmamembran von humanen Fibroblasten (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

*: Es wird angenommen, dass es sich bei der Bande mit dem höchsten R_F-Wert um ein Kopplungsprodukt des TPD-Ceramids handelt, welches nach Abbau der Phosphorylcholin-Kopfgruppe durch die neutrale bzw. saure Sphingomyelinase an/in der Plasmamembran entstanden ist.

Im zuvor gezeigten Dünnschichtchromatogramm (Abb. 3.26) ist erkennbar, dass die Insertionsprodukte mit Cholesterol in mindestens 2 Banden auftrennen. Dieses ist weniger deutlich bei der hier gezeigten C5-SM-Sonde, als bei der C3-Verbindung, wo zwei vollständig getrennte Banden vorliegen (DC hier nicht gezeigt). Auch ist in der Abbildung gut die Aufspaltung der Wasserinsertionsbande zu erkennen, die auf ein Enantiomerenpaar zurückzuführen ist, dessen Bildung bei beiden Sphingomyelin-Photosonden beobachtet und massenspektrometrisch nachgewiesen wurde.

Bei der Insertion der SM-Photosonden in die Lipide der PM wurde ebenfalls eine geringe Menge an Phosphoglycerolipiden markiert, welche bei den vorliegenden Dünnschicht-

chromatogrammen gut erkennbar ist, da diese Banden durch die Anwendung der alkalischen Hydrolyse in die entsprechenden Fettsäure-Insertionsbanden überführt werden konnten. Die Bahnen 4,6 und 8 in der Abbildung 3.26 zeigen neben diesen Banden nur noch Produkte, die aus Kopplungen mit Cholesterol, Wasser oder Sphingomyelin (bzw. Sonden-Dimere) entstanden sind. Die Zuordnung der PC-Insertionsbande erfolgte durch Vergleich des R_f -Wertes mit dem des DOPC-Kopplungsproduktes, welches bei den Liposomenexperimenten erhalten wurde (Abb. 3.10). Eine massenspektrometrische Charakterisierung dieser Bande ist aufgrund der geringen Probenmengen bislang nicht erfolgreich gewesen.

Weiterhin wurde ein Insertionsprodukt erhalten, das einen im Vergleich zu den Sphingomyelin-Kopplungsprodukten außerordentlich hohen R_f -Wert aufweist und das vermutlich einem Kopplungsprodukt eines TPD-Ceramids zuzuordnen ist. Da diese Versuche unter Temperaturblock der Endozytose durchgeführt wurden, kann es sich nicht um ein Abbauprodukt durch die saure Sphingomyelinase in den Lysosomen handeln, sondern vielmehr um eines, welches durch die neutrale oder aber auch durch die saure Sphingomyelinase in der Plasmamembran entstanden ist. Aus dem Vergleich der Anordnung der entsprechenden Banden in der nachfolgenden Abbildung 3.27 und der Stabilität der Bande gegen die alkalische Verseifung kann geschlossen werden, dass es sich hierbei eventuell um das Wasser- oder das Cholesterolinsertionsprodukt des Ceramids handeln könnte. Allerdings haben *Slotte und Bierman (1988)* gezeigt (Kap. 3.4.2.3), dass das nach Abbau durch die Sphingomyelinase entstandene Ceramid keine Affinität zum Cholesterol hat, so dass es sich hierbei vermutlich um das Kopplungsprodukt der C5-SM-Sonde mit Wasser handelt.

Die kürzerkettige C3-SM-Photosonde scheint für die neutrale Sphingomyelinase ein geeigneteres Substrat darzustellen, da hierbei der Umsatz zum C3-TPD-Ceramid wesentlich höher ist, als bei der C5-Verbindung (Tab. 3.16). Dass hierfür die größere „*off-rate/hopping-rate*“ der Sonde eine Rolle spielt, kann vermutet werden, da auch mit den SM-Sonden erneut bestätigt werden konnte, dass die Wasserinsertionsrate bei kürzerer Acylkettenlänge höher ist (Tab. 3.16 und 3.17). Hierdurch ist die C3-Sonde in der Membran schwächer verankert und ist für das Enzym durch die höhere „*off-rate*“ zugänglicher. Andererseits könnte die C3-Sonde bedingt durch die kürzere Acylkette auch eine geringere Affinität zum Cholesterol haben und deshalb weniger gut in die dichter „gepackten“ Mikrodomänen integriert sein. Somit würde diese nach Belichtung vermehrt in das in der Membran enthaltene Wasser inserieren und könnte andererseits auch besser von der neutralen Sphingomyelinase abgebaut werden.

3.4.2.4 Endozytose-Untersuchungen

Um die Lipidnachbarschaft der Sphingomyelin-Sonden auch im Zuge der Endozytose zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Sonden nach Inkorporation in die Plasmamembran einer sechsständigen Endozytose bei 37°C unterzogen wurden. Nach Ablauf der Inkubationsdauer und der anschließenden Belichtung der Sonden waren allerdings nur wenige Änderungen in der Zusammensetzung der Kopplungsmuster zu erkennen (Abb. 3.27). Dies steht im Gegensatz zu den Experimenten mit den Glc-S-Cer-Sonden, wo nach deren Internalisierung ein gänzlich anderes Verhältnis der Photokopplungsprodukte gefunden wurde.

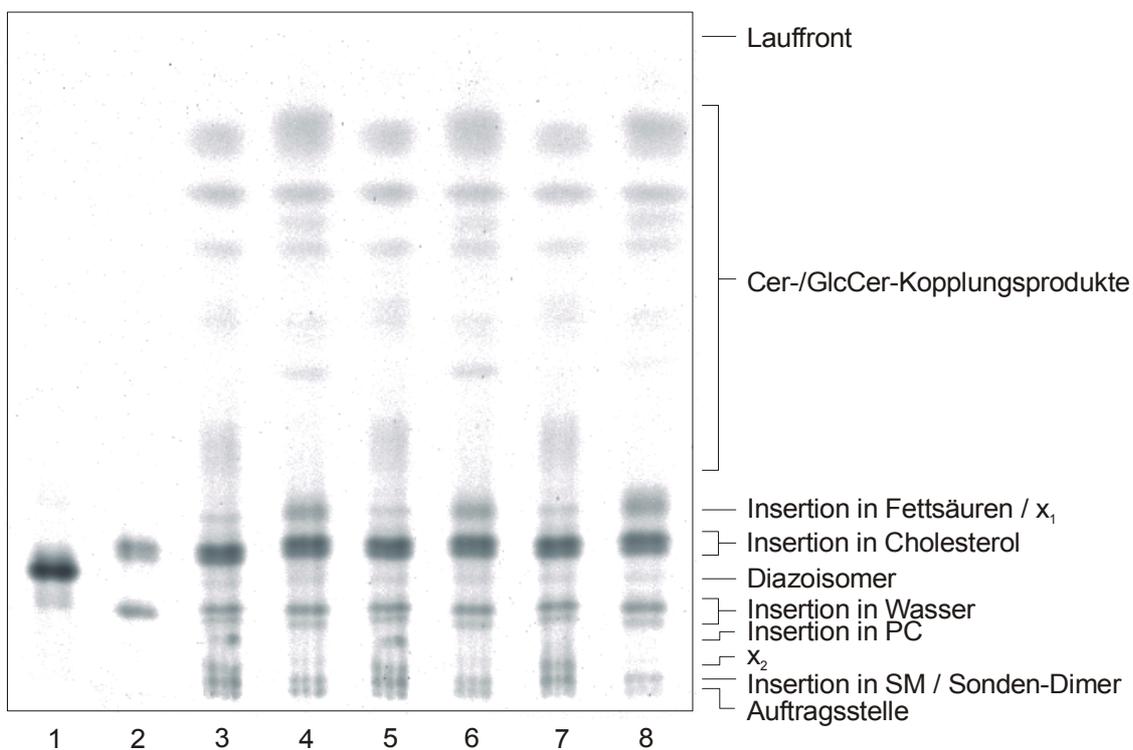


Abb. 3.27: Markierung der Membranen von humanen Fibroblasten mit C5-Sphingomyelin-Photosonde nach 6 h Endozytose. 2 h Inkubation mit 10 μ M Sonde (als 1:1-Lipid/BSA-Komplex) in HMEM bei 7°C unter Lichtausschluss. Medienwechsel, anschließend 6 h Inkubation bei 37°C und Belichtung bei 20°C. Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v).

x_1 : Nicht identifizierte Bande, die mit Fettsäure-Insertionsbande ko-migriert.

x_2 : Nicht identifizierte Bande.

Bahn 1: Unbelichtete C5-Sphingomyelin-Photosonde als Referenz.

Bahn 2: Referenzlipide (Insertion in Cholesterol, Wasserinsertionsprodukt, jeweils ein Isomer).

Bahnen 3,5,7: Zellextrakte I,II,III nach Belichtung.

Bahnen 4,6,8: Alkalische Hydrolyse der Zellextrakte I,II,III.

Es zeigte sich auch bei diesen Versuchen unter Endozytosebedingungen, dass als Hauptprodukt die Insertion in Cholesterol erhalten wurde. Ebenfalls wurde erneut nur ein relativ geringer Gehalt an Wasserinsertion gemessen, so dass sich zunächst die Frage stellte, ob die Sonden überhaupt in die Zellen internalisiert wurden oder ob sie hauptsächlich in der PM verblieben sind. Dass diese jedoch internalisiert wurden, lässt sich am Auftreten der entsprechenden photolabilen Stoffwechselprodukte Ceramid und Glucosylceramid erkennen, deren Kopplungsmuster ebenso im Dünnschichtchromatogramm zu erkennen sind.

Nach Auswertung der DC-Banden wurde festgestellt, dass scheinbar die Kopplungsprodukte der C5-SM-Sonde mit Cholesterol und Wasser im Vergleich zur Markierung der Plasmamembran geringfügig abgenommen haben (Tab. 3.17). Allerdings sind die Insertionswerte als Anteile an der Gesamtradioaktivität der Bahn ermittelt worden, so dass bei der Auswertung der Kopplungsprodukte auch die der Stoffwechselprodukte (GlcCer und Ceramid) zu berücksichtigen sind. Auch hier sind Bandenmuster erkennbar, die z.T. als entsprechende Kopplungsprodukte mit Cholesterol, Wasser und Phosphoglycerolipiden bzw. deren Fettsäuren (nach alkalischer Hydrolyse) zu deuten sind. Es kann also angenommen werden, dass die Verhältnisse der Kopplungsprodukte einer Sonde untereinander in etwa gleich geblieben ist.

Bei den 6 h-Endozytose-Experimenten mit den SM-Sonden sind wie bei den zuvor beschriebenen Plasmamembran-Markierungen ebenfalls nur wenig Insertionsprodukte in Phospholipide entstanden. Obwohl eine vollständige Zuordnung und Auswertung dieser Kopplungsprodukte aufgrund ihrer z.T. nicht ausreichenden dünnschichtchromatographischen Auftrennung nicht möglich war, kann trotzdem festgestellt werden, dass der Gesamtanteil der Insertionsprodukte in die Phosphoglycerolipide und in Sphingomyelin (bzw. Sonden-Dimere) weniger als 10 % der Kopplungsprodukte beträgt.

Bei dem Kopplungsmuster der C5-SM-Sonde konnte bislang nur das Insertionsprodukt in PC zugeordnet werden, welches wie schon bei dem Plasmamembran-Experiment zuvor anhand dessen R_f -Wert identifiziert wurde. Eine weitere Bande mit geringfügig niedrigerem Laufverhalten (x_2 in Abb. 3.27), die ebenfalls nach alkalischer Hydrolyse verschwindet, konnte bislang noch nicht massenspektrometrisch charakterisiert werden, da die aus den DC-Platten verfügbaren Substanzmengen für eine Messung nicht ausreichten.

Sonde	C3-TPD-SM	C5-TPD-SM
Kopplung in		
Cholesterol	32,9 ± 3,6	55,8 ± 0,2
Phosphatidylcholin (PC)	y ₁	3,0 ± 0,1
Sphingomyelin (SM) / Sonden-Dimer		2,5 ± 0,3
Wasser	16,4 ± 1,2	9,6 ± 0,3
Verhältnis der markierten Lipide (Chol:PC:SM)		22,3 : 1,2 : 1
Ceramid-/GlcCer-Kopplungsprodukte	35,8 ± 3,2	16,9 ± 0,9

Tabelle 3.17: Prozentuale Anteile der Insertionsprodukte der Sphingomyelin-Sonden bei Markierung der Zellmembranen nach 6 h Endozytose (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).
y₁: Aufgrund einer nicht hinreichenden Trennung dieser Kopplungsprodukte auf der DC-Platte, können für diese Insertionsprodukte keine Einzelwerte angegeben werden. Zusammengerechnet betragen diese aber nicht mehr als 10 % der radioaktiv-markierten Substanzen.

Unterschiede zeigen sich allerdings im Vergleich der beiden SM-Sonden miteinander. So ist bei der C3-Verbindung der Anteil der Wasserinsertion deutlich höher als bei der C5-Photosonde, welches auf die höhere „off-rate“ der kürzerkettigen Sonde zurückzuführen ist.

Dennoch ist der direkte Vergleich der Insertionsprodukte der Sonden schwierig, da bei der C3-Sonde erheblich mehr photoaktivierbares Ceramid (Abb. 3.25, Tab. 3.15) entstanden ist, welches ebenfalls Kopplungsprodukte lieferte. Die genaue Zuordnung dieser zusätzlichen Kopplungsmuster konnte aufgrund mangelnder Referenzsubstanzen und der teilweise durch Überlagerung von mehreren Stoffwechselprodukten erhaltenen Komplexität nicht durchgeführt werden.

3.4.2.5 Ultrazentrifugationsexperimente

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, dass mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation Mikrodomänen bzw. *rafts*“ und auch Caveolae aus lysierten Zellen isoliert werden konnten (*Brown und Rose, 1992*). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente mit der photolabilen C5-Sphingomyelin-Sonde durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese mit der als „leichte, schwimmende Fraktion geringer Dichte“ (engl. *light buoyant density*) bezeichneten Fraktion migriert. Als Zellen wurden hierzu humane Fibroblasten und humane Melanoma-Zellen A431 gewählt. Bei den zuletzt genannten wurde die Isolierung der „*rafts*“ bzw. der Caveolae mittels der Ultrazentrifugations-Methode schon beschrieben (*Pike und Casey, 1996; Waugh et al., 1998*).

Dazu wurde, wie zuvor darstellt (3.4.2.3), die C5-Sphingomyelin-Sonde für 2 Stunden unter Endozytoseblock bei 7°C in die Plasmamembran der Zellen (humane Fibroblasten bzw. humane Melanoma-Zellen A431) inkorporiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln mit einem Lysis-Puffer (pH 7,5 mit 1 % Triton X-100) auf Eis geerntet. Bei der Zellyse werden die Mikrodomänen („*rafts*“) vermutlich in Form von Vesikeln freigesetzt und könnten somit im Dichtegradienten flotieren.

Für die anschließende Ultrazentrifugation wurde das Zelllysate in der Kälte auf einen Saccharose-Gehalt von 40 % eingestellt und auf den Boden eines Zentrifugenröhrchens pipettiert. Danach wurde diese Suspension vorsichtig mit 30 %-iger- und schließlich mit 5 %-iger Saccharose-Lösung überschichtet und über Nacht bei 4°C im Schwenkrotor bei 135000-g zentrifugiert. Dann wurde das Zentrifugenröhrchen vorsichtig im Boden angestochen und der Inhalt in Eppendorf-Gefäßen in Fraktionen von ca. 300 µl Volumen gesammelt. Mit einem Refraktometer wurde die optische Dichte der Fraktionen bestimmt, um den Verlauf des Saccharose-Gradienten zu ermitteln. Die Lipide aus den einzelnen Fraktionen wurden durch Umkehrphasenchromatographie entsalzt und von der Saccharose befreit. Anschließend wurde die in den isolierten Lipiden enthaltene Radioaktivität mit einem Szintillationszähler quantifiziert und der Lipidextrakt über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Bei der Auswertung der Dünnschichtchromatogramme und des bei der Fraktionierung erstellten Radioaktivitätsprofils zeigte sich, dass der größte Teil (>95 %) der in der Plasmamembran inkorporierten Sonde sich im Pellet des Zentrifugenröhrchens befand. Lediglich in der Grenzregion zwischen dem 5 %-igen und 30 %-igen Saccharose-Bereich konnte in wenigen Fällen eine sehr geringe Zunahme der Radioaktivitätsmenge im Vergleich zu den flankierenden Fraktionen ermittelt werden. Allerdings zeigte sich bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung kein Lipidmuster, das der in der Literatur

beschriebenen Zusammensetzung der Mikrodomänen entsprechen würde. Da vermutlich nur ein kleiner Teil der Zellmembranen in den schwimmenden Fraktionen enthalten wäre, könnte eine zu geringe Menge an Zellmaterial ursächlich für diesen Befund sein. Dabei könnte u.U. die Lipidmenge für ein Anfärben auf den Dünnschichtplatten nicht ausgereicht haben, so dass die Versuche mit erheblich größeren Zellzahlen zu wiederholen wären.

Weiterhin wurden mit den Fibroblasten und auch mit den A431-Zellen Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob während der Zellyse Vesikel gebildet werden. Dazu wurde [^3H]-Saccharose im Lysis-Puffer gelöst und die Zellen nach der zuvor beschriebenen Methode lysiert. Danach wurde die Suspension über Nacht im Dichtegradienten zentrifugiert. Bei der anschließenden Fraktionierung wurde allerdings in einzelnen Fraktionen kein signifikant erhöhter [^3H]-Radioaktivitätswert erhalten, was darauf zurückgeführt werden kann, dass während der Zellyse keine oder nur wenige [^3H]-Saccharose-gefüllte Vesikel gebildet wurden.

Letztendlich konnte mit den hier durchgeführten Ultrazentrifugationsexperimenten die Beteiligung der Photosonden an der Bildung der „rafts“ nicht gezeigt werden. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass auch dieser Nachweis gelingen könnte, wenn die Experimente mit größeren Zellzahlen bzw. Lipidmengen wiederholt werden würde.

4 **Diskussion**

Die Untersuchung der genauen Verteilung und Anordnung von Molekülen in biologischen Systemen ist seit Jahren Gegenstand der Forschung. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, werden heutzutage dazu eine Vielzahl von verschiedenen biochemischen und physikalischen Methoden angewendet und neu entwickelt.

Die subzelluläre Lokalisation von Lipiden und Proteinen wurde durch die Einführung von Fluoreszenzsonden und anschließende Untersuchungen in Lichtmikroskopen möglich (z.B. Lipsky und Pagano, 1983). Allerdings können, durch das Auflösungsvermögen der Mikroskope begrenzt, damit aber nicht einzelne Moleküle oder kleinere Cluster erkannt werden, so dass hierzu andere Methoden angewendet werden müssen. Es konnte mit speziellen Fluoreszenzsonden auch schon die Bewegung einzelner Moleküle messbar gemacht werden (Schutz et al., 2000). Bei diesem „single particle/fluorophore tracking“ wird der Aufenthaltsort der Sonden mittels Laser bestimmt, so dass hieraus die Bewegung einzelner Moleküle auch auf einer Zelloberfläche gemessen werden konnte. Mit diesem Verfahren kann aber nicht die direkte Lipidumgebung der Sonden bestimmt werden, da nur ein einzelnes Molekül betrachtet wird. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Antikörper zum Nachweis des Forssman-Lipids (van Genderen et al., 1991) oder Cholera-Toxin zur Lokalisierung von GM1 verwendet (Hansson et al., 1977; Parton, 1994). Mit einem Biotin-markierten Derivat des GM1 konnte in unserer Abteilung elektronenmikroskopisch die intrazelluläre Verteilung dieses Gangliosids gezeigt werden (Möbius, 1998; Möbius et al., 1999). Allerdings kann mit diesen Methoden nicht eine Untersuchung *in vivo* erfolgen, da die Zellen vor dem Einbringen in das Elektronenmikroskop chemisch fixiert werden müssen. Auch kann mit dieser Technik nur sehr begrenzt die Umgebung der Moleküle untersucht werden, da für jede zu untersuchende Komponente spezifische Antikörper eingesetzt werden müssen. Eine Information über alle in der Nachbarschaft der Sonden enthaltenen Bestandteile kann aber hiermit nicht erhalten werden.

In dieser Arbeit wurde eine weitere Vorgehensweise gewählt, um die direkte Nachbarschaft von Lipiden zu untersuchen. Es wurden hierzu photoaktivierbare Lipide verwendet, die es erlauben, sowohl in Modellsystemen als auch in lebenden Zellen die diesen Sonden direkt benachbarten Moleküle zu ermitteln. Da Belichtung und anschließende Reaktionszeit des *in situ* entstehenden Carbens sehr kurz sind, kann man davon ausgehen, dass durch die Photoinsertion eine Momentaufnahme der jeweiligen Lipidumgebung der Sonden in den Modell- bzw. Zellmembranen angezeigt wird.

4.1 Synthese der Trifluormethylphenyldiaziriny (TPD)-Sonden

Aus der Diplomarbeit (*Hörnschemeyer, 1997*) standen für die Untersuchungen in Membranen bereits zwei photoaktivierbare Fettsäuren mit C3- und C5-Acyllketten und die daraus aufgebauten TPD-Glucosyl-thio-ceramide zu Verfügung. Um hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften den endogenen Membranlipiden möglichst ähnlich zu sein, war es wünschenswert, weitere Photosonden zur Verfügung zu haben, die eine noch längere Acylkette tragen, aber in den geplanten Versuchen dennoch in die Zellen inkorporiert werden konnten. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine längere photoaktivierbare Fettsäure mit einer C7-Acyllkette analog der C3- und C5-Verbindungen synthetisiert. Die Synthese des photolabilen TPD-Fettsäure-Succinimidylesters (Abb. 3.1) gelang dabei mit einer Gesamtausbeute von 14 % nach 10 Stufen.

Die für die Photomarkierungsstudien verwendeten markierten Glucosyl-thio-ceramide wurden in einer konvergenten Synthese aus Lyso-Glc-S-Cer (nach *Albrecht et al. (1995)* und *Hörnschemeyer (1997)*) und den jeweiligen TPD-Succinimidylestern (nach *Hörnschemeyer, 1997*, sowie in der vorliegenden Arbeit beschrieben) synthetisiert und enthalten eine β 1 \rightarrow 4 thioglykosidische Bindung, die von der Glucocerebrosidase nicht gespalten wird (s. Kapitel 3.4.1.2). Damit standen für die Photoinsertionsstudien drei Glucosyl-thio-ceramide mit unterschiedlichen Acylkettenlängen zur Verfügung, deren Fettsäurereste Kettenlängen mit 9, 11 und 13 Kohlenstoffatomen entsprechen dürften. Da sich gezeigt hat, dass diese noch in ausreichendem Maße auch in kultivierte Zellen inkorporiert werden können, war es möglich, sowohl die Lipidumgebung dieser Glykolipide in Modell- als auch in Zellmembranen zu untersuchen.

Das Sphingolipid Sphingomyelin gilt als einer der Hauptbestandteile der als „rafts“ beschriebenen Mikrodomänen in zellulären Membranen. Um auch die direkt benachbarten Moleküle dieser Lipidspezies bestimmen zu können, wurden hierzu im Rahmen dieser Dissertation ebenfalls zwei photoaktivierbare SM-Sonden hergestellt.

Durch Reduktion der 4,5-Doppelbindung des Sphingosin-Rückgrats mit radioaktivem [3 H]-Natriumborhydrid (*Schwarzmann, 1978*) konnte eine radioaktive Markierung in die Photosonden eingeführt werden (Abb. 3.3). Anschließende Stoffwechseluntersuchungen mit den SM-Sonden konnten belegen, dass während der hier gewählten Inkubationsdauer von 6 Stunden diese Moleküle lediglich bis zum Ceramid abgebaut wurden, so dass die Markierung katabolisch stabil war und auch im Zuge der Endozytose erhalten blieb.

4.2 Die Lipidnachbarschaft der Sonden in Modellmembranen

4.2.1 Glc-S-Cer-Sonden

Die Untersuchungen mit den Glc-S-Cer-Sonden in Modellmembranen haben gezeigt, dass nach Belichtung der Photosonden und der anschließenden dünn-schichtchromatographischen Trennung ein DC-Bandenmuster erhalten wurde, welches in den überwiegenden Fällen analysiert werden konnte. Durch die Zuordnung war es möglich, die den Sonden direkt benachbarten Moleküle zu analysieren. Viele der Insertionsprodukte konnten außer durch ihren dünn-schichtchromatographischen Retentionswert (R_f) auch durch eine massenspektrometrische Charakterisierung identifiziert werden. In den Fällen, wo die Trennschärfe der eindimensionalen Chromatographie nicht ausreichte (z.B. Insertionsprodukte der Glc-S-Cer-Sonden in PC, PA und PS), konnte die Zuordnung durch Analyse eines zweidimensionalen DCs erfolgen. Eine zusätzliche Trennung über Anionenaustauschchromatographie musste lediglich für die sichere Analyse der Kopplungsprodukte mit Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) und PE durchgeführt werden.

Durch die Belichtungsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass das Muster der Kopplungsprodukte sehr stark von der jeweiligen Lipidzusammensetzung der Liposomen abhängt. In Liposomen mit 39 Mol-% DMPG wurde beobachtet, dass die C3-Glc-S-Cer-Sonde wenig in dieses anionische Lipid inserierte, jedoch präferenziell in Cholesterol, welches als zweiter Bestandteil enthalten war (Abb. 3.4, Tab. 3.1). Auch mit DPPS und BMP wurde in Modellmembranen festgestellt, dass mit diesen anionischen Lipiden ebenfalls kaum Kopplungsprodukte der Glc-S-Cer-Photosonden gebildet wurden (Abb. 3.5, Tab. 3.2 und Abb. 3.20). Daher kann vermutet werden, dass anionische Lipide kaum in der direkten Nachbarschaft der Glucosyl-thio-ceramide vorhanden sind. Ob es zu Abstoßungen auf molekularer Ebene kommt oder andere biophysikalische Phänomene, wie z.B. Phasensegregationen, zu den niedrigen Insertionsraten in anionische Lipide führen, konnte bislang nicht geklärt werden.

Aus Untersuchungen von *Y. Lange (1991)* ist bekannt, dass ca. 90 % des freien zellulären Cholesterols von Fibroblasten in der Plasmamembran lokalisiert sind. Wählt man in Liposomen eine Lipidzusammensetzung, die in etwa der der extrazellulären Seite der PM entspricht, so wird nach Belichtung eine Gleichverteilung der Insertionsprodukte gefunden.

Diese Ergebnisse bestätigen nicht die für biologische Membranen beschriebenen Beobachtungen, wonach Cholesterol offenbar Wechselwirkungen mit den Sphingolipiden zeigt und in Mikrodomänen eng mit diesen vergesellschaftet ist bzw. durch Ausbildung einer *liquid-ordered-phase* von den anderen Lipiden „getrennt“ wird. Dieses zeigt, dass diese bimolekularen Wechselwirkungen zur Ausbildung der „rafts“ anscheinend nicht ausreichen, sondern noch andere Komponenten der Plasmamembran hierbei eine Rolle spielen, die allerdings in den Modellmembranen nicht enthalten waren.

Ein weiteres Kopplungsprodukt, welches nach Belichtung der Sonden erhalten wurde, resultierte aus der Insertion in Wasser. Bereits von *Meier et al. (1990)* wurde beschrieben, dass nach Belichtung einer C5-TPD-GM1-Photosonde in Cholesterol-haltigen Liposomen der Anteil der Wasserinsertion gegenüber Belichtung in reinen Phospholipid-Liposomen (PC, PE bzw. PS) deutlich sinkt. Dies zeigt, dass die Membran durch das Cholesterol verdichtet wird, so dass die Sonden stärker in der Membran verankert sind und sich auch weniger Wasser in der Membran befindet; dies kann auch die geringere Insertion in Wasser erklären. Durch Experimente mit den unterschiedlichen Kettenlängen der Photosonden und bei verschiedenen Temperaturen konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass für das Auftreten der Wasserinsertionsprodukte wohl überwiegend die „*off-rate*“ der Sonden verantwortlich ist. So sank durch eine längere photoaktivierbare Kette der Anteil an diesen Kopplungsprodukten merklich, welches durch eine stärkere Verankerung der Sonden in der Membran und somit durch eine reduzierte „*off-rate/hopping-rate*“ der Moleküle aus der Ebene der Membran heraus in das umgebende Wasser erklärt werden kann. Ein weiterer Teil repräsentiert zudem das in der Membran enthaltene Wasser, welches eventuell in tieferen Membranbereichen weniger häufig vorkommt als nahe der Grenzfläche zur wässrigen Phase, so dass durch eine längere Acylkette der Photosonde u.U. auch weniger Markierungsprodukt erhalten würde.

Durch die Experimente in Liposomen konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach Photolyse der Sonden verschiedene Isomere der Kopplungsprodukte entstehen können. Dabei kann es sich um Positionsisomere bei der Photoinsertion handeln, die durch die Bewegung der Sonden senkrecht zur Ebene der Lipidschicht entstehen („*hopping-rate*“). Diese Kopplungsprodukte besitzen eventuell verschiedene Polaritäten und weisen auf den DC-Platten u.U. ein unterschiedliches Laufverhalten auf, wodurch sie in zwei oder mehr Banden aufspalten können. Auch kann es sich bei einigen Banden um Enantiomerenpaare handeln, die durch die unterschiedliche Angriffsrichtung des Carbens im Moment der Photokopplung gebildet wurden.

Besonders bei der C7-Glc-S-Cer-Sonde wurde bei den Insertionsprodukten das Auftreten einer zweiten Banden mit ähnlicher Laufhöhe beobachtet, die durch diese Positions- bzw. Enantiomerenbildung zu erklären ist.

4.3.2 Sphingomyelin-Sonden

Bei den Sphingomyelin-Photosonden konnte ebenfalls eine Analyse der Kopplungsmuster durch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung der Insertionsprodukte durchgeführt werden. Dennoch war die Zuordnung der Kopplungsprodukte hier schwieriger als bei den Glc-S-Cer-Sonden, da die geringen Laufhöhen der Banden in dem verwendeten

Laufmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v) bei einigen der Produkte nicht zur ausreichenden Trennung geführt haben (z.B. Insertionsprodukte in GM1 und in Sphingomyelin). In den meisten Fällen konnte allerdings eine sichere Zuordnung erfolgen, wobei bei einigen der Insertionsprodukte zusätzlich noch eine massenspektrometrische Charakterisierung durchgeführt wurde (Tab. 3.9).

Die Photokopplungsmuster in Modellmembranen haben gezeigt, dass es in Cholesterolhaltigen Liposomen zu einer bevorzugten Insertion in das Sterol gegenüber den übrigen enthaltenen Wirtslipiden, wie z.B. PC und SM (Abb. 3.10, Tab. 3.7), kommt. Diese auch biophysikalisch gefundene Affinität basiert wohl z.T. auf der spezifischen Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen der Amidogruppe des Sphingomyelins und der Hydroxylgruppe des Cholesterols (Übersicht in *Brown, 1998*). Diese Wechselwirkungen zeigen sich auch in biologischen Membranen, wo sich die als „rafts“ beschriebenen Membranbereiche ausbilden können (*Simons und Ikonen, 1997*).

Auch konnte durch die Versuche in Modellmembranen gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Liposomen von essentieller Bedeutung für das nach Belichtung erhaltene Kopplungsmuster ist. So war in einem Fall die Insertion in Wasser doppelt so hoch wie in einem anderen, obwohl hier die gleichen Lipidbestandteile, jedoch in einem anderen Verhältnis zugesetzt wurden (Abb. 3.10, Tab. 3.7). Dieses macht deutlich, wie die Lipidumgebung das physikalische Verhalten der Sonden (hier die „off-rate“) direkt beeinflussen und somit eine festere oder schwächere Verankerung in der Membran verursachen kann. Besonders auffällig bei den Photomarkierungen mit den Sphingomyelin-Sonden war die Isomerenbildung (Positionsisomere/Enantiomere), die bei einigen der Insertionsprodukte beobachtet werden konnte (Abb. 3.10 und 3.11). Wie bereits für die Glc-S-Cer-Sonden im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, spalten dabei die Kopplungsprodukte auf den Dünnschichtplatten in zwei oder mehr Banden auf. Bei dem Insertionsprodukt in Cholesterol konnte die Identität der sich unter den Banden verbergenden Lipide durch eine Markierung mit dem [¹⁴C]-Derivat des Sterols nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Diese auch für die Insertion in Wasser beobachtete Erscheinung konnte auch massenspektrometrisch bestätigt werden.

4.3 Einbau der Sonden in Membranen kultivierter Fibroblasten und Stoffwechseluntersuchungen

Bei den hier verwendeten photoaktivierbaren Sphingolipiden handelt es sich um Derivate, die eine im Vergleich zu den natürlichen Analoga verkürzte Fettsäure tragen. Diese synthetischen Produkte lassen sich in die Plasmamembranen von kultivierten Zellen inkorporieren (Übersichten in *Schwarzmann und Sandhoff, 1990; Schwarzmann, 2001*), während dies bei Sphingolipid-Derivaten mit natürlichen Fettsäurekettenlängen von 16 bis 24 Kohlenstoffatomen aus Gründen der Löslichkeit nicht möglich ist. Die kurzkettigen Lipide zeigen aber im Vergleich zu ihren natürlichen Vertretern geringere hydrophobe Wechselwirkungen zu ihren Nachbarlipiden und besitzen daher eine höhere „off-rate“ als diese (*Brown et al., 1985*). Dieses ermöglicht den hier eingesetzten kurzkettigen Lipiden einen spontanen Austausch zwischen Membranen (*Rosenwald und Pagano, 1993; Jeckel und Wieland, 1993*). So könnten diese Lipide aus den intralysosomalen Membranen heraustreten und nach Diffusion über die Wasserphase auch in die Perimetermembran von Lysosomen inserieren und so andere Transportwege in Anspruch nehmen (*Schwarzmann, 2001*).

4.3.1 Glucosyl-thio-ceramid-Sonden

Beim Einbau der TPD-Glucosyl-thio-ceramide in zelluläre Membranen hat die Länge der entsprechenden Acylkette einen Einfluss auf die Einbaurrate. So erhöhte sich die inkorporierte Menge der C3- und C5-TPD-Glc-S-Cer-Sonden drastisch im Vergleich zur C7-TPD-GSC-Verbindung (21,9 und 17,3 gegenüber 6,4 nmol Lipid/mg Protein; Tab. 3.10). Dieser Effekt ist wohl auf die stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen der längerkettigen Lipide mit den Lipidbindungsproteinen (BSA) zurückzuführen. Eine ähnliche Abhängigkeit der Einbaurrate von der Acylkettenlänge des Sphingolipids wurde auch von *Pütz (1996)* für weitere Thioglykosphingolipide und von *Albrecht (1991)* für NBD-Ceramide beobachtet.

Weiterhin erfolgte nach Inkorporation der markierten Glucosyl-thio-ceramide (C3-, C5- und C7-Glc-S-Cer) in Fibroblasten, wie schon früher gezeigt werden konnte, eine postendozytische und zelltypspezifische Glykosylierung der Lipide (*Schwarzmann et al., 1995; Pütz, 1996* und Kapitel 3.3.2). Nach Inkubation der Sonden wurden die entsprechenden Derivate von Globotriaosylceramid und GM3 neben etwas Lac-S-Cer gefunden (Abb. 3.13 und Tab. 3.11), welche die in diesen Zellen hauptsächlich vorkommenden Glykolipide sind (*Chatterjee et al., 1976; van Echten und Sandhoff, 1989*). Es wurde festgestellt, dass auch die Stoffwechselraten mit zunehmender Kettenlänge der Photosonde abnahmen.

Vom C7-Derivat entstanden dabei innerhalb der sechsstündigen Inkubationsdauer nur 1,3 % Stoffwechselprodukte, während von den aufgenommenen C3- und C5-Glc-S-Cer-Sonden 4,3 bzw. 3,6 % glykosyliert wurden (Tab. 3.11). So zeigt sich hier, dass das längerkettigere Derivat auf dem Weg zum Golgi Apparat stärker retardiert wird.

4.3.2 Sphingomyelin-Sonden

Auch die Sphingomyelin-Photosonden ließen sich in Form ihrer BSA-Komplexe in die Plasmamembran von Fibroblasten inkorporieren. Die Einbauraten lagen mit 7,1 bzw. 10,6 nmol Lipid/mg Protein (Tab. 3.14) bei den C3- bzw. C5-SM-Sonden allerdings deutlich niedriger als es bei den entsprechenden C3- und C5-TPD-Glc-S-Cer-Derivaten der Fall war (21,9 bzw. 17,3 nmol Lipid/mg Protein; Tab. 3.10).

Hierbei spielt offenbar die Kopfgruppe der Sonden eine große Rolle, da die hier verwendeten Glucosyl-thio-ceramide und Sphingomyeline im Ceramid-Anker identisch zueinander sind.

Auch werden für das Zustandekommen der „rafts“ verschiedene Möglichkeiten diskutiert. *Simons und Ikonen (1997)* postulierten, dass eventuell schwache Wechselwirkungen der Kohlenhydrat-Kopfgruppen der Glykolipide zur Bildung der Mikrodomänen beitragen. In einem alternativen Modell von *Brown und London (1998)* wird hingegen angenommen, dass diese Wechselwirkungen eher auf den hydrophoben Kräften der überwiegend gesättigten und damit vermehrt gestreckten Acylketten beruhen, die die *liquid-ordered (l_o)-phase* ausbilden. Da die an den Mikrodomänen ebenfalls beteiligten Sphingomyeline keinen Kohlenhydrat-Rest tragen, ist die letztgenannte Theorie für diese Substanzklasse wohl als zutreffender anzusehen.

Nach sechsstündiger Endozytose der beiden SM-Sonden wurden Ceramid, Glucosylceramid und Sphingomyelin als Stoffwechselprodukte detektiert (Abb. 3.25). Dabei wurden die Sphingomyeline als Hauptprodukte erhalten, die zum einen die unveränderten, ursprünglich gefütterten Moleküle darstellen können. Andererseits könnte es sich dabei auch um die aus dem Metaboliten Ceramid neugebildete Sphingomyelin-Sonden handeln. Durch das Auftreten der Glucosylceramid-Banden kann man annehmen, dass Sphingomyelin in nicht unerheblichen Maße durch eine Re-Synthese aus Ceramid entstanden ist, da durch Untersuchungen mit radioaktiv markierten, kurzkettigen Ceramiden gezeigt werden konnte, dass hieraus in Fibroblasten erheblich größere Anteile an Sphingomyelin als an GlcCer gebildet werden (*Schwarzmann*, persönliche Mitteilung). Ceramid ist ebenfalls in nennenswerten Anteilen entstanden, wobei es bei der C3-SM-Photosonde mit 46 % nahezu die Hälfte der Stoffwechselprodukte darstellte, während bei der längerkettigen C5-

Verbindung lediglich zu 18 % gebildet worden ist. Ob diese Ungleichheit aus einer unterschiedlichen Affinität der sauren Sphingomyelinase zu den beiden Sonden resultiert, kann mit diesen Experimenten nicht festgestellt werden. Hingegen wurde eine Spezifität für verschiedene Acylkettenlängen mit der lysomalen sauren Ceramidase untersucht (Linke, 2000), welche die Amidbindung des Ceramids spaltet, so dass Sphingosin und die Acylkette freigesetzt werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass vom Enzym *in vitro* Substrate mit C₁₂-Acylkette am besten umgesetzt werden, wohingegen kürzer- oder länger-kettige Derivate weniger gut erkannt werden.

Es konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass wie erwartet, in der relativ kurzen Zeit der Endozytose nur ein Abbau zum Ceramid stattgefunden hat, da in der dünnschichtchromatographischen Analyse keine radioaktiv markierten Produkte aus den „salvage pathway“ erkennbar waren, die u.U. nach einem Abbau zum Sphinganin und erneuter Acylierung entstanden wären. Dies konnte auch durch die Abwesenheit von markierten Phospholipiden belegt werden, die aus Palmitoyl-CoA via Palmitaldehyd, einem weiteren Abbauprodukt des Sphinganins, gebildet werden könnten (Schwarzmann *et al.*, 1986).

4.4 Die Lipidnachbarschaft der Sonden in Zellmembranen

Sphingolipide sind charakteristische Bestandteile von eukaryontischen Zellen (Gahmberg und Hakomori, 1973; Wiegandt, 1985) und haben einen wichtigen Anteil an der Bildung der extrazellulären Schicht der Plasmamembran, in der sie auch hauptsächlich vorkommen. Durch biophysikalische Untersuchungen in Modellmembranen konnte bereits gezeigt werden, dass es durch Wechselwirkungen der Lipide untereinander zu Phasenbildungen und somit zu getrennten, nicht homogen-verteilten Bereichen innerhalb von Membranen kommen kann (Übersicht in Welti und Glaser, 1994). Auch ist bekannt, dass für die Aktivität einiger Proteine eine bestimmte Lipidumgebung notwendig ist (Übersichten in: Kobayashi *et al.*, 1998; Tocanne *et al.*, 1994), welches zur Steuerung zellulärer Vorgänge genutzt werden kann. Durch Untersuchungen in den letzten Jahre konnte belegt werden, dass Sphingolipide in Membranbereichen angereichert vorkommen, die man auch als Mikrodomänen oder „rafts“ bezeichnet (Simons und Ikonen, 1997). Diese besitzen offenbar eine andere Lipid- und Proteinzusammensetzung als die sie umgebenden Membranareale und haben Anteil an bestimmten zellulären Prozessen (siehe Einleitung, Kap. 2.2). Durch Photomarkierungen mit den hier zur Verfügung stehenden Sphingolipid-Sonden sollten die in zellulären Membranen direkt benachbarten Lipide untersucht und charakterisiert werden.

4.4.1 Glucosyl-thio-ceramid-Sonden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich ist, die Glucosyl-thio-ceramid-Sonden unter Endozytoseblock bei 7°C in die exoplasmatische Seite der Plasmamembran von humanen Fibroblasten zu inkorporieren, wurde zunächst in dieser Membran die direkte Lipidumgebung der Sonden bestimmt. Messungen der Lipidzusammensetzung dieser Membranhälfte ergaben, dass sie hauptsächlich aus PC und SM (ca. 50-60 %) und aus Cholesterol (etwa 30-40 %) besteht (Übersichten in *Devaux und Zachowski, 1994*; *van Meer und van Genderen, 1994*).

Obwohl in den Liposomenversuchen mit diesen Lipid-Bestandteilen der extrazellulären Seite der PM eine Gleichverteilung der Insertionsprodukte gefunden wurde, konnte dies bei Belichtung der Sonden in der Plasmamembran von Fibroblasten nicht bestätigt werden. Hierbei wurden gänzlich andere Verhältnisse der Kopplungsprodukte der Photosonden mit diesen Substanzen gefunden. Als Hauptkomponente wurde vor allem die Insertion in Cholesterol erhalten. Das Verhältnis der Insertionsprodukte lag bei den C3- und C5-Sonden mit ca. 11 : 2 : 1 (Cholesterol:PC:SM) (Tab. 3.12) deutlich über den Werten, die bei einer Gleichverteilung innerhalb der Membran gefunden worden wären. In Publikationen zu diesem Thema wurden bisher keine besonderen Assoziationen von Glucosyl-ceramid und Cholesterol auf molekularer Ebene in Modell- oder zellulären Membranen beschrieben. Somit lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass sich die Glc-S-Cer-Sonden während der Kopplung in Cholesterol-reichen Domänen befunden haben müssen, die auch als „rafts“ beschrieben werden.

Auch mit einem in die Plasmamembran von Fibroblasten inkorporierten GM1-Derivat, welches eine C5-TPD-Acylkette trägt, konnte durch eine Photomarkierung ebenfalls die direkte Assoziation des Gangliosids GM1 in Cholesterol-reichen Domänen gezeigt werden (*von Coburg*, persönliche Mitteilung). Dies bestätigt auch den Befund von *Möbius et al. (1999)*, wonach ein Biotin-markiertes GM1 in „rafts/patches“ und in *Caveolae* lokalisiert wurde, welche ebenfalls einen hohen Gehalt dieses Sterols aufweisen.

Mit den Glucosyl-thio-ceramid-Sonden wurden in der Plasmamembran außer PC und SM keine weiteren in der Membran enthaltenen Lipide, wie Glykosphingolipide, markiert, welche in vielen Fällen ebenfalls Bestandteil der Mikrodomänen sind (*Simons und Ikonen, 1997*). Allerdings konnten „rafts“ auch aus GM-95-Melanomazellen isoliert werden (*Ostermeyer et al., 1999*), in denen durch das Fehlen der GlcCer-Synthase keine GSL gebildet werden können. Auch bleibt die morphologische Struktur der *Caveolae* in NIH 3T3-Fibroblasten nach Inhibition der GSL-Bildung durch Gabe des GlcCer-Synthase-Inhibitors *D-threo-1-Phenyl-2-palmitoyl-3-pyrrolidino-propanol* erhalten (*Shu et al., 2000*). Dies zeigt, dass diese Glykolipide zwar in den Mikrodomänen lokalisiert sein können, für

deren Existenz aber nicht unbedingt notwendig sind. Anders stellt es sich dar, wenn durch exogene Gabe von bakterieller Sphingomyelinase das in der Plasmamembran enthaltene Sphingomyelin zu Ceramid abgebaut wird und es zum schnellen Austritt des Cholesterols aus der Plasmamembran und zur anschließenden Veresterung im Zytosol durch die Acyl-CoA:Cholesterol-Acyl-Transferase (ACAT) kommt. (Slotte und Bierman, 1988). Auch wenn membrangebundenes Cholesterol z.B. durch Applizierung von β -Methylcyclodextrin aus der PM entfernt wird, kommt es zur Störung der spezifischen Transportvorgänge von Proteinen in Bereiche der „rafts“ (Ilangumaran und Hoessli, 1998; Pralle et al., 2000) wie auch in die der *Caveolae*, so dass sich dort ebene Membranbereiche bilden können, die nicht mehr von den umgebenden Arealen der Plasmamembran unterschieden werden können (z.B. Rothberg et al., 1990). Auch konnte gezeigt werden, dass hierdurch Signaltransduktionsvorgänge gestört werden (Übersicht in Simons und Toomre, 2000).

Unter den aeroben Bedingungen der Zellkultur wurden die TPD-Glucosyl-thio-ceramide zwar in geringem Maße in ihre Sulfoxide überführt, dies führte aber zu keinen schwerwiegenden Problemen, da die Kopplungs- und ihre Oxidationsprodukte in den meisten Fällen charakterisiert werden konnten. Zudem führten auch die Untersuchungen mit den reinen Oxidationsprodukten bei der Markierung der Plasmamembran von Fibroblasten zu den gleichen Kopplungsmustern wie mit den nicht-oxidierten Sonden (Kapitel 3.4.1.3).

Obwohl in den Liposomenexperimenten mit der C7-Glc-S-Cer-Sonde gut auswertbare Dünnschichtchromatogramme erhalten wurden (Abb. 3.5), gestaltete sich die Analyse des Kopplungsmusters nach Belichtung dieser Sonde in der Plasmamembran kultivierter Fibroblasten erheblich schwieriger (Abb. 3.15). Die Chromatogramme konnten z.T. durch die Überlagerung von verschiedenen Positionsisomeren nicht mit hinreichender Genauigkeit ausgewertet werden; dennoch wurde hier qualitativ ebenfalls eine präferentielle Insertion in Cholesterol gegenüber der Kopplung mit PC und SM festgestellt. Durch die längere Acylkette der C7-Photosonde ist es möglich, dass die TPD-Gruppe in den tieferen, fluideren Bereichen der Membran positioniert ist und somit mehr Möglichkeiten der Insertion in die flexibleren Abschnitte der Lipidfettsäurereste besitzt. Auch kann dadurch die Insertion in Cholesterol in dessen Kern, wie auch in die Seitenkette am C-17 des Sterols erfolgen. Hierdurch können insgesamt eine Vielzahl von verschiedenen Positionsisomeren entstehen, die auf den Dünnschichtplatten jeweils ein geringfügig unterschiedliches Laufverhalten aufweisen und somit das Kopplungsmuster komplizierter gestalten. Da die Kopplungsprodukte der C7-Glc-S-Cer-Sonde aufgrund dieser Schwierigkeiten nicht hinreichend genau zugeordnet und ausgewertet werden konnten, wurde hier auf die exakte tabellarische und grafische Darstellung verzichtet.

Eine tiefere und somit eventuell auch festere Verankerung der C7-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde innerhalb der zellulären Membranen konnte durch eine geringe Insertionsrate in Wasser gezeigt werden. Nach Belichtung der C7-Sonde in der Plasmamembran von Fibroblasten wurde mit 17,2 % eine im Vergleich zu den C3- und C5-Verbindungen niedrigere Wasserinsertion gefunden (27,4 % bzw. 22,4 %; Abb. 3.23). Dieses zeigt zum einen, dass auch im Zellexperiment die länger-kettige Sonde eine niedrigere „*off-rate*“ aufweist bzw. mit dessen TPD-Sonde in tieferen Membranbereichen, die u.U. weniger enthaltenes Wasser enthalten, lokalisiert ist. Verglichen mit den Versuchen in DOPC-Liposomen nimmt die Stärke der Membranverankerung aller Photosonden in Zellen deutlich zu, da offenbar hier die komplexe Lipidzusammensetzung der Zellen zu einer dichteren Packung der Lipiddoppelschichten führt. In DOPC-Liposomen (mit 2 Mol-% Sonde) könnte das Glc-S-Cer eher als Störstelle wirken, so dass die Bindung innerhalb der Membran schlechter bzw. schwächer ist.

Eine festere Membranverankerung sollte ebenfalls bei der Lokalisierung der Sonden in dem als *liquid-ordered-phase* beschriebenen Bereich der „*rafts*“ gegeben sein, welcher durch die eher gesättigten Fettsäurereste der Lipide gekennzeichnet ist. Auch ist die Oberflächenkrümmung dieser Membranabschnitte in zellulären Membranen wohl eher gering im Vergleich zu den DOPC-Liposomen, so dass auch hierdurch die „*off-rate*“ in Zellen geringer sein sollte.

Werden die Glc-S-Cer-Sonden von den Zellen endozytiert, so wird bereits nach kurzer Endozytosedauer festgestellt, dass sie die Cholesterol-reichen Domänen verlassen und sich anschließend in einer gänzlich anderen Lipidumgebung befinden. So nimmt die Insertion der C3- und C5-TPD-Sonden in Cholesterol bereits innerhalb von 30 Minuten etwa um die Hälfte ab und erreicht nach 2 Stunden den Gleichgewichtszustand mit nur noch ca. einem Drittel des in der Plasmamembran ermittelten Wertes. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem Anstieg des Kopplungsproduktes mit PC, welches, obwohl eines der Hauptbestandteile der PM, in dieser nur im untergeordnetem Maße markiert wurde. Im Falle der C3-Sonde stellt die Insertion in PC bereits nach einer Stunde das Hauptprodukt dar und erreicht einen Wert von 50 %. Auch bei der C5-Verbindung wird schon nach 30 Minuten der Gleichgewichtszustand mit ca. 35 % Kopplungsprodukt eingestellt, was zeigt, dass nach erfolgter Endozytose der Sonden auf inneren Membranen keine spezifischen Assoziationen mit Cholesterol mehr feststellbar sind.

Auch werden nach Endozytose der Sonden Kopplungsprodukte mit PE verstärkt gebildet, einem Lipid, welches in der PM durch die Anwesenheit einer Aminophospholipid-Translokase fast ausschließlich auf der zytosolisch-orientierten Membranhälfte vorkommt. Auf inneren Membranen der Zelle kommt es offenbar zum Verlust dieser asymmetrischen

Anordnung des PE, so dass die Insertion der Glc-S-Cer-Sonden in dieses Lipid möglich wird. Ein *flip-flop* der Sonden ist hingegen nicht spontan (*Sillence et al., 2000*), sondern wohl nur durch einen protein-vermittelten Transport durch die Membran möglich, wie es für einige Lipide mit den ABC-Transportern MDR-1 und MDR-3 gezeigt wurde (*van Helvoort et al., 1996*).

Ob diesen Änderungen der Lipidumgebung aktiv-gesteuerte Sortierprozesse der Zelle zugrunde liegen oder sie durch gezielte Vesikel-Abschnürungen bestimmter Membranbereiche und Fusion mit anderen geschehen, konnte durch die hier dargestellten Versuche nicht geklärt werden.

Nach mehrstündiger Inkubation der Zellen mit den Sonden bei 37°C können die Moleküle auch in innere, abbauende Kompartimente transportiert werden. *Wherrett und Huterer (1972)* haben gezeigt, dass Lysosomen im Vergleich zu den übrigen Organellen der Zelle einen höheren Anteil an Bis(monoacylglycero)phosphat (BMP) aufweisen. Nach dem Modell des lysosomalen Abbaus (*Fürst und Sandhoff, 1992*) ist zu erwarten, dass die Photosonden wie andere Sphingolipide im Verlauf der Endozytose zu den intraendosomalen und –lysosomalen Membranen transportiert werden.

Obwohl in Liposomenexperimenten gezeigt werden konnte, dass die Trennung negativgeladener und ungeladener Insertionsprodukte über Anionenaustauschchromatographie erfolgreich war, wurde bei Auftrennung der Kopplungsprodukte eines Zellversuchs nach sechsstündiger Endozytose der C5-Glc-S-Cer-Sonde und anschließender Photolyse mit den hier zur Verfügung stehenden Methoden kein Produkt der Insertion in BMP detektiert. Eine Photoinsertion kann jedoch erwartet werden, wenn sich die TPD-Sonden entsprechend NBD-markiertem Glucosyl-thio-ceramid verhalten würden, welches nach längerer Zeitdauer in Lysosomen akkumuliert (*Schwarzmann und Sandhoff, 1990*). Die Tatsache, dass kein Photokopplungsprodukt der Sonden hier detektiert werden konnte, kann bedeuten, dass sich die Sonde nicht auf diesen inneren, multivesikulären Organellmembranen in denen BMP angereichert vorkommt, befunden hat. Es ist vorstellbar, dass die Sonde aufgrund der stärkeren Krümmung dieser Membranstrukturen weniger gut in diesen verankert sein und durch eine erhöhte „*off-rate*“ diesen Membranen entkommen, weshalb keine nachweisbaren Insertionsprodukte erhalten wurden. Sollten die Photosonden im Zuge der Endozytose dennoch auf diesen intraendosomalen bzw. –lysosomalen Membranen lokalisiert sein, so könnte dieses evtl. mit einer längeren hydrophoberen TPD-Sonde untersucht werden. Zu diesem Zweck wird derzeit eine neue TPD-Photosonde mit einer Decylkette (C₁₀) synthetisiert (*von Coburg, persönliche Mitteilung*), die einer Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen entspricht. Diese könnte u.U. auch entsprechend der nativen Derivate mit langen Acylketten (C₁₆-C₂₄) in Zellen mit pathologischen

Defekten oder im Falle von abbauresistenten Lipid-Sonden in den Lysosomen gespeichert werden.

Bei der Niemann-Pick'schen Erkrankung vom Typ C (NPC) kommt es durch den Defekt des integralen Membranproteins NPC1 zu einer Speicherung großer Mengen an Cholesterol in den abbauenden Kompartimenten (Übersicht in *Patterson et al., 2001*). Hier wurde mit Fibroblasten von Patienten mit NPC'scher Erkrankung untersucht, ob die Sonden im Zuge ihrer Endozytose auch in diesen Kompartimenten lokalisiert sind, so dass auch hierdurch vermehrt Kopplungsprodukte mit Cholesterol entstehen sollten. Allerdings wurde in Experimenten nach sechsständiger Inkubation der Zellen bei 37°C mit den SM-Sonden kein geändertes Kopplungsmuster im Vergleich zu Fibroblasten ohne Befund erhalten. Wie schon im vorhergehenden Absatz beschrieben, kann es auch hier sein, dass die Sonden nicht auf den Cholesterol-haltigen Speicherkörperchen der Zellen lokalisiert waren, oder dass die Verweildauer in diesen Kompartimenten zu gering war, um eine höhere Insertionsrate in Cholesterol herbeizuführen.

4.4.2 Spingomyelin-Photosonden

Nach Inkorporation der Sphingomyelin-Photosonden in die extrazelluläre Schicht der Plasmamembran von kultivierten Fibroblasten wurde nach Belichtung der Sonden im überwiegenden Maße die Insertion in Cholesterol erhalten (Abb. 3.26; Tab. 3.16). Wenn auch schon in Liposomenexperimenten eine Affinität der SM-Sonden zum Sterol gezeigt werden konnte, so ist die in diesen Zellversuchen gefundene Vergesellschaftung noch deutlich stärker. Auch sind die Werte der Insertion in Wasser erheblich niedriger als bei Versuchen in Liposomen, so dass sich die Sonden in der Plasmamembran in einer „dichter gepackten“ Umgebung befinden müssen. Dieses bestätigt auch Beschreibungen der „rafts“ (*liquid-ordered-phase*), denen zufolge Sphingomyelin einer der Hauptbestandteile ist. Auch kann durch die hohe Insertionsrate der SM-Sonden in Cholesterol bestätigt werden, dass diese in Zellmembranen direkt benachbart vorkommen. Diese auch durch biophysikalische Messungen ermittelten Wechselwirkungen (Kapitel 2.1; Abb. 1.1) führen offenbar in Zellmembranen zu besonders hohen Affinitäten, so dass die „off-rate“ der Moleküle erniedrigt wird. Zudem werden mit den Sphingomyelin-Sonden nur wenige andere Kopplungsprodukte z.B. mit PC oder mit den endogenen SM-Molekülen erhalten, welche die Hauptbestandteile der extrazellulären Membranseite darstellen.

Im Gegensatz dazu war auf den Dünnschichtplatten ein Produkt feststellbar, bei dem es sich mit großer Sicherheit um ein Kopplungsprodukt mit den jeweiligen TPD-Ceramiden

handelte. Die in diesen Experimenten, die unter Endozytoseblock durchgeführt wurden, gemachten Beobachtungen, dass die Sphingomyelin-Sonden zu den entsprechenden Ceramiden abgebaut werden, kann durch die Aktivität der sauren wie auch der neutralen Sphingomyelinase der PM erklärt werden; beide Enzyme wurden in Caveolae und/oder anderen Mikrodomänen beschrieben (*Veltman et al., 2001*). Für den Abbau der membranständigen Sphingomyeline durch die Sphingomyelinasen ist die Fluidität der Membran ausschlaggebend; so konnte von *Pellkofer und Sandhoff (1980)* gezeigt werden, dass eine Fluidisierung synaptosomaler Kälberhirnmikrosomen durch Halothan (2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan) den Abbau endogener Sphingomyeline erleichterte. In der Doktorarbeit wurde gezeigt, dass wesentlich mehr von C3-SM als von der C5-Verbindung in der Plasmamembran abgebaut wurde, welches sich durch eine größere Beweglichkeit des kürzerkettigen Derivates in der Membran erklären lässt.

Auch konnte gezeigt werden, dass die saure Sphingomyelinase nach exogener Stimulation von CD95 innerhalb von Sekunden aus den inneren Kompartimenten auf die extrazelluläre Seite der PM transportiert wurde und dort Ceramid freigesetzt hat (*Grassmé et al., 2001*).

Nach Endozytose zeigte sich im Gegensatz zu den Experimenten mit den Glc-S-Cer-Sonden, dass sich die SM-Photosonden auch nach sechsständiger Inkubation bei 37°C in nahezu der gleichen Lipidumgebung befanden. Als Hauptprodukt wurde wie bereits bei den Plasmamembran-Experimenten überwiegend das Kopplungsprodukt mit Cholesterol gefunden (Abb. 3.27; Tab. 3.17). Zudem wurden nur sehr wenige Kopplungsprodukte mit den übrigen Lipiden der Zelle erhalten, so dass sich hierdurch erneut die starke Affinität zum Sterol zeigte. Auch hat sich das Verhältnis der einzelnen Kopplungsprodukte untereinander im Verlauf der Endozytose anscheinend nicht verändert, wenngleich ein genauer prozentualer Vergleich nicht erfolgen konnte, da das Kopplungsmuster nach sechsständiger Endozytose durch den Metabolismus der Sonden zusätzlich um Kopplungsprodukte mit den daraus entstandenen TPD-Ceramiden und TPD-Glucosylceramiden erweitert und verkompliziert wurde.

Dass die enge Assoziation von Sphingomyelin und Cholesterol in Zellen von Patienten mit Niemann-Pick'scher Erkrankung Typ C (NPC) auch zu einer Speicherung von SM führt, ist ungewiss. Es ist zweifelhaft, ob eine Untersuchung mit den SM-Photosonden weitere Erkenntnisse darüber ergeben hätte, da schon in den Experimenten der SM-Sonden nach sechsständiger Endozytose in Fibroblasten ohne Befund eine sehr hohe Insertionsrate in Cholesterol nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt, dass diese Moleküle sich wohl auch unter Bedingungen der Endozytose in der gleichen Lipidumgebung befinden, so

dass vermutlich auch in NPC-Zellen kein anderes Kopplungsmuster erhalten worden wäre.

Durch die Photomarkierungs-Experimente in Zellmembranen konnte gezeigt werden, dass die SM-Photosonden stets in einer Cholesterol-reichen Lipidumgebung lokalisiert waren. Nach den in der Literatur beschriebenen Experimenten konnten in vielen Fällen durch Detergenz-unterstützte Zellyse und anschließende Ultrazentrifugation Membranbereiche isoliert werden (*Brown und Rose, 1992*; Übersicht in *Hooper, 1999*), die sowohl einen hohen Cholesterol- als auch einen hohen Sphingolipid-Gehalt aufweisen. Auch in dieser Arbeit wurde versucht, mit dieser Methode entsprechende Mikrodomänen aus den mit Sonden inkubierten Zellen zu extrahieren.

Allerdings konnten offenbar aus den verwendeten Zellschalen trotz mehrfacher Wiederholung der Versuche keine ausreichenden Lipidmengen isoliert werden, die auf den Dünnschichtplatten zum Nachweis der Beteiligung der Sonden an den „rafts“ ausgereicht hätten. Dennoch konnten durch die Versuche schwache Hinweise erhalten werden, die auch mit diesen Untersuchungsmethoden möglicherweise eine Inkorporation der Sphingomyelin-Sonden in den „rafts“ belegen. So wurden in dem 5/30 %-Grenzbereich des Saccharose-Gradienten im Vergleich zu den flankierenden Fraktionen geringfügig höhere Mengen an radioaktiv markierter Sonde detektiert. Dieser Bereich wird in vergleichbaren Artikeln als die Region beschrieben, in der sich die „leichte, schwimmende Fraktion geringer Dichte“ befinden sollte. Somit könnte in weiteren Experimenten mit größeren Zellzahlen bzw. Lipidmengen der Nachweis der Beteiligung der Sonden an den Mikrodomänen auch mit dieser Methode gelingen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Gerät/Typ	Hersteller/Vertrieb	Sitz
Reactitherm Heating/Stirring Module	Pierce Chemical Company	Rockford, IL, USA
Massenspektrometer TOFSpec E (MALDI-TOF)	Micromass	Manchester, GB
Massenspektrometer Q-TOF2 (ESI-TOF)	Micromass	Manchester, GB
Radioscanner Fuji BAS 1000 Imaging Analyzer	Fuji Photo Film Co	Tokyo, Japan
Ultrazentrifuge L8-80M mit Rotor SW41Ti	Beckman Instruments	München
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus	Osterode
LiposoFast low pressure homogenizer	Avestin	Ottawa, Kanada
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin	Berlin

Alle weiteren benutzten Geräte werden bei den entsprechenden Arbeitstechniken beschrieben.

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Reagenz	Hersteller/Vertrieb	Sitz
Dioleoyl-L- α -phosphatidsäure (DOPA)	Sigma	Deisenhofen
Dioleoyl-L- α -phosphatidylcholin (DOPC)	Sigma	Deisenhofen
Dioleoyl-L- α -phosphatidylethanolamin (DOPE)	Sigma	Deisenhofen
Dioleoyl-L- α -phosphatidylglycerol (DOPG)	Sigma	Deisenhofen
Dipalmitoyl-L- α -phosphatidyl-L-serin (DPPS)	Sigma	Deisenhofen
L- α -phosphatidyl-L-serin (PS, aus Rinderhirn)	Sigma	Deisenhofen
N-Oleoyl-sphingomyelin (N-O-SM)	Sigma	Deisenhofen
Cholesterol	Sigma	Deisenhofen
Dimyristylol-L- α -glycerol	Lipoids	Ludwigshafen
Phosphatidylcholin (aus Ei-Lecithin)	Lipoids	Ludwigshafen
Cardiolipin (aus Rinderherz)	Avanti Polar Lipids	Alabaster, AL, USA
L- α -Phosphatidylinositol (PI, aus Rinderleber)	Avanti Polar Lipids	Alabaster, AL, USA
[U- 14 C]-Glucose (9,1 GBq/mol)	Biotrend	Köln
7-Phenylheptansäure	Lancaster	Mühlheim/Main
[3 H]-Natriumborhydrid (222 GBq/mol)	Amersham	Braunschweig
[6,6'(n)- 3 H]-Saccharose (203,5 GBq/mol)	Amersham	Braunschweig
Röntgenfilme Biomax MR-1	Kodak	Rochester, NY, USA
LiChroprep RP-18 (40-63 μ m)	Merck	Darmstadt
Kieselgel Si60 (15-40 μ m, 40-63 μ m, 63-200 μ m)	Merck	Darmstadt
DC-Platten (Kieselgel Si60) mit und ohne	Merck	Darmstadt
Fluoreszenzindikator F ₂₅₄		
HPTLC-Platten 10x10 cm (Kieselgel Si60)	Merck	Darmstadt
DEAE-Sephadex A25	Pharmacia	Uppsala, Schweden
RP-HPLC-Säule ProSep C-18 5 μ , 250x20 mm	Latek	Eppelheim

S- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-(2*R*,3*R*,4*E*)-2-amino-3-hydroxy-4-octadecen-1-thiol (Lyso-Glc-S-Cer und [14 C]-Lyso-Glc-S-Cer) wurden nach *Albrecht et al. (1995)* bzw. *Hörnschemeyer (1997)* hergestellt und waren in unserem Labor vorhanden. Die Synthesestrategie für diese Verbindung wird im Ergebnisteil dieser Arbeit (3.1.1) beschrieben.

Die verwendeten C3- und C5-TPD-Succinimidylester wurden während der Diplomarbeit (*Hörnschemeyer, 1997*) synthetisiert und waren vorhanden.

(D-*erythro*)-Sphingosin-phosphorylcholin (Lyso-Sphingomyelin) aus Rinderhirn wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Schwarzmann zur Verfügung gestellt.

Natives Bis(monoacylglycero)phosphat (C18:1, C18:1) (BMP) wurde von Herrn Toshihide Kobayashi aus Saitama, Japan erhalten.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren von höchster erhaltlicher Reinheit.

5.1.3 Synthesen

5.1.3.1 Synthese der photoaktivierbaren C₇-Fettsäure

Entsprechende Synthesen von zwei photoaktivierbaren Fettsäuren (C₃- bzw. C₅-Acylkettenlänge) wurden bereits in meiner Diplomarbeit durchgeführt und beschrieben (*Hörnschemeyer, 1997*). Während der Arbeiten mit den Glc-S-Cer-Photosonden hat sich die Bedeutung der Länge der Acylkette herausgestellt, weshalb eine weitere photoaktivierbare Fettsäure mit C₇-Acylkette in Homologie zu den bereits synthetisierten Fettsäuren hergestellt wurde.

7- Phenylheptansäure-methylester (1)

22,65 g (110 mmol) 7-Phenylheptansäure wurden in 22,7 ml (560 mmol) Methanol suspendiert; dann wurde 1 ml Schwefelsäure zugefügt und die Mischung unter Rückfluss 20 Stunden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgetrennt und der Rückstand in einen 5fachen Überschuss Eiswasser gegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Diethylether extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung, zweimal mit 10 ml Wasser gewaschen und anschließend über CaCl₂ getrocknet. Der Ether wurde im schwachen Vakuum entfernt und das zurückbleibende Öl im Hochvakuum destilliert. (K_p 82-90°C bei ca. 0,05 torr). R_f (Petrolether/Essigsäureethylester 7:3, v/v) Edukt 0,45; Produkt 0,62.

Ausbeute: 22,0 g (100 mmol) = 91 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.27 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.55 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.22 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.5 Hz, H-2), 2.52 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 3.60 (s, 3 H, OCH_3), 7.10 (m, 3 H, Bz), 7.19 (d, 2 H, J_{HH} 7.6 Hz, Bz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.83 (1 C, CH_2 , C-3), 28.85 (1 C, CH_2 , C-4), 28.95 (1 C, CH_2 , C-5), 31.23 (1 C, CH_2 , C-6), 34.03 (1 C, CH_2 , C-2), 35.83 (1 C, CH_2 , C-7), 51.41 (1 C, OCH_3), 125.58 (1 C, CH-Bz₄), 128.20 (2 C, CH-Bz), 128.35 (2 C, CH-Bz), 142.65 (1 C, C-Bz₁), 174.22 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ($[\text{M}]^+$): 220.1463 (ex.), 220.31 (av.)
Gefunden 220.1466 (20 %)

188 (30 %, $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$), 91 (100 %, $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$), 87 (23 %), 84 (20 %), 74 (26 %, $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$)

7-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)heptansäure-methylester (2)

53 g (0,4 mol) AlCl_3 wurden in 120 ml Chloroform suspendiert. In der Kälte (0-5°C) wurden 30 g (20 ml, 0,143 mol) Trifluoressigsäureanhydrid unter Rühren langsam hinzugefügt und über einen Zeitraum von 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden bei der gleichen Temperatur 22 g (0,1 mol) des Esters (1) zugetropft. Nach zwei Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung in einem Scheidetrichter auf 1 l Eis gegeben. Mit 5 ml konz. Salzsäure wurde ausgefallenes Aluminiumhydroxid in Lösung gebracht. Die organische Phase wurde entfernt und die wässrige dreimal mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit je 50 ml Wasser und gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abgetrennt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum destilliert (K_p 105-112°C bei ca. 0,05 torr).

R_f (Hexan/Essigsäureethylester 9:1, v/v) = 0,23.

Ausbeute: 23,5 g (74 mmol) = 74 % (hellgelbes Öl)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.28 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.56 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.22 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.5 Hz, H-2), 2.61 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 3.57 (s, 3 H, OCH_3), 7.26 (d, 2 H, J_{HH} 7.6 Hz, Bz_{2,6}), 7.90 (d, 2 H, J_{HH} 7.6 Hz, Bz_{3,5})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.67 (1 C, C-3), 28.73 (1 C, C-4), 28.77 (1 C, C-5), 30.56 (1 C, C-6), 33.85 (1 C, C-2), 35.98 (1 C, C-7), 51.35 (1 C, OCH_3), 116.69 (q, 1 C, $^1J_{\text{CF}}$ 291.4 Hz, CF_3), 127.53 (1 C, C-Bz₄), 129.09 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 130.21 (1 C, CH-Bz), 130.23 (1 C, CH-Bz), 151.58 (1 C, C-Bz₁), 174.06 (1 C, COOR), 179.96 (q, 1 C, $^2J_{\text{CF}}$ 34.8 Hz, CF_3CO)

HRMS : Berechnet für $C_{16}H_{19}F_3O_3$ ($[M]^+$): 316.1286 (ex.), 316.32 (av.)
Gefunden 316.1283 (30 %)

296 (37 %, $[M-HF]^+$), 284 (25 %, $[M-CH_3OH]^+$), 264 (21 %, $[M-C_4H_4]^+$), 247 (66 %, $[M-CF_3]^+$), 188 (100 %, $[M-CF_3CO-CH_3OH+H]^+$), 149 (36 %), 131 (35 %), 118 (47 %), 97 (31 %), 91 (37 %, $[C_7H_7]^+$), 90 (36 %), 74 (40 %), 69 (32 %), 59 (20 %), 55 (21 %)

7-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)heptansäure (3)

23,5 g (74 mmol) Ester (2) wurden in 120 ml (3,18 mol) Ameisensäure gelöst. Nach Zugabe von 2 ml konz. Schwefelsäure wurde die Lösung bei 100°C für 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt, so dass der bei 32°C siedende Ameisensäuremethylester durch den Kühler entweichen konnte. Die Hauptmenge der Ameisensäure wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 400 ml Eiswasser gegeben. Das gebildete weiße Präzipitat wurde abfiltriert und getrocknet. Umkristallisieren aus Aceton/Wasser ergab farblose Nadeln. R_f (Chloroform) Produkt 0,33.

Ausbeute: 20 g (66 mmol) = 89 %

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.29 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.56 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.27 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.4 Hz, H-2), 2.61 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 7.26 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz_{2,6}), 7.91 (d, 2 H, J_{HH} 7.6 Hz, Bz_{3,5})

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.42 (1 C, C-3), 28.72 (1 C, C-4), 28.74 (1 C, C-5), 30.57 (1 C, C-6), 33.93 (1 C, C-2), 36.00 (1 C, C-7), 116.71 (q, 1 C, $^1J_{CF}$ 291.5 Hz, CF_3), 127.56 (1 C, C-Bz₄), 129.12 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 130.27 (1 C, CH-Bz), 130.29 (1 C, CH-Bz), 151.58 (1 C, C-Bz₁), 180.23 (1 C, COOH), 180.25 (q, 1 C, $^2J_{CF}$ 34.3 Hz, CF_3CO),

HRMS : Berechnet für $C_{15}H_{17}F_3O_3$ ($[M]^+$): 302.1130 (ex.), 302.29 (av.)
Gefunden 302.1131 (21 %)

284 (11 %, $[M-H_2O]^+$), 282 (10 %, $[M-HF]^+$), 264 (12 %, $[M-HF-H_2O]^+$), 233 (26 %, $[M-CF_3]^+$), 201 (14 %), 188 (100 %, $[M-H_2O-CF_3CO+H]^+$), 135 (35 %), 131 (18 %), 118 (27 %, $[C_7H_6CO]^+$), 91 (30 %, $[C_7H_7]^+$), 90 (19 %)

7-(p-(2,2,2-Trifluoracetyl)phenyl)heptansäure-tert.-butylester (4)

Zu einer Lösung von 16 g (59,3 mmol) der Säure (**3**) in 250 ml Diethylether wurden 14,4 g (70 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 5,2 g (70 mmol) tert. Butanol, 0,8 g (6,5 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) gegeben und die Suspension unter Schutzgasatmosphäre 65 Stunden gerührt. Die Mischung wurde filtriert, dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und der Ether im schwachen Vakuum entfernt. Der Ester wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel 63-200 μm mit Chloroform/Petrolether 7:3 (v/v) als mobile Phase gereinigt. R_f (Chloroform) = 0,33 (Säure) und R_f 0,6 (Ester).

Ausbeute: 11,0 g (30,7 mmol) = 52 % (hellgelbes Öl)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.30 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.39 (s, 9 H, tBu), 1.53 (m, 2 H, H-3), 1.60 (m, 2 H, H-6), 2.15 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.3 Hz, H-2), 2.64 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 7.29 (d, 2 H, J_{HH} 8.6 Hz, Bz_{2,6}), 7.93 (d, 2 H, J_{HH} 7.6 Hz, Bz_{3,5})

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.81 (1 C, C-3), 27.94 (3 C, tBu-CH₃), 28.71 (1 C, C-4), 28.75 (1 C, C-5), 30.56 (1 C, C-6), 35.32 (1 C, C-2), 35.97 (1 C, C-7), 79.81 (1 C, tBu-C_q), 116.69 (q, 1 C, $^1J_{\text{CF}}$ 291.4 Hz, CF₃), 127.51 (1 C, C-Bz₄), 129.07 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 130.16 (1 C, CH-Bz), 130.19 (1 C, CH-Bz), 151.62 (1 C, C-Bz₁), 172.98 (1 C, COOR), 179.92 (q, 1 C, $^2J_{\text{CF}}$ 34,3 Hz, CF₃C=O)

HRMS : Berechnet für C₁₅H₁₇F₃O₃ ([M-tBu+H]⁺): 302.1130
 Gefunden 302.1129 (39 %)
 Berechnet für C₁₉H₂₅F₃O₃ ([M]⁺): 358.1756 (ex.), 358.40 (av.)

285 (23 %, [M-OtBu]⁺), 202 (8 %), 188 (35 %), 131 (11 %), 118 (10 %), 57 (100 %, [tBu]⁺)

7-(p-(1-Hydroxyimino-2,2,2-trifluorethyl)phenyl)heptansäure-tert.-butylester (5)

Eine Lösung von 11 g (30,7 mmol) Ester (**4**) und 2,3 g (32 mmol) Hydroxylamin-HCl in 150 ml Ethanol wurde unter Rückfluss vorsichtig 2 Stunden erhitzt und der pH-Wert mit 4 M NaOH bei 6-7 gehalten. Ausgefallenes NaCl wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen, und die vereinten organischen Phasen wurden zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst, dreimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Ether wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 63-200 μm mit Chloroform als Eluent gereinigt. (R_f = 0,75 Keton; R_f = 0,2 Produkt).

Ausbeute: 8,6 g (23,1 mmol) = 75 %.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.37 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.46 (s, 9 H, tBu), 1.63 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.24 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.5 Hz, H-2), 2.64 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 7.27 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 7.48 (d, 2 H, J_{HH} 8.1 Hz, Bz), 10.35 (s, 1 H, N-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.91 (1 C, C-3), 27.91 (3 C, tBu- CH_3), 28.74 (1 C, C-4), 28.79 (1 C, C-5), 30.79 (1 C, C-6), 35.56 (1 C, C-2), 35.67 (1 C, C-7), 80.59 (1 C, tBu- C_q), 120.81 (q, 1C, $^1J_{\text{CF}}$ 274.7 Hz, CF_3), 123.52 (1 C, C-Bz₄), 128.38 (2 C, CH-Bz), 128.57 (2 C, CH-Bz), 145.32 (1 C, Bz₁), 146.81 (q, $^2J_{\text{CF}}$ 32.0 Hz, C=N), 174.33 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_3$ ($[\text{M-tBu+H}]^+$): 317.1239
 Gefunden 317.1232 (13 %)
 Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{NO}_3$ ($[\text{M}]^+$): 373.1865 (ex.), 373.41 (av.)

300 (83 %, $[\text{M-OtBu}]^+$), 282 (20 %, $[\text{M-OtBu-H}_2\text{O}]^+$), 202 (26 %, $[\text{F}_3\text{CCNOHPhCH}_3]^+$), 186 (10 %, $[\text{202-H}_2\text{O}]^+$), 116 (13 %, $[\text{CH}_3\text{COOtBu}]^+$), 57 (100 %, $[\text{tBu}]^+$)

7-(p-(1-(O-(p-Toluensulfonyl)hydroxyimino)-2,2,2-trifluorethyl)phenyl)heptansäure-tert.-butylester (6)

In einer Lösung von 8,6 g (23,1 mmol) Oxim (**5**) und 6,6 g (34,5 mmol) p-Toluensulfonylchlorid in 250 ml Aceton wurden 12,8 g (92,4 mmol) Kaliumcarbonat suspendiert. Die Mischung wurde stark gerührt und 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wurde abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel 63-200 μm mit n-Hexan/Dichlormethan 2:3 (v/v) als mobile Phase gereinigt. R_f 0,2 (Produkt); R_f 0,1 (Oxim); R_f 0,6 (p-Toluensulfonylchlorid).

Ausbeute: 10,8 g (20,5 mmol) = 89 % (farbloses Öl)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): Bemerkung: Die NMR-Spektren zeigten wie bereits bei den zuvor synthetisierten C₃- und C₅-Photosonden (*Hörnschemeyer, 1997*) zwei Isomere des Produktes (Tosylgruppe cis/trans zum Benzen-Ring), welche in der nachfolgenden Reaktion beide zum Diaziridin umgesetzt wurden. Die entsprechenden Signale sind in Klammern zusammen angegeben.

δ = 1.33 (m, 4 H, H-4, H-5), [1.41, 1.42 (s, 9 H, tBu)], 1.58 (m, 4 H, H-3, H-6), [2.17, 2.18 (t, 2 H, H-2, J_{HH} 7.4 Hz)], [2.43, 2.44 (s, 3 H, Tos CH_3)], 2.61 (m, 2 H, H-7), {[7.19 (d, 1 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 7.24 (d, 1 H, J_{HH} 8.6 Hz, Bz)], 7.34 (m, 2 H, TosCH), [7.86 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, TosCH), 7.88 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, TosCH)]

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = [21.70, 21.72 (1 C, TosCH₃)], [24.90, 24.92 (1 C, C-3)], 28.06 (3 C, tBu-CH₃), 28.80, (1 C, C-4), 28.90 (1 C, C-5), [30.78, 30.82 (1 C, C-6)], [35.44, 35.47 (1 C, C-2)], [35.67, 35.78 (1 C, C-7)], 79.92 (1 C, tBu-C_q), [119.67 (q, 1C, $^1J_{\text{CF}}$ 277.7 Hz, CF₃), 120.19 (q, 1C, $^1J_{\text{CF}}$ 283.8 Hz, CF₃)], [121.77, 125.02 (1 C, C-Bz₄)], [128.48 (2 C, CH-Bz)], [128.73, 128.75 (1 C, CH-Bz)], [128.79, 128.81 (1 C, CH-Bz)], [129.07, 129.22 (2 C, CH-Bz)], [129.81 (2 C, CH-Bz)], [131.21, 131.49 (1 C, Tos-C₄)], [145.88, 146.03 (1 C, Tos-C₁)], [147.01, 147.19 (1 C, Bz₁)], [153.88 (q, $^2J_{\text{CF}}$ 32.8 Hz, C=N), 153.98 (q, 1 C, $^2J_{\text{CF}}$ 32.0 Hz, C=N)], 173.15 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{NO}_4\text{S}$ ($[\text{M-OtBu}]^+$): 454.1305
 Gefunden 454.1300 (15 %)
 Berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{NO}_5\text{S}$ ($[\text{M}]^+$): 527.1953 (ex.), 527.59 (av.)

471 (1 %, $[\text{M-tBu+H}]^+$), 356 (5 %, $[\text{F}_3\text{CCNOTosPhCH}_3]^+$), 300 (30 %, $[\text{M+H-OtBu-Tos}]^+$), 299 (41 %), 282 (20 %), 254 (9 %), 226 (10 %), 200 (25 %), 187 (20 %), 155 (80 %, $[\text{Tos}]^+$), 130 (10 %), 116 (14 %), 91 (80 %, $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$), 57 (100 %, $[\text{tBu}]^+$)

7-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziridinyl)phenyl)heptansäure-tert.-butylester (7)

In 5 druckfesten 25 ml Pyrex-Gläschen wurden 10,8 g (20,5 mmol) des Toluensulfonyloxims (**6**) in 50 ml absolutiertem Diethylether anteilig gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurden 10 ml (~5 g) Ammoniak (2 ml pro Glas) einkondensiert. Die Mischung wurde langsam auf Raumtemperatur gebracht und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde erneut eingefroren und der überschüssige Ammoniak wurde vorsichtig abgedampft. Das ausgefallene p-Toluensulfonamid wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, zweimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Abschließend wurde das Lösungsmittel im geringen Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte auf Kieselgel 40-63 μm in Chloroform/Essigsäureethylester 9:1 (v/v), R_f (Produkt) 0,56, R_f (Edukt) 0,82.

Ausbeute: 6,2 g (16,6 mmol) = 81 % (farbloses Öl).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.30 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.39 (s, 9 H, tBu), 1.55 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.15 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.5 Hz, H-2), 2.31 (d, 1 H, J_{HH} 8.6 Hz, NH), 2.58 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 2.75 (d, 1 H, J_{HH} 8.6 Hz, NH), 7.17 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 7.46 (d, 2 H, J_{HH} 8.1 Hz, Bz)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.85 (1 C, C-3), 27.96 (3 C, tBu-CH₃), 28.75 (2 C, C-4,5), 30.94 (1 C, C-6), 35.37 (1 C, C-2), 35.49 (1 C, C-7), 57.74 (q, $^2J_{\text{CF}}$ 35.9 Hz, Diaziridin-C), 79.81 (1 C, tBu-C_q), 123.52 (q, 1C, $^1J_{\text{CF}}$ 278.5 Hz, CF₃), 127.91 (2 C, CH-Bz), 128.61 (2 C, CH-Bz), 128.91 (1 C, C-Bz₄), 144.85 (1 C, C-Bz₁), 173.06 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für $C_{15}H_{19}F_3N_2O_2$ ($[M-OtBu]^+$): 316.1399
Gefunden 316.1407 (16 %)
Berechnet für $C_{19}H_{27}F_3N_2O_2$ ($[M]^+$): 372.2025 (ex.), 372.43 (av.)

372 (1 %, $[M]^+$), 357 (10 %, $[M-CH_3]^+$), 316 (14 %, $[M-tBu+H]^+$), 299 (25 %, $[M-OtBu]^+$), 215 (13 %), 201 (22 %), 187 (10 %), 57 (100 %, $[tBu]^+$)

7-(p-(3-(Trifluormethyl)diaziriny)phenyl)heptansäure-tert.-butylester (8)

Zu einer siedenden Lösung von 8,5 g (50 mmol) Silbernitrat in 50 ml Wasser wurden 2,0 g (50 mmol) Natriumhydroxid in 80 ml Wasser gegeben. Das ausgefallene Silberoxid wurde abfiltriert, nacheinander mit Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen, getrocknet und sofort weiter verwendet.

Unter Lichtausschluss wurde eine Lösung von 2,0 g (5,4 mmol) Diaziridin (**7**) in 50 ml Diethylether 3 Stunden bei Raumtemperatur mit 6,8 g (50 mmol) suspendiertem Silberoxid oxidiert. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert, zweimal mit Ether gewaschen und die vereinigten Etherphasen anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Ein DC zeigte ein einziges Produkt, welches ohne weitere Reinigung verwendet wurde. R_f 0,65 (Chloroform).

Ausbeute: 1,95 g (5,27 mmol) = 98 % (hellgelbes Öl)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.42 (s, 9 H, tBu), 1.57 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.17 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.4 Hz, H-2), 2.58 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 7.07 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 7.17 (d, 2 H, J_{HH} 8.1 Hz, Bz)

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.92 (1 C, C-3), 28.05 (3 C, tBu- CH_3), 28.33 (q, $^2J_{CF}$ 40.4 Hz, Diazirin-C), 28.80 (1 C, C-4), 28.82 (1 C, C-5), 30.96 (1 C, C-6), 35.46 (2 C, C-2, C-7), 79.90 (1 C, tBu- C_q), 122.19 (q, 1C, $^1J_{CF}$ 274.7 Hz, CF_3), 126.36 (1 C, C-Bz₄), 126.36 (2 C, CH-Bz), 128.83 (2 C, CH-Bz), 144.57 (1 C, C-Bz₁), 173.14 (1 C, COOR)

HRMS : Berechnet für $C_{15}H_{16}F_3N_2O_1$ ($[M-OtBu]^+$): 297.1215
Gefunden 297.1219 (8 %)
Berechnet für $C_{19}H_{25}F_3N_2O_2$ ($[M]^+$): 370.1868 (ex.), 370.41 (av.)

370 (0.1 %, $[M]^+$), 357 (1 %, $[M-CH_3]^+$), 316 (1 %), 297 (15 %, $[M-OtBu]^+$), 188 (24 %), 172 (25 %), 151 (11 %), 57 (100 %, $[tBu]^+$)

7-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyl)phenyl)heptansäure (9)

1,9 g (5,2 mmol) Diazirin (**8**) wurden in 8 ml Dichlormethan gelöst. Dann wurden 4 ml Trifluoressigsäure zugesetzt und 2 Stunden bei 20°C gerührt. DC-Analyse zeigte ein einziges Produkt (R_f 0,23, Chloroform). Das Lösungsmittel und der größte Teil Trifluoressigsäure wurden unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,62 g (5,15 mmol) = 99 % (farblose Kristalle)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.33 (m, 4 H, H-4, H-5), 1.60 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.33 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.4 Hz, H-2), 2.59 (t, 2 H, $J_{6,7}$ 7.7 Hz, H-7), 7.08 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 7.18 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz), 10.8-11.2 (b, 1 H, OH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.49 (1 C, C-3), 28.36 (q, $^2J_{\text{CF}}$ 39.7 Hz, Diazirin-C), 28.75 (1 C, C-4), 28.78 (1 C, C-5), 30.92 (1 C, C-6), 33.98 (1 C, C-2), 35.46 (1 C, C-7), 122.20 (q, 1C, $^1J_{\text{CF}}$ 274.7 Hz, CF_3), 126.40 (1 C, C-Bz₄), 126.40 (2 C, CH-Bz), 128.84 (2 C, CH-Bz), 144.49 (1 C, C-Bz₁), 180.37 (1 C, COOH)

HRMS : Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}]^+$): 314.1242 (ex.), 314.30 (av.)
Gefunden 314.1235 (1 %)

297 (2 %, $[\text{M-OH}]^+$), 286 (11 %, $[\text{M-N}_2]^+$), 266 (8 %), 188 (58 %), 172 (100 %), 151 (19 %), 122 (10 %), 104 (8 %), 91 (8 %, $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$)

7-(p-(3-(Trifluormethyl)diazirinyl)phenyl)heptansäure-N-succinimidylester (10)

In einer Lösung von 1,6 g (5,1 mmol) Säure (**9**) und 0,62 g (5,4 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 50 ml Diethylether wurden 1,14 g (5,5 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, der Ether am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 15-40 μm mit Dichlormethan/Diethylether 10:1 (v/v) als Eluent gereinigt. R_f 0,59 (Produkt); R_f 0,11 (Edukt).

Ausbeute: 1,74 g (4,23 mmol) = 83 % (farbloser Feststoff)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.32 (m, 2 H, H-5), 1.40 (m, 2 H, H-4), 1.58 (dt, 2 H, J_{HH} 7.4 Hz, J_{HH} 15.1 Hz, H-6), 1.71 (dt, 2 H, J_{HH} 7.7 Hz, J_{HH} 15.0 Hz, H-3), 2.57 (t, 2 H, J_{HH} 7.4 Hz, H-2), 2.59 (t, 2 H, J_{HH} 7.7 Hz, H-7), 2.75 (s, 4 H, Succ- CH_2), 7.07 (d, 2 H, J_{HH} 8.1 Hz, Bz_{2,6}), 7.17 (d, 2 H, J_{HH} 8.6 Hz, Bz_{3,5})

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 24.39 (1 C, C-3), 25.52 (2 C, Succ- CH_2), 28.36 (q, 1 C, $^2\text{J}_{\text{CF}}$ 40.4 Hz, Diazirin-C), 28.43 (1C, C-4), 28.51 (1C, C-5), 30.78 (1C, C-6), 30.81 (1C, C-2), 35.32 (1 C, C-7), 122.16 (q, 1 C, $^1\text{J}_{\text{CF}}$ 274.7 Hz, CF_3), 126.33 (1 C, C-Bz₄), 126.35 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 128.82 (2 C, CH-Bz_{3,5}), 144.40 (1 C, C-Bz₁), 168.56 (1 C, COOR), 169.15 (2 C, Succ-CO)

HRMS : Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_1$ ($[\text{M-OSucc}]^+$): 297.1215
Gefunden 297.1221 (8 %)
Berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$ ($[\text{M}]^+$): 411.1406 (ex.), 411.38 (av.)

411 (2 %, $[\text{M}]^+$), 383 (4 %, $[\text{M-N}_2]^+$), 297 (100 %, $[\text{M-OSucc}]^+$), 286 (10 %), 272 (10 %), 269 (8 %, $[\text{M-COOSucc}]^+$), 249 (14 %), 201 (14 %), 199 (18 %), 197 (12 %), 187 (23 %), 185 (63 %), 172 (24 %), 171 (50 %), 159 (21 %), 151 (58 %), 115 (19 %, $[\text{SuccOH}]^+$), 102 (14 %), 82 (54 %), 55 (25 %)

5.1.3.2 Synthese der photoaktivierbaren Sphingolipide

S-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2R,3R,4E)-3-hydroxy-2-[N-(p-(3-trifluormethyl) diazirinyl)-phenylheptanamido]-4-octadecen-1-thiol (C₇-Glc-S-Cer-Photosonde) (11)

Unter Lichtausschluss wurden zu einer Lösung von 15 mg (31,5 μmol) S-β-D-glucopyranosyl-(1→1)-(2R,3R,4E)-2-amino-3-hydroxy-4-octadecen-1-thiol (Lyso-Glc-S-Cer) und 25,9 mg (63 μmol) C₇-TPD-Succinimidylester (**10**) in 300 μl DMF 20 μl Hünig-Base gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Argonstrom entfernt, der Rückstand eine Stunde im Hochvakuum getrocknet, anschließend in 1,5 ml Methanol/Wasser 90:10 (v/v) aufgenommen und mittels RP-HPLC (Säule ProSep C-18, 250x20 mm) im gleichen Laufmittel gereinigt. R_f (Chloroform/ Methanol/2,5 M Ammoniak, 65:25:4; v/v/v) = 0,68.

Ausbeute: 16,2 mg (20,9 μmol) = 66 %

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOD 1:1): Glucose-Einheit δ = 3.26 (dd, 1 H, J_{2,3} 8.6 Hz, J_{1,2} 9.6 Hz, H-2), 3.26 (m, 1 H, H-5), 3.31 (m, 1 H, H-4), 3.38 (dd, 1 H, J_{2,3} 8.6 Hz, J_{3,4} 8.6 Hz, H-3), 3.66 (dd, 1 H, J_{5,6b} 5.4 Hz, J_{6a,6b} 12.0 Hz, H-6b), 3.88 (dd, 1 H, J_{5,6a} 2.3 Hz, J_{6a,6b} 12.0 Hz, H-6a), 4.36 (d, 1 H, J_{1,2} 9.6 Hz, H-1); Sphingosin-Einheit δ = 0.88 (t, 3 H, J_{17,18} 7.0 Hz, H-18), 1.20-1.27 (m, 20 H, 10 CH₂), 1.31 (m, 2 H, H-7), 2.02 (m, 2 H, H-6), 2.73 (dd, 1 H, J_{1a,2} 8.5 Hz, J_{1a,1b} 14.0 Hz, H-1a), 3.12 (dd, 1 H, J_{1b,2} 3.7 Hz, J_{1a,1b} 14.0 Hz, H-1b), 4.03 (ddd, 1 H, J_{1b,2} 3.7 Hz, J_{2,3} 6.6 Hz, J_{1a,2} 8.5 Hz, H-2), 4.09 (dd, 1 H, J_{2,3} 6.6 Hz, J_{3,4} 7.0 Hz, H-3), 5.43 (dd, 1 H, J_{3,4} 7.0 Hz, J_{4,5} 15.3 Hz, H-4), 5.70 (dt, 1 H, J_{5,6} 6.5 Hz, J_{4,5} 15.3 Hz, H-5); Photosonden-Einheit δ = 1.25 (m, 2 H), 1.35 (m, 2 H), 1.60 (m, 4 H, H-3, H-6), 2.19 (m, 2 H, H-7), 2.63 (m, 2 H, H-2), 7.09 (d, 2 H, J_{HH} 8.0 Hz, Bz_{3,5}), 7.24 (d, 2 H, J_{HH} 8.2 Hz, Bz_{2,6})

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃/MeOD 1:1): Glucose-Einheit δ = 62.46 (1 C, C-6), 70.83 (1 C, C-4), 73.62 (1 C, C-2), 78.99 (1 C, C-3), 81.45 (1 C, C-5), 86.67 (1 C, C-1); Sphingosin-Einheit δ = 14.36 (1 C, C-18), 23.32 (1 C, C-17), 29-32 (10 C, CH₂), 31.54 (1 C, C-1), 33.08 (1 C, C-6), 54.55 (1 C, C-2), 74.33 (1 C, C-3), 129.91 (1 C, C-4), 134.91 (1 C, C-5); Photosonden-Einheit δ = 26.51 (1 C), 28.97 (q, 1 C, ²J_{CF} 40.1 Hz, Diazirin-C), 29.64 (1 C), 31.78 (1 C), 32.61 (1 C), 36.13 (1 C), 36.95 (1 C), 123.06 (q, 1 C, ¹J_{CF} 274.3 Hz, CF₃), 126.92 (1 C, C-Bz₄), 127.02 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 129.66 (2 C, CH-Bz_{3,5}), 145.58 (1 C, C-Bz₁), 175.78 (1 C, CONH)

FAB-MS (C₃₉H₆₂F₃N₃O₇S; M_W: 773.99 (av.), 773.4261 (ex.)): 774 [M+H]⁺, 796 [M+Na]⁺, 882 [M+Matrix]⁺, 756 [M-H₂O+H]⁺, 594 [M+H-Glc-H₂O]⁺

Radioaktiv-markierte Sonde: Nach der Vorschrift in *Albrecht et al. (1995)* wurde [¹⁴C]-Lyso-Glc-S-Cer aus [¹⁴C]-Glucose mit einer spezifischen Radioaktivität von 245 Ci/mol (9,1 TBq/mol) hergestellt. Davon wurden gemäß der obigen Vorschrift 612 nmol (150 µCi) Lyso-Verbindung mit 1,22 µmol (504 µg) des C7-Succinimidylesters (**10**) in 80 µl DMF mit 20 µl Hünig-Base umgesetzt. Da nach HPLC-Reinigung noch kein ausreichend reines Produkt erhalten wurde, wurde anschließend noch über DC-Platte gereinigt. Dieses ergab 240 nmol (58,8 µCi) der [¹⁴C]-C7-TPD-Glucosyl-thio-ceramid-Sonde entsprechend 39,2 %.

(D-erythro)-Sphinganin-phosphorylcholin („Dihydro-Lyso-Sphingomyelin“) (12)

8,0 mg (17,2 µmol) (D-erythro)-Sphingosin-phosphorylcholin (Lyso-Sphingomyelin) wurden in 300 µl THF/Wasser 1:1 (v/v), welches keinen gelösten Sauerstoff enthielt, gelöst und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde mit 210 µl 50 mM Palladiumacetat-Lösung in THF (die Hälfte der stöchiometrischen Menge der Lyso-Verbindung) überschichtet und erneut eingefroren. Dazu wurden 11,5 µl (200 µmol) Eisessig und hiernach 1,33 mg (35 µmol) Natriumborhydrid in 100 µl 1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung gegeben. Die Mischung wurde in der Kälte erstarren lassen und das Gefäß unter Argon-Schutzgasatmosphäre fest verschlossen. Die Reaktionsmischung wurde langsam bei Raumtemperatur aufgetaut und auf einem Schüttler über Nacht geschüttelt. Eine DC-Kontrolle (Laufmittel Chloroform/Methanol/2 M NH₃ 60:40:9) zeigte eine vollständige Umsetzung : R_f(Edukt 0,18), R_f(Produkt) 0,16. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser verdünnt, auf eine RP-18-Säule mit 3 ml Bettvolumen gegeben und mit 50 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde das gewünschte lipophile (D-erythro)-Sphinganin-phosphorylcholin mit 30 ml Methanol sowie mit 10 ml Methanol, welches 250 µl konz. Ammoniak enthielt, von der Säule eluiert. Die Lösung wurde im Stickstoffstrom eingeeengt und anschließend aus einer Benzen-Suspension „gefrieretrocknet“.

Ausbeute: 7,7 mg (16,6 µmol) = 97 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOD 1:1): Cholin-Einheit δ = 3.13 (s, 9 H, N(CH₃)₃), 3.54 (m, 2 H, CH₂-N), 3.85 (m, 2 H, CH₂-O); Sphingosin-Einheit δ = 0.79 (t, 3 H, J_{17,18} 6.9 Hz, H-18), 1.17-1.32 (m, 26 H, 13 CH₂), 1.45 (m, 2 H, H-4), 4.12 (m, 1 H, H-2), 4.18 (m, 2H, H-1)

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): Cholin-Einheit δ = 55.06, 55.09, 55.13 (3 C, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 60.50 (1 C, C-N), 67.68 (1 C, C-O); Sphingosin-Einheit δ = 14.98 (1 C, C-18), 23.94 (1 C, C-17), 30.64 (1 C, CH_2), 31-32 (12 C, CH_2), 33.24 (1 C, CH_2), 40.18 (1 C, CH)

MALDI-TOF-MS ($\text{C}_{23}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$; M_w : 466.64 (av.), 466.3536 (ex.)): 467.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 933.6 $[2\text{M}+\text{H}]^+$

Lyso- $[\text{}^3\text{H}]$ -Sphingomyelin: 5,2 mg Sphingosin-phosphorylcholin wurden in 300 μl THF/Wasser 1:1 (v/v), welches keinen gelösten Sauerstoff enthielt, gelöst und mit 100 μl 50 mM Palladiumacetat-Lösung in THF, 11,5 μl (200 μmol) Eisessig und einer Lösung von ca. 80 μCi $\text{NaB}[\text{}^3\text{H}]_4$ in 1 M NaOH (6000 Ci/mol) nach obiger Vorschrift umgesetzt. Zur Vervollständigung der Hydrierung wurden anschließend einige mg NaBH_4 und 150 μl der Palladiumacetat-Lösung hinzugefügt und erneut über Nacht geschüttelt. Nach Reinigung über Umkehrphasenchromatographie wurden ca. 20 μCi der tritiierten Verbindung mit einer spezifischen Radioaktivität von 1000 Ci/mol erhalten. Die DC-Kontrolle (Laufmittel Chloroform/Methanol/2 M NH_3 60:40:9) zeigte eine vollständige Umsetzung.

C3-SM-Photosonde (13)

In einem kleinen Reaktivial wurden 4,5 mg (9,7 μmol) Dihydro-Lyso-SM (**12**) in 40 μl DMF, 10 μl Methanol und 10 μl Hünig-Base gelöst, im Stickstoffstrom eingeeengt, um flüchtige Amine abzutrennen und anschließend erneut mit gleicher Mischung aufgenommen. Dazu wurden 8,6 mg (24,3 μmol) C3-TPD-Succinimidylester (2,5-facher Überschuss) (aus *Hörnschemeyer, 1997*) in 30 μl DMF hinzugefügt. Nach zwei Tagen bei RT in Dunkelheit wurde zur Trockne eingedampft und das Produkt über RP-HPLC (Säule ProSep C-18, 250x20 mm) mit einem Gradienten von MeOH/Wasser 90:10 (v/v) nach MeOH gereinigt. R_f (Chloroform/Methanol/Wasser 60:40:9; v/v/v) = 0,55.

Ausbeute: 3,7 mg (5,3 μmol) = 55 %

^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): Cholin-Einheit δ = 3.18 (s, 9 H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.57 (t, 2 H, J_{HH} 4.6 Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.80 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$); Sphingosin-Einheit δ = 0.85 (t, 3 H, $J_{17,18}$ 6.9 Hz, H-18), 1.22-1.37 (m, 26 H, 13 CH_2), 1.45 (m, 2 H, H-4), 3.52 (m, 1 H, H-3), 4.13 (m, 1 H, H-2), 4.20 (m, 2 H, H-1); Photosonden-Einheit δ = 2.51 (t, 2 H, $J_{2,3}$ 7.7 Hz, H-2), 2.93 (m, 2 H, H-3), 7.08 (d, 2 H, J_{HH} 7.9 Hz, $\text{Bz}_{3,5}$), 7.28 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, $\text{Bz}_{2,6}$)

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): Cholin-Einheit δ = 54.46, 54.49, 54.52 (3 C, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 59.81 (1 C, C-O), 65.41 (1 C, C-N); Sphingosin-Einheit δ = 14.35 (1 C, C-18), 23.31 (1 C, C-17), 26-33 (13 C, CH_2), 54.14 (1 C, C-2), 70.17 (1 C, C-3); Photosonden-Einheit δ = 34.09 (1 C, C-3), 37.95 (1 C, C-2), 122.23 (q, 1 C, $^1J_{\text{CF}}$ 274.7 Hz, CF_3), 127.18 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 127.50 (1 C, C-Bz₄), 129.69 (2 C, CH-Bz_{3,5}), 143.85 (1 C, C-Bz₁), 173.83 (1 C, CONH)

FAB-MS ($\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6\text{P}$; M_{W} : 706.82 (av.), 706.4046 (ex.)): 707.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 729.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 753.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 679.4 $[\text{M}-\text{N}_2+\text{H}]^+$, 184.1 $[\text{Phosphorylcholin}+\text{H}]^+$

Radioaktiv-markierte C3-SM-Sonde: 580 μg (1,24 μmol) $[\text{^3H}]$ -Lyso-Sphingomyelin wurden in 10 μl Methanol, 70 μl DMF und 10 μl Hünig-Base gelöst und im Argonstrom eingedampft, um flüchtige Amine abzutrennen. Anschließend wurde der Rückstand erneut in 10 μl Methanol, 30 μl DMF und 10 μl Hünig-Base gelöst und mit 1,8 mg (5 μmol) C3-Photosuccimidylester in 30 μl DMF versetzt. Nach 65 h unter Lichtausschluss wurde im Argonstrom eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Die Reinigung der C3-SM-Sonde erfolgte über DC (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 60:40:9; v/v/v).

Ausbeute: 630 μg (0,89 μmol) C3- $[\text{^3H}]$ -SM-Sonde (890 μCi bei 1000 Ci/mol) = 72 %.

C5-SM-Photosonde (14)

Entsprechend der Vorschrift zur C3-SM-Sonde (**13**) wurde die Reaktion mit 4,5 mg (9,7 μmol) Dihydro-Lyso-SM (**12**) in 10 μl Methanol, 10 μl Hünig-Base und 9,3 mg (24,3 μmol) C5-TPD-Succinimidylester (aus *Hörnschemeyer, 1997*) (2,5-facher Überschuss) in 50 μl DMF durchgeführt. Die Reinigung der C5-SM-Sonde erfolgte über RP-HPLC (Säule ProSep C-18, 250x20 mm) mit einem Gradienten von MeOH/Wasser 85:15 (v/v) nach MeOH. R_f (Chloroform/Methanol/Wasser 60:40:9; v/v/v) = 0,58.

Ausbeute: 2,3 mg (3,4 μmol) = 35 %

^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): Cholin-Einheit δ = 3.21 (s, 9 H, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 3.57 (t, 2 H, J_{HH} 4.8 Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.83 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O}$); Sphingosin-Einheit δ = 0.85 (t, 3 H, $J_{17,18}$ 6.9 Hz, H-18), 1.21-1.40 (m, 26 H, 13 CH_2), 1.50 (m, 2 H, H-4), 3.59 (m, 1 H, H-3), 4.15 (m, 1 H, H-2), 4.21 (m, 2 H, H-1); Photosonden-Einheit δ = 1.63 (m, 2 H, H-3, H-4), 2.22 (m, 2 H, H-5), 2.64 (t, 2 H, J_{23} 7.2 Hz, H-2), 7.08 (d, 2 H, J_{HH} 8.0 Hz, Bz_{3,5}), 7.22 (d, 2 H, J_{HH} 8.4 Hz, Bz_{2,6})

^{13}C -NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): Cholin-Einheit δ = 54.45, 54.48, 54.51 (3 C, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$), 59.76 (1 C, C-O); Sphingosin-Einheit δ = 14.33 (1 C, C-18), 23.27 (1 C, C-17), 26-33 (13 C, CH_2), 54.97 (1 C, C-2), 70.26 (1 C, C-3); Photosonden-Einheit δ = 34.20 (1 C), 35.82 (1 C), 36.59 (1 C), 127.06 (2 C, CH-Bz_{2,6}), 129.64 (2 C, CH-Bz_{3,5}), 175.00 (1 C, CONH)

FAB-MS ($\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_6\text{P}$; M_w : 734.88 (av.), 734.4359(ex.)): 735.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 536.1 $[\text{M}-\text{Phosphorylcholin}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$

Radioaktiv-markierte C5-SM-Sonde: Zur Synthese der radioaktiv-markierten C5-SM-Verbindung wurden 610 μg (1,3 μmol) ^3H -Lyso-Sphingomyelin in 10 μl Methanol und 10 μl Hünig-Base mit 1,9 mg (5 μmol) C5-Photosuccimidylester in 60 μl DMF umgesetzt. Die Reinigung der Sonde erfolgte über DC (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 60:40:9; v/v/v).

Ausbeute: 530 μg (0,72 μmol) C5- ^3H -SM-Sonde (720 μCi bei 1000 Ci/mol) = 55 %.

5.1.4 *Biologische Materialien*

5.1.4.1 *Verwendete Zellkulturen*

Menschliche Hautfibroblasten aus Vorhaut-Biopsien (F 91/19, F 91/20 oder F 91/21 (Nomenklatur in unseren Zellkultur-Unterlagen)); Niemann-Pick Typ C-Zellen (Fibroblasten; 99/5, 99/6, 99/7 (Nomenklatur in unseren Zellkultur-Unterlagen)); Prof. Cantz, Uniklinikum Heidelberg) und menschliche Melanoma-Zellen A431 (Hautkliniken der Universität Bonn) wurden in DMEM mit 10 % (v/v) hitzebehandeltem (30 min bei 56°C) FKS in einer 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre bei 37°C bis zur Konfluenz nach *Weitz et al. (1983)* angezogen. Für Metabolismusstudien wurden 2,2 x 10⁵ Fibroblasten in 8 cm² Kulturschalen bzw. für Insertionsstudien 6 x 10⁵ Fibroblasten in 21 cm² Schalen ausgesät und 1-2 Tage bis zur Konfluenz herangezüchtet.

5.1.4.2 *Zellkulturmedien und Puffer*

DMEM mit 10 % FKS : In einem Liter dieses Mediums wurden folgende Substanzen gelöst : 13,42 g Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) der *Fa. GibcoBRL-Life Technologies* (Paisley, Großbritannien) und 3,6 g NaHCO₃. Zusätzlich wurden dem Medium 2 ml wässrige Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 0,1 mg/ml) von *Biochrom KG* (Berlin, Deutschland) zum Schutz gegen biologische Kontaminationen zugesetzt. Die Lösung (pH 7,5-7,6) wurde unter vermindertem Druck steril filtriert (Porengröße 0,22 µm) und 100 ml fötales Kälberserum (FKS) der *Fa. Cytogen* (Berlin, Deutschland) sowie 3,8 ml Tylosin-Lösung (*Serva*, Heidelberg, Deutschland) und entweder 10 mg Tiamulin oder 7,5 mg Minocyclin (beides *Sigma*, Deisenhofen, Deutschland) zugeben.

HMEM : Für einen Liter der 10fach-konzentrierten Stocklösung wurden benötigt: 4 g KCl, 80 g NaCl, 10 g Glucose, 32,84 g HEPES (*Calbiochem*, LaJolla, CA, USA), 2,92 g L-Glutamin, 0,6 g KH₂PO₄, 0,26 g Na₂HPO₄, 200 ml Minimum Essential Medium (MEM)-Aminosäuren, 100 ml MEM-Vitamine (beides *Gibco*, Eggenstein, Deutschland). Mit reinstem Wasser wurde auf 950 ml aufgefüllt, mit 10 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. Nach Sterilfiltration wurden jeweils Portionen von 50 ml bei 4°C eingelagert. Für die gebrauchsfertige 1fach-Lösung wurden 50 ml der 10fach Stocklösung mit 440 ml reinstem Wasser, 5 ml einer MgSO₄-Lösung (20 g/l) sowie 5 ml einer CaCl₂-Lösung (14 g/l) vereinigt, steril filtriert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

PBS : 150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4. Für 1 l der 10-fach konzentrierten Stammlösung wurden 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄ und 1,145 g Na₂HPO₄ vereinigt und mit reinstem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Mit 10 N NaOH

wurde auf pH 7,4 eingestellt. Für die gebrauchsfertige 1-fach Lösung wurde mit reinstem Wasser auf 1/10 (v/v) verdünnt.

TNE : 25 mM Tris-HCl, 150 μ M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,5. Für 1 l der Lösung wurden vereinigt : 3,02 g Tris-HCl , 8,76 g NaCl und 0,186 g EDTA-Dinatriumsalz werden mit reinstem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit konz. HCl auf pH 7,5 eingestellt. Im Falle des Lysis-Puffers enthielt der Puffer zusätzlich 1 % Triton-X-100 (v/v).

5.2 Methoden

5.2.1 Analytische Methoden

5.2.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Reaktionskontrolle und die Kontrolle des säulenchromatographischen Elutionsprofils erfolgte routinemäßig mit Dünnschichtchromatographieplatten (*Merck*, Darmstadt, Deutschland) in DC-Kammern (*Camag*, Muttenz, Schweiz) mit Kammersättigung. Die R_f -Werte der Syntheseprodukte der Glucosyl-thio-ceramide und Sphingomyeline wurden von 20 cm-hohen Glas-DC-Platten ermittelt; die Laufstrecke betrug hierbei 16 cm. Die photoaktivierbaren Fettsäuren wurden auf 10 cm-hohen Aluminium-DC-Platten mit Fluoreszenzindikator F_{254} aufgetragen; die Laufstrecke betrug in diesem Fällen 8 cm.

Photokopplungsprodukte wurden auf 10x10 cm HPTLC-Platten (*Merck*) in einer Horizontalentwicklungskammer (*Camag*) mit Kammersättigung chromatographiert. Dabei diente bei eindimensionaler Entwicklung Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v) als mobile Phase (bzw. Chloroform/Methanol/15 mM CaCl_2 60:35:8 (v/v/v) bei Stoffwechseluntersuchungen).

Bei zweidimensionaler Entwicklung wurde in der ersten Dimension das Laufmittelgemisch Methylacetat/Propan-2-ol/Chloroform/Methanol/0,25 M KCl 25:25:25:10:9 (v/v/v/v/v) verwendet, die Platte im Exsikkator über Nacht zwischengetrocknet und anschließend nach Drehung um 90° im Uhrzeigersinn in der zweiten Dimension mit Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 (v/v/v) als mobile Phase entwickelt.

Detektion von Substanzen auf der DC-Platte

Zur Detektion dienten folgende Methoden :

1. *UV-Licht-Löschung bei 254 nm* (für Substanzen mit Phenyl-Ring im Molekül auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator F_{254})
2. Sprühreagenzien :

Molybdato-phosphorsäure-Tauchbad (*Brenner-Weiß et al. 1992*): Zusammensetzung: 25 g Molybdato-phosphorsäure, 10 g Cer-IV-sulfat, 60 ml Schwefelsäure und 940 ml Wasser. Die DC-Platten wurden durch Tauchen genässt und anschließend wurden die Substanzbanden durch kurzzeitiges Erwärmen auf 150°C sichtbar gemacht.

Nachweis primärer Amine mittels *Ninhydrin-Reagenz*: Durch kurzes Erwärmen der mit einer 0,2 %igen (w/v) Ninhydrin-Lösung in Ethanol befeuchteten DC-Platte wurden die Substanzen sichtbar gemacht.

Kupfersulfat-Färbung: Die Banden wurden durch Besprühen der Platten mit einer Lösung (8 g 85 %ige Phosphorsäure, 10 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ auf 100 ml mit Wasser

aufgefüllt) und anschließender Trocknung im Wärmeschrank (10 min bei 180°C), sichtbar gemacht.

- Radioaktive Produkte wurden durch Radioscanning mittels des Fuji BAS 1000 Imaging Analyzer sichtbar gemacht (*Fuji Photo Film Co.*, Tokyo, Japan).

5.2.1.2 Quantifizierung der Radioaktivität

Die Radioaktivitätsmenge wurde mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers Tri-Carb 1900 GA (*Canberra Packard*, Frankfurt, Deutschland) bestimmt. Als Szintillationsflüssigkeit diente dabei Ultima Gold (*Canberra Packard*).

5.2.1.3 NMR-Spektroskopie (Nuclear magnetic resonance)

400 und 500 MHz ^1H -NMR- sowie 100 bzw. 125 MHz ^{13}C -NMR-Messungen wurden mit den Spektrometern AMX 400 bzw. AMX 500 der Fa. *Bruker* (Karlsruhe, Deutschland) in den Zentralanalytischen Abteilungen des Chemischen Institutes (AMX 400) und des Physiologisch-Chemischen Institutes (AMX 500) der Universität Bonn durchgeführt. Die Verschiebung δ (angegeben in ppm), der im jeweils angegebenen Lösungsmittel (Chloroform- d_1 bzw. Methanol- d_6) gelösten Substanzen, wurde relativ gegen das Signal der Protonen von Tetramethylsilan (TMS) angegeben. TMS wurde nicht zugegeben, sondern die Skala auf das bekannte Signal des zugegebenen Lösungsmittels (Chloroform- d_1 7.24 ppm, sowie bei Methanol- d_6 oder Mischungen 3.35 ppm) eingestellt. Mehrfachaufspaltungen werden in der Reihenfolge zunehmender Kopplungskonstanten angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s - Singulett, d - Duplett, t - Triplet und m - Multiplett, b - breit. Die Verschiebungen und Kopplungskonstanten wurden in dieser Arbeit aufgrund der besseren Übersichtlichkeit der Zahlenreihen und gemäß internationaler Standards mit Punkt als Dezimaltrennzeichen angegeben.

5.2.1.4 Massenspektrometrie (MS)

Electron impact-MS (EI-MS): High Resolution Mass Spectrometry (HRMS): Die Spektren wurden mit MS 30 und MS 50-Instrumenten (*AEI*, Manchester, UK) mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV unter Direkteinlass aufgenommen. Bei den analytischen Daten der Syntheseprodukte (5.1.3.1) wurde jeweils die Peakintensität relativ zum Basispeak in Prozent angegeben (Basispeak = 100 %). Außerdem wurden in dieser Arbeit zur besseren Übersichtlichkeit der Zahlenreihen die Molekül- und Fragmentmassen mit Punkt als Dezimaltrennzeichen angegeben.

Fast atom bombardment-MS (FAB-MS): Die Spektren wurden entweder im positiven oder im negativen Ionenmodus auf einem ZAB HF-Instrument (*VG Analytical*, Manchester, Großbritannien) im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Bonn aufgenommen. Das Gerät war mit einer "fast atom gun", wie beschrieben (*Egge und Peter-Katalinic 1987*), ausgestattet. Hierfür wurden die Substanzen vorher in eine Matrix (m-Nitrobenzalkohol oder Thioglycerol) eingelassen.

Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisations Flugzeit-Massenspektrometrie (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-MS) (MALDI-TOF-MS): Die Messungen wurden an einem TOFSpec E-Massenspektrometer (*Micromass*, Manchester, Großbritannien) im positiven oder negativen Modus bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV mit einem Stickstoff-Laser 337 nm durchgeführt. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (10 mg/ml in Methanol) verwendet. Die Proben wurden in Konzentrationen von ca. 25 pmol/ μ l in Methanol oder Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) gelöst. 1 μ l der Probe wurde mit 1 μ l Matrixlösung gemischt und 1 μ l der Mischung wurde auf den Probenträger pipettiert und an der Luft bei Raumtemperatur trocknen gelassen („dried-droplet“-Methode). Zur Eichung des Gerätes wurden Glykolipide bekannter Massen und Polyethylenglycole verwendet.

Elektrospray-Flugzeit-Massenspektrometrie (ESI-TOF-MS): Die Massenspektren wurden im positiven Modus an einem Q-TOF2-Massenspektrometer (*Micromass*, Manchester, Großbritannien) mit Nanospray-Quelle aufgenommen. Die Proben wurden in einer Konzentration von 10 pmol/ μ l in Acetonitril/0,1 % Ameisensäure 1:1 (v/v) gelöst. Ca. 5 μ l der Lösung wurden in eine Gold/Palladium-beschichteten Glas-Kapillare (*MDS Proteomics A/S - Protana*, Odense, Dänemark) pipettiert und bei einer Kapillarspannung von ca. 1000 V ionisiert. Zur Eichung wurde eine Lösung von NaI/CsI in dem o.a. Lösungsmittel verwendet.

5.2.1.5 Proteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blue G-250

Zur Quantifizierung der Proteinmengen nach *Bradford et al. (1976)* wurde die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (*Serva*, Heidelberg, Deutschland) genutzt, dass nach Bindung an Proteine, dessen Extinktionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Es wurden Aliquote der homogenisierten Zellen auf deren Proteingehalt untersucht. Dabei dienten ansteigende Mengen (0,25-5 μ g) Rinderserumalbumin (BSA) (*Sigma*) als Standard. Die Messungen erfolgten an den computergesteuer-

ten Photometern Titertek Multiscan bzw. Multiskan Ascent (*Labsystems*, Helsinki, Finnland).

5.2.2 Präparative Methoden

5.2.2.1 Darstellung der Liposomen

Kleine unilamellare Liposomen wurden nach der Extrudertechnik (*MacDonald et al.*, 1991) hergestellt. Die jeweiligen Lipidmengen wurden aus den Stocklösungen der entsprechenden Lipide pipettiert und im Argonstrom vom Lösungsmittel befreit. Danach wurde 1 ml dest. Wasser zugesetzt, die Suspension kurzzeitig im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und langsamen Auftauen zu einer milchigen *Lösung* umgewandelt. Anschließend wurden die so gebildeten multilamellaren Liposomen 19-mal durch eine Polycarbonatmembran mit 100 nm Porengröße in einem "LiposoFast low pressure homogenizer" (*Avestin*, Ottawa, Kanada) gepresst, um unilamellare Liposomen herzustellen.

5.2.2.2 Belichtung der Liposomen

Die Liposomen wurden in 21 cm² Zellkulturschalen oder in „6-well“-Platten mit 8 cm² Vertiefungen pipettiert und bei der angegebenen Temperatur 4-5 Sekunden in einer Belichtungsapparatur (Selbstbau durch Werkstätten der Chemischen Institute, Universität Bonn) mit einer 2000 W-Osram-Ultramed Lampe (ca. 400 W Leistung im UV-Bereich; *Osram*, München, Deutschland) belichtet. Anschließend wurden die Suspensionen in ein Schraubkappenglas pipettiert und gefrieretrocknet. Der Rückstand wurde in Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt.

5.2.2.3 Extraktion der Photokopplungsprodukte aus Kieselgel-Platten für die Massenspektrometrie

Markierte Banden wurden von der DC-Platte nach Besprühen mit Methanol/Wasser 1:1 (v/v) geschabt. Das Kieselgel wurde nach einer Variation nach *Folch et al.* (1957) extrahiert, um Binder und andere wasserlösliche Verunreinigungen aus den DC-Platten abzutrennen. Dazu wurde das Kieselgel mit 1 ml Wasser versetzt, ultrabeschallt, und dann 1 ml Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde zentrifugiert (10 min, 3000 rpm), wonach sich das gewünschte, nicht-wasserlösliche Produkt in

der unteren organischen Phase anreicherte. Diese wurde abpipettiert und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 10 µl Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) aufgenommen und mit MALDI- bzw. ESI-Massenspektrometrie (5.2.1.4) untersucht.

Bei wasserlöslichen Analyten (z.B. Ganglioside) konnte dieses neue Extraktionsverfahren nicht angewendet werden, da diese sich vornehmlich in der Oberphase anreicherten, die ebenfalls die gelösten Nebenbestandteile der DC-Platten enthält (u.a. Polymethacrylate). In diesen Fällen wurde weiterhin lediglich mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) extrahiert.

5.2.3 Einbau- und Stoffwechselstudien

5.2.3.1 Herstellung der Sphingolipid-Albumin-Komplexe

Aus der Stocklösung des gewünschten Lipids wurde die entsprechende Menge (je nach Versuch 65-185 nmol) in ein Schraubkappenglas pipettiert und das organische Lösungsmittel im Argonstrom entfernt. Der Lipidrückstand wurde in 20 µl Ethanol gelöst und unter kräftigem Schütteln die gleiche Molmenge einer 10^{-4} M Lösung von delipidiertem Rinderserumalbumin (BSA) in HMEM zugegeben. Anschließend wurde mit HMEM zu einer 10 µM Lösung des Lipides aufgefüllt.

5.2.3.2 Inkubation der Zellen mit Lipid/BSA-Komplexen

Die Zellen, die sich nach Aussaat in DMEM mit 10 % FKS befanden, wurden dreimal mit HMEM gewaschen und danach für 30 min bzw. 2 h mit der 10 µM Lösung des Lipid/BSA-Komplexes in HMEM bei 7°C inkubiert. Dann wurde das Medium abpipettiert und die Zellen wurden zweimal mit HMEM gewaschen und für die entsprechende Zeit bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert.

5.2.3.3 Re-extraktion photoaktivierbarer Lipide aus der Plasmamembran

(„back-exchange“)

In einigen Fällen wurden im Anschluss an die Inkubation bei 37°C die in der Plasmamembran noch verbleibenden photoaktivierbaren Lipide re-extrahiert („back-exchange“, *van Meer et al., 1987*). Dazu wurden die Zellen auf 7°C gekühlt und dreimal 10 Minuten mit je 2 ml 10^{-4} M BSA-Lösung in HMEM inkubiert und anschließend erneut mit kaltem HMEM gewaschen.

5.2.3.4 Belichtung der Zellen

Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abpipettiert und die Zellen zweimal mit HMEM gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in den Schalen unter HMEM für 5 Sekunden auf Eis bzw. bei 20°C mit Licht aus einer starken Lampe bestrahlt wie unter 5.2.2.2 beschrieben.

5.2.3.5 Zellernte

Die Zellernte wurde in folgender Weise durchgeführt : Das jeweilige Inkubationsmedium wurde abpipettiert, die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 2 ml PBS unter Zuhilfenahme eines Gummischabers von vom Boden der Zellschale geschabt. Durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) wurden die Zellen pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml reinstem Wasser resuspendiert und durch mehrmaliges Pressen durch eine Pipettenspitze homogenisiert. Für die Proteinbestimmung nach *Bradford* (5.1.2.5) wurde ein Aliquot entnommen.

5.2.3.6 Lipidextraktion

Die nach der Zellernte erhaltene Zellsuspension wurde mit 4 ml Methanol versetzt und 3 h bei 37°C im Schraubkappenglas extrahiert. Die Suspension wurde im Argonstrom vom Lösungsmittel befreit, in 1 ml Methanol/Wasser 4:6 (v/v) resuspendiert, im Ultraschallbad sonifiziert und zur weiteren Aufarbeitung über LiChroprep RP-18 nach 5.2.3.7 entsalzt.

5.2.3.7 Entsalzen von Reaktionsansätzen und Abtrennung von wasserlöslichen Komponenten

Amphiphile Reaktionsprodukte wurden mittels Umkehrphasen-Chromatographie von wasserlöslichem Material ähnlich der beschriebenen Methode von *Williams und McCluer (1980)* gereinigt. Dazu wurden Pasteurpipetten mit 1 ml einer LiChroprep RP-18/Methanol-Suspension (1:1, v/v) gefüllt und nacheinander mit Chloroform/Methanol 1:1 (v/v), Methanol und Wasser gewaschen. Die lipophilen Reaktionsprodukte wurden auf diesen "Säulchen" aus ihrer Lösung in Methanol/Wasser (4:6; v/v) adsorbiert, mit Wasser als mobiler Phase wurden die wasserlöslichen und polaren Komponenten herausgewaschen und anschließend die Lipide mit Methanol sowie Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) eluiert.

5.2.3.8 Alkalische Methanolyse

Um den Lipidextrakt von Phosphoglycerolipiden zu befreien, wurde ein Teil des aus dem vorhergehenden Reinigungsschritt (5.2.3.7) stammende Eluates einer alkalischen Methanolyse unterzogen. Dabei wird die Alkalilabilität von Esterbindungen genutzt, wobei Sphingolipide nicht hydrolysiert werden. Zu dem in 2,44 ml Methanol gelöstem Lipid wurden 62,5 µl 4 M NaOH in Methanol (Endkonzentration 0,1 M) pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend zur Neutralisation mit 20 µl Essigsäure (350 µmol) versetzt und im Argonstrom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol/Wasser 4:6 (v/v) aufgenommen und wie unter 5.2.3.7 beschrieben von polaren und wasserlöslichen Substanzen befreit.

5.2.3.9 Trennung von anionischen und ungeladenen Lipiden mittels

Anionenaustauscherchromatographie

Eine Pasteurpipette wurde mit 1 ml DEAE-Sephadex A25-Suspension (*Pharmacia*, Uppsala, Schweden) (Acetat-Form in Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 (v/v/v)) gefüllt und mit 3 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches äquilibriert. Der Lipidextrakt wurde ebenfalls in 1 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 (v/v/v) gelöst und auf die Säulchen aufgetragen. Der Durchlauf und weitere 5 ml Chloroform/Methanol/Wasser 3:7:1 (v/v/v) enthielten die ungeladenen Lipide. Anschließend wurden mit 5 ml Chloroform/Methanol/1 M NH₄OAc 3:7:1 (v/v/v) die anionischen Lipide eluiert.

5.2.3.10 Ultrazentrifugationsexperimente

Diese Versuche wurden in Anlehnung an die Veröffentlichungen von *Brown und Rose (1992)* und *Melkonian et al. (1999)* durchgeführt. Die Zellen wurden in 21 cm² Kulturschalen zur Konfluenz herangezogen, und nach 5.2.3.2 mit den jeweiligen Sphingolipid/BSA-Komplexen inkubiert. Die Zellen wurden ohne Belichtung mit 1 ml TNE-Puffer pH 7,5, der 1 % Triton-X-100 enthielt, lysiert. Die Zellreste wurden mit einem Zellschaber von den Schalenböden geschabt und entweder mittels eines (Hand)-Homogenisators oder durch 40-maliges Pressen durch eine Nadel (22 gauge) homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend mit 80 %-Saccharose-Lösung in TNE-Puffer auf 40 % Saccharose eingestellt und auf den Boden eines Zentrifugenröhrchens pipettiert. Dann wurde mit 5 ml 38 %- und 3 ml 5 %-Saccharose-Lösung in TNE-Puffer überschichtet und in der Ultrazentrifuge (L8-80M, *Beckman*, München) im Schwenkrotor SW41Ti 18 h bei 4°C zentrifugiert (28000 rpm, 135000-g). Das Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig im Boden angestoßen und der Inhalt in Fraktionen von ca. 300 µl Volumen

gesammelt. Die Lipide wurden über RP-18-Material von polaren und wasserlöslichen Komponenten (u.a. Saccharose) befreit (5.2.3.7). Anschließend wurde die enthaltene Radioaktivität im Szintillationszähler quantifiziert (5.2.1.2) und der Lipidextrakt über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

6 *Literaturverzeichnis*

- Albrecht, B. (1991) NBD-Ceramide mit unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge: Synthese, Inkorporation und Stoffwechselprodukte in Fibroblasten. *Diplomarbeit*, Universität Bonn
- Albrecht, B., Pütz, U. und Schwarzmann, G. (1995) Synthesis of fluorescent and radioactive analogues of two lactosylceramides and glucosylceramide containing β -thioglycosidic bonds that are resistant to enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* **276**, 289-308
- Anderson, R.G.W. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199-225
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3254-3259
- Bittman, R., Kasireddy, C.R., Mattjus, P. und Slotte, J.P. (1994) Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry* **33**, 11776-11781
- Brenner-Weiß, G., Giannis, A. und Sandhoff, K. (1992) Synthesis of potential inhibitors of the glycosphingolipid biosynthesis. *Tetrahedron* **48**, 5855-5860
- Bretscher, M.S. (1973) Membrane structure : Some general principles. *Science* **181**, 622-629
- Bretscher, M.S. und Munro, S. (1993) Cholesterol and the golgi apparatus. *Science* **261**, 1280-1281
- Brown, D.A. und London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **14**, 111-136
- Brown, D.A. und Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544
- Brown, R.E., Stephenson, F.A., Markello, T., Barenholz, Y. und Thompson, T.E. (1985) Properties of a specific glycolipid transfer protein from bovine brain. *Chem. Phys. Lipids* **38**, 79-93
- Brown, R.E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* **111**, 1-9
- Brunner, J., Senn, H. und Richards, F.M. (1980) 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. *J. Biol. Chem.* **255**, 3313-3318
- Chatterjee, S., Sekerke, C.S. und Kwiterovich, P.O. Jr. (1976) Alterations in cell surface glycosphingolipids and other lipid classes of fibroblasts in familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4339-4343
- Coste, H., Martel, M.B., Azzar, G. und Got, R. (1985) UDPglucose-ceramide glucosyltransferase from porcine submaxillary glands is associated with the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 1-7
- Coste, H., Martel, M.B. und Got, R. (1986) Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 6-12
- Devaux, P.F. und Zachowski, A. (1994) Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 107-120
- EGge, H. und Peter-Katalinic, J. (1987) Fast atom bombardment mass spectrometry for structural elucidation of glycoconjugates. *Mass Spectrom. Rev.* **6**, 331-393
- Folch, J., Lees, M. und Sloane-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509

- Fra, A.M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S. und Simons, K. (1995) A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett.* **375**, 11-14
- Fridriksson, E.K., Shipkova, P.A., Sheets, E.D., Holowka, D., Baird, B., McLafferty, F.W. (1999) Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* **38**, 8056-8063
- Friedrichson, T. und Kurzchalia, T.V. (1998) Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* **394**, 802–805
- Fürst, W., Sandhoff, K. (1992) Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1126**, 1-16
- Futerman, A.H., Stieger, B., Hubbard, A.L. und Pagano, R.E. (1990) Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **265**, 8650-8657
- Gahmberg, C.G. und Hakomori, S.-i. (1973) External labeling of cell surface galactose and galactosamine in glycolipids and glycoproteins of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **248**, 4311-4317
- Gkantiragas, I., Brugger, B., Stuken, E., Kaloyanova, D., Li, X.Y., Lohr, K., Lottspeich, F., Wieland, F.T. und Helms, J.B. (2001) Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1819-1833
- Grassmé, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2001) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589-20596
- Gupta, A.K. und Rudney, H. (1991) Plasma membrane sphingomyelin and the regulation of HMG-CoA reductase activity and cholesterol biosynthesis in cell cultures. *J. Lipid Res.* **32**, 125-136
- Hakomori, S.-i. (1975) Structures and organization of cell surface glycolipids dependency of cell growth and malignant transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **417**, 55-89
- Hansson, H.A., Holmgren, J. und Svennerholm, L. (1977) Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3782-3786
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. und Simons, K. (1998) Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J. Cell Biol.* **141**, 929–942
- Hasegawa, A., Morita, M., Kojima, Y., Ishida, H. und Kiso, M. (1991) Synthesis of cerebroside, lactosylceramide and ganglioside GM3 analogs containing β -thioglycosidally linked ceramide, *Carbohydr. Res.* **214**, 43-53
- Hörnschemeyer, J. (1997) Synthese von zwei photoaktivierbaren Glucosyl-thio-ceramid-Derivaten und Untersuchungen ihrer Lipidnachbarschaft in Modellmembranen. *Diplomarbeit*, Universität Bonn
- Hooper, N.M. (1998) Membrane biology: do glycolipid microdomains really exist? *Curr. Biol.* **8**, R114-116
- Hooper, N.M. (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* **16**, 145-56
- Ikonen, E. (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 470-477
- Ilangumaran, S. und Hoessli, D.C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.* **335**, 433-440
- Jacobson, K. und Dietrich, C. (1999) Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.* **9**, 87-91

- Janes, P.W., Ley, S.C. und Magee, A.I. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**, 447–461
- Jeckel, D. und Wieland, F. (1993) Sphingolipids Part B: Regulation and function of metabolism; Truncated ceramide analogs as probes for sphingolipid biosynthesis and transport. *Adv. Lip. Res.* **26**, 143-159
- Kenworthy, A.K., Petranova, N. und Edidin, M. (2000) High-resolution FRET microscopy of cholera toxin β -subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1645–1655
- Kobayashi, T., Gu, F. und Gruenberg, J. (1998) Lipids, lipid domains and lipid-protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 517-526
- Kornberg, R.D. und McConnell, H.M. (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2564-2568
- Lange, Y. (1991) Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid Res.* **32**, 329-339
- Lange, Y., Ye, J. und Steck, T.L. (1998) Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 18915-18922
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. und Steck, T.L. (2000) Cholesterol movement in Niemann-Pick Type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **275**, 17468-17475
- Linke, T. (2000) Purification, enzymatic characterization and interfacial activity of human acid ceramidase. *Dissertation*, Universität Bonn
- Lipsky, N.G. und Pagano, R.E. (1983) Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2608-2612
- Liscum, L. und Munn, N.J. (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1438**, 19-37
- London E, Brown DA. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.* **1508**, 182-95
- MacDonald, R.C., MacDonald, R.I., Menco, B.Ph.M., Takashita, K., Subbaro, N.K. und Hu, L. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297-303
- Meier, E.M., Schummer, D. und Sandhoff, K. (1990) Evidence for the presence of water within the hydrophobic core of membranes. *Chem. Phys. Lipids* **55**, 103-113
- Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. und Brown, D.A. (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **274**, 3910-3917
- Möbius, W. (1998) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Endocytose eines Biotin-markierten Derivates des Gangliosids GM1. *Dissertation*, Universität Bonn.
- Möbius, W., Herzog, V., Sandhoff, K. und Schwarzmann, G. (1999) Intracellular distribution of a biotin-labeled ganglioside, GM1, by immunoelectron microscopy after endocytosis in fibroblasts. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1005-1014
- Ostermeyer, A.G., Beckrich, B.T., Ivarson, K.A., Grove, K.E. und Brown, D.A. (1999) Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. Methyl- β -cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 34459-34466

- Pagano, R.E., Sepanski, M.A. und Martin, O.C. (1989) Molecular trapping of a fluorescent ceramide analogue at the Golgi apparatus of fixed cells: Interaction with endogenous lipids provides a *trans*-Golgi marker for both light and electron microscopy. *J. Cell Biol.* **109**, 2067-2079
- Palade, G.E. (1953) The fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* **24**, 1424
- Parton, R.G. (1994) Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 155-166
- Patterson, M.C., Vanier, M.T., Suzuki, K., Morris, J.A., Carstea, E., Neufeld, E.B., Blanchette-Mackie, J.E. und Pentchev, P.G. (2001) Niemann-Pick-Disease Type C: A lipid trafficking disorder. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*; Chapter 145 (Hrsg.: Scriver, C., Beaudet, A.L., Valle, D. und Sly, W.S.), 8.Aufl., McGraw Hill, New York, 3611-3633
- Pellkofer, R. und Sandhoff, K. (1980) Halothan increases membrane fluidity and stimulates sphingomyelin degradation by membrane-bound neutral sphingomyelinase of synaptosomal plasma membranes from calf brain already at clinical concentrations. *J. Neurochem.* **34**, 988-992
- Pike, L.J. und Casey, L. (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26453-26456
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K. und Horber, J.K. (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997-1008
- Pütz, U. (1996) Synthese markierter Galaktosylthioglycosylceramide und ihre postendozytische Glykosylierung in kultivierten Zellen. *Dissertation*, Universität Bonn
- Ridgway, N.D. (2000) Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **1484**, 129-141
- Rosenwald, A.G. und Pagano, R.E. (1993) Intracellular transport of ceramide and its metabolites at the Golgi complex: insights from short-chain ceramides. *Adv. Lipid. Res.* **26**, 101-118
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. und Anderson, R.G.W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kamen, B.A. und Anderson, R.G. (1990) Cholesterol controls the clustering of the glycosylphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* **111**, 2931-2938
- Schroeder, R.J., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E. und Brown, D.A. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 1150-1157
- Schuchman, E.H. und Desnick, R.J. (2001) Niemann-Pick types A and B: Acid sphingomyelinase deficiencies. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*; Chapter 144 (Hrsg.: Scriver, C., Beaudet, A.L., Valle, D. und Sly, W.S.), 8.Aufl., McGraw Hill, New York, 3589-3610
- Schummer, D. (1986) Synthese eines Diazirinderivates vom Gangliosid GM1 und Versuche zur Photoaffinitätsmarkierung von Lipiden in künstlichen Lipidsystemen. Diplomarbeit, Universität Bonn
- Schutz, G.J., Kada, G., Pastushenko, V.P. und Schindler, H. (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* **19**, 892-901

- Schwarzmann, G. (1978) A simple and novel method for tritium labeling of gangliosides and other sphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta* **529**, 106-114.
- Schwarzmann, G. (2001) Uptake and metabolism of exogenous glycosphingolipids by cultured cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 163-171
- Schwarzmann, G., Hinrichs, U., Sonderfeld, S., Marsh, D. und Sandhoff, K. (1986) Metabolism of exogenous gangliosides in cultured fibroblasts and cerebellar cells. In: *Enzymes of lipid metabolism II* (Hrsg.: Freysz, L., Dreyfus, H., Massarelli, R., Gatt, S.); NATO ASI Series A, Vol. 116, Plenum Press, New York, 553-562
- Schwarzmann, G., Hoffmann-Bleihauer, P., Schubert, J., Sandhoff, K. und Marsh, D. (1983) Incorporation of ganglioside analogues into fibroblast cell membranes: a spin-label study. *Biochemistry* **22**, 5041-5048
- Schwarzmann, G., Hofmann, P., Pütz, U. und Albrecht, B. (1995) Demonstration of direct glycosylation of nondegradable glucosylceramide analogs in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 21271-21276
- Schwarzmann, G. und Sandhoff, K. (1990) Metabolism and intracellular transport of glycosphingolipids. *Biochemistry* **29**, 10865-10871
- Shin, J.S. und Abraham, S.N. (2001) Caveolae as portals of entry for microbes. *Microbes Infect.* **3**, 755-761
- Shu, L., Lee, L., Chang, Y., Holzman, L.B., Edwards, C.A., Shelden, E. und Shayman, J.A. (2000) Caveolar structure and protein sorting are maintained in NIH 3T3 cells independent of glycosphingolipid depletion. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 83-90
- Sillence, D.J., Riggers, R.J., Neville, D.C.A., Harvey, D.J. und van Meer, G. (2000) Assay for the transbilayer distribution of glycolipids: selective oxidation of glucosylceramide to glucuronylceramide by TEMPO nitroxyl radicals. *J. Lipid Res.* **41**, 1252-1260
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572
- Simons, K. und Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31-39
- Simons, K. und van Meer, G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202
- Singer, S.J. und Nicholson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731
- Slotte, J.P. und Bierman, E.L. (1988) Depletion of plasma-membranes sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membrane and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem. J.* **250**, 653-658
- Smaby, J.M., Momsen, M., Kulkarni, V.S. und Brown, R.E. (1996) Cholesterol-induced interfacial area condensations of galactosylceramide and sphingomyelins with identical acyl chains. *Biochemistry* **35**, 5696-5704
- Sonnino, S., Cantu, L., Acquotti, D., Corti, M. und Tettamanti, G. (1990) Aggregation properties of GM3 ganglioside (II³Neu5AcLacCer) in aqueous solutions. *Chem. Phys. Lipids* **52**, 231-241
- Thomson, T.E. und Tillack, T.W. (1985) Organization of glycosphingolipids in bilayers and plasma membranes of mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 361-386
- Tocanne, J.F., Cezanne, L., Lopez, A., Piknova, B., Schram, V., Tournier, J.F. und Welby, M. (1994) Lipid domains and lipid/protein interactions in biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 139-158

- van Echten, G. und Sandhoff, K. (1989) Modulation of ganglioside biosynthesis in primary cultured neurons. *J. Neurochem.* **52**, 207-214
- van Genderen, I.L., van Meer, G., Slot, J.W., Geuze H.J. und Voorhout, W.F. (1991) Subcellular localization of Forssman glycolipid in epithelial MDCK cells by immuno-electronmicroscopy after freeze-substitution. *J. Cell Biol.* **115**, 1009-1019
- van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. und van Meer G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-17
- van Meer, G. (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 247-275
- van Meer, G., Stelzer, E.H., Wijnaendts-van-Resandt, R.W. und Simons, K. (1987) Sorting of sphingolipids in epithelial (Mardin-Darby canine kidney) cells. *J. Cell Biol.* **105**, 1623-1635
- van Meer, G. und van Genderen, I.L. (1994) Intracellular lipid distribution, transport, and sorting – A cell biologist's need for physicochemical information. In : *Subcellular biochemistry, Vol. 23, Physicochemical methods in the study of biomembranes* (Hrsg.: H.J. Hilderson and G.B. Ralston), Plenum Press, New York, 1-23
- Varma, R. und Mayor, S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798–801
- Veldman, R.J., Maestre, N., Aduib, O.M., Medin, J., Salvayre, R. und Levade, T. (2001) A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling. *Biochem. J.* **355**, 859-868
- Waugh, M.G., Lawson, D., Tan, S.K. und Hsuan, J.J. (1998) Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 17115-17121
- Weitz, G., Lindl, T., Hinrichs, U. und Sandhoff, K. (1983) Release of sphingomyelin phosphodiesterase (acid sphingomyelinase) by ammonium chloride from CL 1D mouse L-cells and human fibroblasts. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **364**, 863-871
- Welti, R. und Glaser, M. (1994) Lipid domains in model and biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 121-137
- Wherrett, J.R. und Huterer, S. (1972) Enrichment of Bis(monoacylglycero)phosphate in lysosomes from rat liver. *J. Biol. Chem.* **247**, 4114-4120
- Wiegandt, H. (1982) The gangliosides. In: *Advances in neurochemistry*. Agranoff, B.W. und Aprison, M.H. (eds.), Plenum Publishing Corp., New York, **4**, 149-223
- Wilkening, G., Linke, T. und Sandhoff, K. (1998) Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. *J. Biol. Chem.* **273**, 30271-30278
- Williams, M. und McCluer, R. (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J. Neurochem.* **35**, 266-269
- Wilson, B.S., Pfeiffer, J.R. und Oliver, J.M. (2000) Observing FcεRI signaling from the inside of the mast cell membrane. *J. Cell Biol.* **149**, 1131–1142
- Yamada, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 445-458

